
5D

APLICACIONES DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS LÁCTICAS EN LA CALIDAD Y FUNCIONALIDAD DE LOS ALIMENTOS

MONTSERRAT NÁCHER VÁZQUEZ^{1,2}, IDOIA IBARBURU LÓPEZ³, SARA NOTARARIGO¹, PILAR FERNÁNDEZ DE PALENCIA DELGADO¹, ROSA AZNAR NOVELLA^{2,4}, M^a TERESA DUEÑAS CHASCO³, PALOMA LÓPEZ GARCÍA¹

¹*Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, España.*

²*Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC. Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, España.*

³*Departamento de Química Aplicada. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Paseo Manuel de Lardizábal 3, 20018 Donostia, España.*

⁴*Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia. Av. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, España.*

5D.1 INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen una gran importancia industrial como bacterias iniciadoras o coadyuvantes en la producción de alimentos fermentados producidos a nivel industrial, tales como derivados lácteos, cárnicos fermentados y masas panarias. Así mismo, en alimentos fermentados artesanales producidos a pequeña escala, las poblaciones naturales de BAL dominan el proceso de fermentación confiriendo características singulares al producto. Además, algunas BAL presentan características beneficiosas para la salud (propiedades probióticas) o capacidades metabólicas extraordinarias como son la producción de enzimas (i.e. amilasas, fitasas), vitaminas (i.e. folatos, riboflavina) o exopolisacáridos (EPS), de especial interés para la industria agroalimentaria y para la formulación de nuevos alimentos funcionales (revisado por Anastasio, 2010; Badel, 2011; Capozzi, 2012). Por otro lado, la capacidad de las BAL para producir bacteriocinas las

convierte en candidatos para su aplicación como bioconservantes (ver detalles en el capítulo 5E de este libro).

Muchas de las especies de BAL tienen el *status* de GRAS “Generally Recognized As Safe” según la Administración Norteamericana de Alimentos y Drogas (FDA) o QPS “Qualified Presumption of Safety” según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) lo que facilita su aplicación en alimentos y, por tanto, suscita su interés industrial.

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos que, más allá de su valor nutricional básico, ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Entre ellos se encuentran los alimentos probióticos, que contienen cultivos bacterianos u otros microorganismos no patógenos que después de ser ingeridos ejercen beneficios para la salud y promueven una microbiota intestinal saludable. Muchos de estos alimentos están elaborados con BAL y gozan actualmente de un amplio mercado que se encuentra en continua expansión.

Las BAL con capacidades metabólicas extraordinarias presentan un elevado potencial en la elaboración/formulación de nuevos alimentos funcionales de alto valor añadido (revisado por Zanini, 2012). Los estudios actuales sobre su aplicación en funcionalidad de alimentos demuestran que BAL productoras de fitasas pueden mejorar la solubilización de minerales en masas ácidas durante la fermentación panaria (Anastasio, 2010) y BAL superproductoras de riboflavina pueden utilizarse para elaborar pan y pasta enriquecidos en vitamina B₂ (revisado por Capozzi, 2012). Además, algunas BAL sintetizan EPS que son secretados al medio, mejorando las características sensoriales y tecnológicas de varios productos fermentados, fundamentalmente productos lácteos y los basados en cereales. BAL productoras de heteropolisacáridos (HePS) mejoran la viscosidad y textura de leches fermentadas, tales como yogurt, kéfir y queso con bajo contenido en grasa (revisado por Badel, 2011). Algunas cepas de BAL productoras de otro tipo de EPS, los homopolisacáridos (HoPS), mejoran las propiedades viscoelásticas de masas ácidas, que podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores para reducir el uso de hidrocoloides, como aditivos texturizantes, en la elaboración de productos de panadería. Por otro lado, los EPS sintetizados por BAL tienen un gran interés en la industria agroalimentaria dado que se les han atribuido efectos beneficiosos para la salud humana.

Dado el interés biotecnológico de los EPS producidos por las BAL, en este capítulo nos centraremos en su descripción y en la contribución de estos biopolímeros y de sus bacterias productoras en la calidad y funcionalidad de los alimentos.

5D.2 TIPOS DE EXOPOLISACÁRIDOS Y SU ESTRUCTURA

En los últimos años se han aislado diversas estirpes de BAL productoras de EPS a partir de diferentes productos alimentarios (leches fermentadas, yogur, granos de kéfir, cárnicos, cereales fermentados y bebidas alcohólicas). El aislamiento de las bacterias productoras es relativamente sencillo si se cultivan en medio sólido, debido a que las colonias tienen un aspecto mucoso (Figura 5D.1B y 5D.1C) y al ser tocadas con un asa de siembra se levantan como si fueran filamentos (Figura 5D.1D). Así, hemos aislado BAL productoras de HoPS y HePS (Figura 5D.1). Sin embargo, cabe resaltar que para dicha detección es necesaria la presencia en el medio de cultivo del sustrato requerido para la síntesis del EPS (Figura 5D.1B), ya que en ausencia de éste las bacterias muestran un fenotipo no mucoso (Figura 5D.1A).

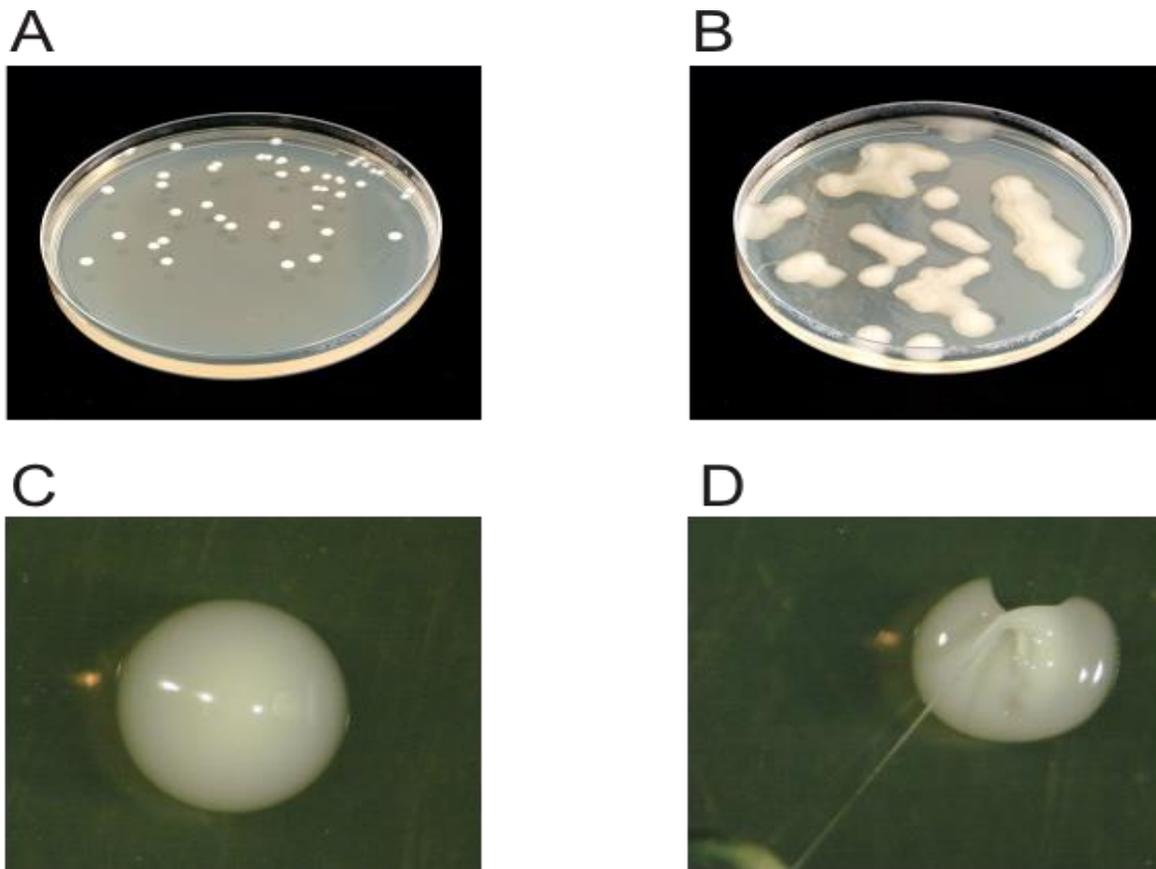


Figura 5D.1 Fotografías de colonias de BAL productoras de EPS. Colonias de *Lactobacillus sakei* aislado de productos cárnicos y productor de α -glucano, cultivado en placas de MRS suplementadas con glucosa (A) y con sacarosa, condición óptima de producción de EPS (B) (Nácher-Vázquez, resultados no publicados). Colonias mucosas de *Lactobacillus suebicus* aislado de sidra ahilada y productor de heteropolisacárido cultivado en medio MRS suplementado con glucosa antes (C) y después (D) de ser levantadas con un asa de siembra (Ibarburu, resultados no publicados).

Los EPS producidos por BAL pueden encontrarse íntimamente ligados a componentes de la superficie celular como los ácidos lipoteicóicos integrados en la pared celular y como estructuras compactas formando cápsulas polisacarídicas. Sin embargo, las BAL también sintetizan otros EPS que están unidos débilmente a la superficie celular o son excretados al ambiente como sustancia mucosa.

Los EPS bacterianos presentan una amplia variabilidad en su composición química, estructura y peso molecular. En función de su composición química, se clasifican en HoPS, constituidos por un único tipo de monosacárido, y HePS formados por dos o más tipos de monosacáridos. En la síntesis de los HePS intervienen enzimas glicosiltransferasas específicas unidas a membrana que polimerizan las unidades repetitivas, sintetizadas a nivel de membrana en su lado citoplasmático. Las glicosiltransferasas están codificadas por genes incluidos en operones o unidades mayores (clusters) junto a los genes que determinan la longitud de cadena, su polimerización y secreción, así como los que regulan su síntesis. Sin embargo, en el caso de los HoPS tan sólo se requiere una enzima, codificada por un solo gen para la síntesis del polímero, y en la mayoría de los casos, la proteína anclada a la membrana cataliza la síntesis extracelularmente (revisado por Werning, 2012).

Los HoPS producidos por BAL pueden dividirse a su vez en glucanos (α y β) y fructanos (inulina y levanos) compuestos por unidades repetidas de D-glucopiranososa y D-fructopiranososa, respectivamente (Tabla 5D.1).

Los α -glucanos son sintetizados por enzimas pertenecientes a la familia de glucansacarasas que utilizan sacarosa como sustrato. Los fructanos son sintetizados extracelularmente por fructansacarasas utilizando sacarosa como sustrato, mientras que los β -glucanos son sintetizados por la glicosiltransferasa GTF, utilizando UDP-glucosa como sustrato, y posiblemente este enzima es también responsable de su secreción extracelular (revisado por Werning, 2012).

Los α -glucanos se pueden clasificar en cinco clases, según el tipo de enlace entre los átomos de carbono de la cadena lineal, y son producidos fundamentalmente por los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. En cuanto a los dextranos, la composición de la cadena principal está mayoritariamente formada por α -(1,6)-D-glucosa ó α -(1,4)-D-glucosa, además pueden presentarse tres tipos de ramificaciones que dan lugar a tres clases de dextranos, según el tipo de enlace involucrado en dicha ramificación (α -(1,2), α -(1,3) ó α -(1,4)). Los α -glucanos están autorizados por la EFSA para su utilización en la industria alimentaria como espesantes, gelificantes y en aplicaciones nutritivas. Entre estas últimas cabe destacar que los oligosacáridos y los isomalto-oligosacáridos, que derivan de estos EPS, se ha observado que resisten al proceso digestivo de los animales y no pueden absorberse en el intestino delgado. De este modo llegan intactos al intestino grueso, donde son metabolizados por las poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal

transformándolos en ácidos grasos de cadena corta. La generación de estas moléculas beneficia la salud del huésped puesto que estimulan el flujo sanguíneo del colon y la reabsorción de los electrolitos (revisado por Korakli, 2006).

Tabla 5D.1 Homopolisacáridos producidos por bacterias lácticas

Tipos de EPS		Enlace	Ramificaciones	BAL productoras
Glucanos	α-glucanos	Glucano	α -(1,2)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
		Mutano	α -(1,3)	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>L. mesenteroides</i> <i>Lactobacillus reuteri</i>
		Reuterano	α -(1,4)	<i>L. reuteri</i>
	Dextrano	α -(1,6)	α -(1,2)	<i>L. mesenteroides</i>
		α -(1,6)	α -(1,3)	<i>L. reuteri</i>
		α -(1,6)	α -(1,4)	<i>Lactobacillus sakei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus parabuchneri</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
Alternano	α -(1,6) + α -(1,3)		<i>L. mesenteroides</i>	
β-glucanos	Glucano	β -(1,3)	β -(1,2)	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <i>L. diolivorans</i> <i>Lactobacillus suebicus</i> <i>Oenococcus oeni</i>
Fructanos	*Inulina	β -(2,1)		<i>L. reuteri</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>
	*Levano	β -(2,6)		<i>L. reuteri</i> <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. mutans</i> <i>Lactobacillus pontis</i> <i>Lactobacillus frumenti</i> <i>Lactobacillus panis</i>

*La inulina y el levano existen tanto en la forma lineal como en forma ramificada.

La producción de β -glucanos por las BAL es poco frecuente comparada con la producción de α -glucanos, y no se presenta como carácter de especie o género. Solo se conocen algunas cepas productoras que pertenecen a los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus* y *Streptococcus*. Los β -D-glucanos están constituidos por cadenas lineales con enlaces (1,3) y con ramificaciones en posición (1,2) y, además, poseen un elevado peso molecular. La estructura de este tipo de β -D-glucanos, determinada por microscopía de fuerza atómica (Figura 5D.2), indica su potencial como texturizantes. Además, se han observado propiedades probióticas e inmunomoduladoras de las bacterias productoras (revisado por Werning, 2012), lo que les confiere un valor añadido como componentes activos para la elaboración de alimentos funcionales.

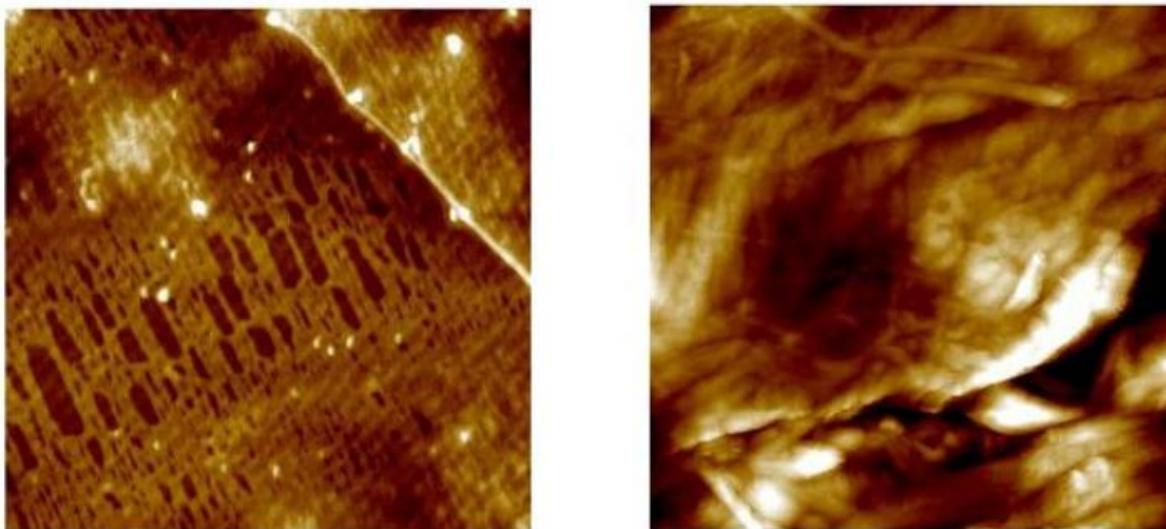


Figura 5D.2 Imágenes del β -(1,3)-glucano con ramificaciones (2,1) de *Lactobacillus suebicus* CUPV221 obtenidas por microscopía de fuerza atómica de contacto intermitente. Soluciones acuosas del biopolímero a 100 mg/mL fueron analizadas antes de (A, imagen de 2.5 x 2.5 μ m) o después de (B, imagen de 5 x 5 μ m) ser agitadas. Reproducido de Marieta y Dueñas (2010). En *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, pp. 537-545. A. Mendez-Vilas y J. Díaz (Eds.)

Los fructanos producidos por BAL son compuestos con un elevado peso molecular, siendo los géneros que los producen *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Weissella*. En la actualidad sólo se han descrito dos fructanos producidos por BAL: la inulina β -(1,2) y el levano β -(2,6) con ramificaciones en posición β -(2,1). El levano se considera un biopolímero funcional de aplicación en el campo alimentario, cosmético, químico y farmacéutico. Destaca su papel como prebiótico en la reducción del exceso de colesterol.

Los HePS producidos por BAL presentan una gran diversidad en cuanto a composición, estructura, masa molecular y capacidad de interactuar con proteínas, características que contribuyen a la solubilidad, reología y otras propiedades físicas de los

polisacáridos. La producción y secreción de estos biopolímeros requieren de la acción sincronizada de varias enzimas y de proteínas implicadas en la síntesis de la unidad repetitiva, la determinación de la longitud de la cadena y su polimerización, así como de proteínas transportadoras (revisado por Werning, 2012). Los HePS están constituidos por un esqueleto de unidades repetitivas lineales o ramificadas en diferentes posiciones, y según la cepa bacteriana, existe variación en cuanto al grado de ramificación y la longitud de la cadena. Las características del polímero como la composición monomérica, la disposición de los monosacáridos en la cadena, el número de ramificaciones, el carácter aniónico o neutro y la masa molecular influyen en las propiedades reológicas del mismo. Así, los HePS de masa molecular alta se han relacionado con la viscosidad de los medios en los que se encuentran. Además, algunos HePS de BAL tienen en común una gran capacidad espesante a concentraciones bajas. Cada una de las unidades repetitivas de los HePS puede estar constituida por entre tres a ocho monosacáridos diferentes, siendo los más frecuentes D-glucosa, D-galactosa y L-ramnosa, en sus formas anoméricas α o β . Independientemente de la diversidad de estos polímeros, se ha observado que la mayoría de los HePS de BAL contienen galactosa en su composición química. Se han encontrado también como monosacáridos constituyentes, la manosa, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, L-fucosa o ácido glucurónico pudiendo contener además sustituyentes de naturaleza no glicídica (fosfato, acetilo y glicerol). En función de su composición monomérica, los HePS sintetizados por BAL se han clasificado en hasta nueve grupos distintos (Mozzi, 2006). Diferentes estirpes de BAL aisladas de productos lácteos, cereales y bebidas alcohólicas producen HePS. Pertenecen a los géneros *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii*, subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. rhamnosus*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*, *S. macedonicus*) y *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*).

5D.3 INFLUENCIA DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS EN LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LOS ALIMENTOS

Una de las prácticas más utilizadas desde la antigüedad para la conservación de los alimentos es la fermentación. Durante el proceso de fermentación las BAL metabolizan los carbohidratos de los alimentos, y como resultado transforman las materias primas confiriendo al producto final las características organolépticas típicas. La utilización de BAL productoras de EPS contribuye, además, a mejorar las cualidades de los alimentos en cuanto a sus propiedades reológicas y funcionales, actuando como espesantes naturales. En el caso de leches fermentadas y quesos no grasos intervienen en los parámetros tecnológicos esenciales, ya que proporciona al producto una viscosidad adecuada y reducen la sinéresis, siendo también apropiadas para la elaboración de pasta o productos de panadería. La presencia de los EPS en los alimentos se ha relacionado con la mejora de la

percepción del sabor de los mismos debido al mayor tiempo de retención de los alimentos viscosos en la boca. Sin embargo, los EPS también pueden desempeñar un papel importante en el deterioro de alimentos como se aprecia en el desarrollo de viscosidad en productos cárnicos y bebidas.

Actualmente, el consumidor demanda productos lácteos más cremosos, lo que ha determinado que las industrias lácteas deban desarrollar nuevas estrategias. Durante el proceso fermentativo del yogur, la lactosa que se encuentra en la leche se transforma en ácido láctico por la acción bacteriana, lo que provoca una bajada del pH. A consecuencia de todo ello, existe una desestabilización de la matriz y las caseínas terminan coagulando y formando un gel. Para conseguir yogures batidos, se realiza una homogeneización suave del coágulo de la leche después de la fermentación. Sin embargo, este tratamiento mecánico es muy agresivo, afecta a las propiedades reológicas del alimento y favorece su sinéresis (separación del suero). Así en la actualidad, las aproximaciones tecnológicas utilizadas para aumentar la calidad de los productos lácteos fermentados (reducir la sinéresis y aumentar la textura) han consistido en aumentar la proporción sólida de la leche con proteínas (caseínas), azúcares (sacarosa y fructosa) o estabilizantes (pectina, almidón, alginato y gelatina) cuando la legislación lo permite. Sin embargo, todas estas medidas no van en concordancia con las exigencias de los consumidores que demandan productos bajos en grasa, bajos en azúcar, con pocos aditivos y no muy caros. Por este motivo, una alternativa sería el uso de EPS, ya que éstos tienen una importante función como espesantes naturales. Son capaces de incrementar la viscosidad o de mejorar la textura y estructura de los productos en los que se encuentran sin alterar su sabor ni aroma. Su función estabilizante (unen el agua y limitan la sinéresis) depende de sus características físico-químicas (composición química, estructura tridimensional y tamaño) y de la interacción del EPS con los componentes de la leche (iones y proteínas). De hecho, el xantano producido por *Xanthomonas campestris* fue el primer EPS microbiano usado como aditivo. El problema es que su uso no está permitido en algunos países europeos ni en los Estados Unidos de América, a diferencia de los EPS producidos por BAL debido a su condición GRAS.

Existen numerosos estudios sobre EPS aislados de BAL procedentes de productos lácteos fermentados (yogures artesanales, kéfir, viili), vegetales y cereales que revelan una amplia diversidad de estos polímeros. Se estudian, además, las condiciones óptimas de producción para su implementación tecnológica en la industria de alimentos fermentados. Sin embargo, los niveles de producción de EPS, por parte de las BAL, aún en las condiciones óptimas de producción, son inferiores comparados con otros polímeros bacterianos. Así, el bajo rendimiento de producción hace que actualmente no sea factible el uso de los EPS producidos por BAL como aditivos alimentarios purificados. Sin embargo, el objetivo es que dichos compuestos actúen en el alimento ayudando a mejorar sus características organolépticas. Por ello, la estrategia más adecuada sería seleccionar como cultivos iniciadores de productos lácteos fermentados bacterias lácticas productoras de

aquellos EPS que confieran las mejores propiedades sensoriales (textura y viscosidad) a los productos que se van a elaborar.

El kéfir es un ejemplo de producto elaborado de forma artesanal, sin aditivos añadidos y en el que además de los beneficios para la salud, el kefirán presente aporta ventajas tecnológicas interesantes. El kefirán es el principal EPS obtenido de los granos de kéfir y es producido por varios lactobacilos homofermentativos que incluyen cepas de las especies *L. kefiranofaciens* y *L. kefir*. El kefirán es un polisacárido, constituido equimolecularmente por D-glucosa y D-galactosa, que aporta a la leche una mejora de la viscosidad y viscoelasticidad, actuando como estabilizante, evitando la sinéresis y la granulosis y proporcionando un efecto espesante natural.

Algunos estudios han mostrado que otros productos no derivados de la leche, como los basados en cereales, son sustratos adecuados para el crecimiento de diferentes BAL y también para la producción de EPS. De nuevo, en este otro tipo de productos la síntesis de EPS durante la fermentación desempeña un papel importante en la viscosidad y textura final del producto, además de beneficios para salud, como por ejemplo, el β -glucano sintetizado por la cepa *P. parvulus* 2.6 en una bebida de avena, cuya ingestión produjo un descenso significativo en los niveles de colesterol en humanos. Además, la inclusión de BAL productoras de β -glucanos podría conferir a estos productos fermentados un aspecto viscoso en función de la interacción establecida entre el EPS y la matriz del alimento.

Por otra parte, la producción *in situ* de EPS por BAL durante la fermentación de pasta y pan parece ser una alternativa más natural a la adición de productos que mejoren la textura como los hidrocoloides. Los EPS sintetizados por BAL de tipo glucano como por ejemplo, el dextrano producido por cepas de las especies *L. mesenteroides* o *Weissella cibaria*, o bien fructanos como el levano sintetizado por *L. sanfranciscensis*, se han utilizado para estudiar la mejora de parámetros como la textura, humedad, volumen y retardo de su endurecimiento. El uso de los EPS de BAL es especialmente significativo en la mejora de la calidad de la textura de panes sin gluten. Otra ventaja que aportaría la inoculación de BAL en la producción de pan, especialmente con cepas lácticas homofermentativas productoras de EPS, sería el control del nivel de acetato, resultado del metabolismo de BAL heterofermentativas, que en cantidades controladas, mejoran el sabor y la estructura del pan, aunque la sobreproducción de acetato ejerce el efecto contrario, influyendo negativamente en el sabor.

En la elaboración de algunas bebidas alcohólicas se encuentran también las BAL que al utilizar distintos compuestos de los mostos, mejoran las características organolépticas de la bebida. De hecho las BAL disminuyen la acidez de éstos mediante la fermentación maloláctica que consiste en la transformación del ácido L-málico en un ácido más débil como el ácido L-láctico. Sin embargo, algunas cepas de BAL son capaces de provocar

alteraciones que disminuyen la calidad de la bebida como el ahilado. El ahilado o aceitado se debe al EPS sintetizado por ciertas cepas de BAL que al ser excretado a la bebida, aumenta la viscosidad de la misma. El ahilado constituye una de las principales alteraciones bacterianas que todavía ocurre ocasionalmente en vinos, cerveza y sidra natural. Esta alteración no implica ningún efecto sobre las características aromáticas de la bebida ni sobre la salud. Sin embargo, al aumentar los EPS la bebida se vuelve más viscosa, lo que provoca una sensación en boca de mayor untuosidad. Esta alteración sensorial hace que las bebidas sean rechazadas por el consumidor, causando pérdidas económicas cuantiosas en el sector de las bebidas alcohólicas. Las estirpes aisladas de bebidas ahiladas han sido identificadas como *Streptococcus mucilaginosus*, y diversas especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. En vinos, la especie más frecuentemente implicada es *P. parvulus*, si bien también han sido aisladas cepas de *O. oeni*. En sidras inglesas se ha relacionado esta alteración con el desarrollo de lactobacilos heterofermentativos como las especies *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus collinoides*, además de cocos pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus*. En la sidra natural vasca se han aislado cepas de *P. damnosus*, *P. parvulus* y *O. oeni* productoras de un β -glucano idéntico y diversas estirpes de *Lactobacillus*, algunas productoras del mismo β -glucano, pero principalmente de heteropolisacáridos.

Por otra parte, las BAL pueden alterar también productos cárnicos refrigerados y envasados al vacío. La alteración se reconoce por la presencia de limosidad o viscosidad en la superficie de las carnes, causada por los EPS sintetizados por algunas cepas de BAL al metabolizar los carbohidratos presentes en la superficie. En la mayoría de los productos cárnicos y las carnes se encuentran poblaciones pequeñas de BAL. Su crecimiento no siempre genera la alteración del producto, sin embargo, el incremento del crecimiento bacteriano puede provocar la producción de limos y otros cambios sensoriales como sabor ácido, mal olor, cambio de color y formación de gas. En los productos alterados, las estirpes con capacidad para sintetizar EPS que se han aislado más a menudo son de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. En la carne envasada al vacío y refrigerada, la composición de la atmósfera varía, lo que origina la inhibición del crecimiento de las bacterias aerobias y favorece la selección de bacterias capaces de crecer en presencia de CO₂ y a temperatura de refrigeración. Estas bacterias son principalmente ciertas estirpes de BAL de los géneros *Lactobacillus* (*L. sakei*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*) y *Carnobacterium*.

5D.4 CONTRIBUCIÓN DE LOS EXOPOLISACÁRIDOS A LA FUNCIONALIDAD DE LOS ALIMENTOS

En la actualidad, el mercado de los alimentos funcionales se caracteriza por su alto grado de innovación. Continuamente se están desarrollando nuevos ingredientes que

pueden aportar un beneficio extra para la salud, buscando la forma más adecuada de incluirlos en la dieta, ya sea como producto generado *in situ*, como ingrediente o como microorganismo vivo. En este contexto en los últimos años se está estudiando el efecto beneficioso de los EPS producidos por BAL, así como de las propias bacterias productoras, con el objeto de dilucidar su posible aplicación en la elaboración de alimentos funcionales.

En los siguientes sub-apartados se describen los resultados de estudios recientes que abordan distintos aspectos relacionados con el potencial prebiótico de los EPS o probiótico de las BAL productoras.

5D.4.1 Los exopolisacáridos como prebióticos

Los oligosacáridos, compuestos por polímeros de un único monosacárido como la fructosa (FOS, inulina), galactosa (GOS), manosa (MOS) y glucooligosacáridos (β -glucanos), o bien por polímeros mixtos como la lactulosa o el lactitol son los prototipos de compuestos prebióticos (ver detalles en el capítulo 5A de este libro). Además, los polisacáridos (HoPS y HePS) también se consideran prebióticos. La mayoría de los compuestos contemplados actualmente como prebióticos tienen masa molecular baja y aunque los EPS producidos por BAL presentan mayoritariamente masas moleculares altas, la composición química de algunos EPS es similar a la de prebióticos de menor tamaño, haciendo posible su fermentación por determinadas bacterias intestinales. El efecto prebiótico ejercido por polímeros de cadena larga y de cadena corta es distinto en cuanto a que los segundos se metabolizan rápidamente en el colon proximal, mientras que los carbohidratos de cadena larga son fermentados lentamente en la región más distal del colon. En consecuencia, es importante identificar tanto los prebióticos susceptibles de ser metabolizados como las cepas específicas que los fermentan, especialmente aquellas estirpes con potencial probiótico. La degradación biológica de los EPS bacterianos implica la existencia de bacterias que posean enzimas específicas con capacidad para hidrolizar estos biopolímeros y además, esta biodegradación parece depender de la estructura espacial y primaria de los biopolímeros. En la actualidad existe muy poca información sobre el potencial prebiótico de EPS bacterianos. Hasta el año 2009, tan sólo se había demostrado el efecto prebiótico de fructanos producidos por cepas de la especie *L. sanfranciscensis*. Estudios realizados por Salazar (2009) con bacterias aisladas del tracto digestivo mostraron que en presencia de los HePS producidos por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 y *B. longum* subsp. *longum* IPLA E44 (filogenéticamente distintas al grupo de las BAL) existían cambios relevantes de las poblaciones de algunas bacterias anaeróbicas intestinales, así como en la cantidad de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico. Tsuda y Miyamoto (2010) evaluaron el efecto prebiótico del EPS producido por la cepa mutante *L. plantarum* 301102S en comparación con los prebióticos GOS e inulina con 37 cepas de BAL de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*

y *Pediococcus*. La actividad prebiótica detectada con los dos compuestos prebióticos, utilizados como control, resultó ser baja, así como el efecto observado con el EPS sobre cinco de las cepas ensayadas. Sin embargo, la estirpe *L. plantarum* 301102 utilizó específicamente el EPS producido por la cepa mutante *L. plantarum* 301102S y mostró la actividad prebiótica más alta. *L. plantarum* 301102 fue aislada de queso elaborado de forma artesanal y se ha descrito su supervivencia y proliferación en el tracto gastrointestinal de cerdos tras su administración oral. Aunque son necesarios más estudios para determinar la acción prebiótica de este EPS en el tracto digestivo *in vivo*, el hecho de que esta cepa sea capaz de producir EPS en suero, es un ejemplo de las posibles aplicaciones industriales de las cepas productoras de dichos biopolímeros.

5D.4.2 Contribución de los exopolisacáridos al carácter probiótico y a la capacidad inmunomoduladora de las bacterias lácticas

Aunque no se conoce la función específica de estos polímeros, se considera que intervienen en la capacidad de adhesión bacteriana, en la formación de biopelículas y en la protección de la integridad celular en diferentes ambientes. Específicamente, en el caso de las BAL, la producción de EPS parece contribuir a su adaptación para colonizar sus múltiples nichos ecológicos: (i) desde entornos lácteos a bebidas alcohólicas y (ii) desde compuestos fermentables hasta entornos ambientales como el tracto digestivo o la mucosa vaginal. Así, esta contribución de los EPS a la capacidad de adaptación a distintos nichos ecológicos de las BAL parece estar implicado en su capacidad para ser organismos simbióticos, beneficiosos para el huésped y para sí mismos.

Como se ha descrito previamente, entre los efectos beneficiosos que se atribuyen a los EPS se encuentran la capacidad de reducir los niveles de colesterol sérico, así como de estimular el crecimiento de la microbiota intestinal. Pero además, por el hecho de encontrarse asociados a la superficie de las bacterias, pueden contribuir a su potencial como probióticos posibilitando el uso de éstas en la elaboración de alimentos funcionales.

La utilización de probióticos, tanto en alimentación como en clínica, requiere que cumplan las exigencias establecidas por los organismos oficiales competentes como son la FDA y la EFSA. En primer lugar, debe demostrarse que el microorganismo no es patógeno, no posee caracteres relacionados con virulencia o patogenicidad, no es resistente a antibióticos y, muy especialmente, se requiere evidencia científica mediante estudios rigurosos sobre las características beneficiosas que se le atribuyen. En este contexto en los últimos años se está estudiando el efecto beneficioso de los EPS sobre la capacidad de las BAL productoras para adaptarse y sobrevivir en el nicho ecológico del tracto digestivo después de su ingestión en alimentos.

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe presentar ciertas características relacionadas con su efecto beneficioso para la salud como por ejemplo, la capacidad de producir metabolitos o enzimas. También se puede seleccionar por su alta capacidad de adhesión a células epiteliales humanas que le permite competir con bacterias patógenas en la colonización del epitelio intestinal. Otras características deseables, que favorecen su función como probiótico son la resistencia a sales biliares y a jugos gástricos o la producción de compuestos antimicrobianos.

El microorganismo probiótico ha de ser capaz de resistir condiciones de estrés tanto tecnológicas como gastrointestinales. Por una parte, soportar el proceso de obtención del alimento funcional y su comercialización y, por otra, sobrevivir a las condiciones gastrointestinales después de la ingestión, como el estrés ácido y las sales biliares para así poder ejercer su función en el punto de destino. Stack (2010) demostraron que la expresión del gen *gtf* de *P. parvulus* 2.6, que codifica la GTF glicosiltransferasa en *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, la convierte en productora de (1,3)- β -D-glucano con ramificaciones (1,2). Como consecuencia, aumenta la resistencia de esta bacteria a las condiciones anteriormente mencionadas. Estos resultados ponen de manifiesto que la producción de este tipo de EPS en bacterias probióticas les confiere una protección frente a agentes externos.

La adhesión del probiótico a la mucosa gastrointestinal u otros epitelios favorece su colonización, dificultando el acceso de los patógenos y, por tanto, protegiendo al hospedador de la infección. La contribución del (1,3)- β -D-glucano con ramificaciones (1,2) en la capacidad de adhesión bacteriana ha sido extensamente analizada *in vitro* utilizando líneas celulares de epitelio intestinal humano. La adición del EPS purificado a cultivos de *L. plantarum* WCFS1 provoca un incremento de la capacidad de adhesión de esta bacteria probiótica (Russo, 2012). Los estudios realizados con estirpes isogénicas de *P. parvulus* productoras y no productoras, y la eliminación del EPS de la superficie bacteriana de *Pediococcus* y *Lactobacillus* productores, han mostrado que la presencia del EPS, incrementa también la capacidad de adhesión de las cepas productoras (revisado por Werning, 2012). Sin embargo, cabe resaltar que éste no es un efecto adscribible a todos los EPS, ya que la presencia de un EPS rico en galactosa en la superficie de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG disminuye su capacidad de adhesión.

Los EPS pueden constituir una barrera física en el epitelio que impida que se instalen los microorganismos patógenos. De hecho un estudio realizado con *Bifidobacterium breve* UCC2003, productora de EPS, y su cepa isogénica, puso de manifiesto la reducción de los niveles de colonización de *Citrobacter rodentium* (Fanning, 2012). Así mismo, la presencia de *Lactobacillus acidophilus* A4 demostró una reducción significativa en la formación de biopelículas por el patógeno enterohemorrágico *Escherichia coli* O157:H7. (Kim, 2009).

Algunas bacterias probióticas sintetizan EPS y son capaces de eliminar las especies de oxígeno reactivo (ROS) que se forman en el intestino por diversas reacciones metabólicas, por lo que exhiben actividades antioxidantes. Tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal, el estrés oxidativo juega un importante papel. El efecto de los EPS producidos por bacterias probióticas sobre el daño oxidativo producido en el intestino ha sido evaluado mediante sistemas modelo de ratas con colitis. Realizando un estudio comparativo entre dos cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, una gran productora de EPS (B3) y otra de bajo nivel de producción (A13), se observaron diferencias significativas entre ambas en lo que respecta a parámetros de estrés oxidativo, demostrando que el aumento de producción de EPS reduce el daño oxidativo y, por tanto, potencia la función probiótica de la cepa de mayor producción de EPS (Sengül, 2011).

Los inmunomoduladores pueden ser algunos fármacos, moléculas orgánicas, estructuras y productos del metabolismo secundario de las bacterias, entre otros, que tienen un efecto beneficioso sobre el sistema inmunológico reduciendo la tasa de inflamación de un tejido, bien por estimular la respuesta inmune, inmuno-estimulación, o bien por suprimir la respuesta, inmuno-supresión. La inmunomodulación es posible gracias a que el sistema inmune puede regularse tanto con moléculas exógenas como por moléculas endógenas, utilizando un sistema de reconocimiento mediado por la unión ligando-receptor. Este reconocimiento entre la molécula del ligando y su receptor desencadena una serie de reacciones en el interior de la célula que se traducen en la modulación de la transcripción génica.

Todavía no hay evidencias concluyentes de que los EPS sintetizados por BAL tengan propiedades inmunomoduladoras. Así, los EPS producidos por bacterias probióticas podrían intervenir en la modulación del sistema inmunológico del hospedador al interactuar con receptores específicos, bien estimulando una respuesta antiinflamatoria tras el contacto con el epitelio gastrointestinal, bien protegiendo al huésped de una respuesta inflamatoria.

En este sentido, los EPS además de ser reconocidos por receptores específicos y desencadenar una respuesta, pueden afectar al sistema inmune por medio de otros mecanismos. De hecho se ha propuesto que estas moléculas pueden competir con bacterias como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* o *Salmonella*, por el sitio de unión a los receptores de polisacáridos en las células inmunitarias, actuando como agentes anti-adhesivos impidiendo la unión de estos patógenos.

Recientemente se están estudiando nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes del intestino, que presentan una elevada prevalencia en los países desarrollados. En estas enfermedades está afectada la comunicación fisiológica entre las células del epitelio intestinal y las células del sistema

inmune, lo que resulta en una producción elevada de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o IL-12, y provoca el consiguiente proceso inflamatorio. Esta inflamación intestinal adquiere mayor relevancia en el momento en que se vuelve crónica, como sucede en la enfermedad de Crohn.

Hasta el momento los tratamientos utilizados para mejorar la sintomatología de dicha enfermedad han sido la administración de anti-inflamatorios o inmunosupresores. Sin embargo recientemente se está intentando modular el sistema inmune a nivel intestinal, utilizando probióticos y prebióticos, con el fin de aumentar la concentración de IL-10. Esta molécula es capaz de regular la inflamación, inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, y además, está implicada en la respuesta humoral, estimulando la secreción de inmunoglobulinas G, M y A, por parte de linfocitos B. En estudios recientes realizados por Ming-Hsiu (2010) utilizando un modelo *in vivo* de mutantes deficientes en la producción de IL-10, se detectó un incremento del desarrollo de enfermedades intestinales. Así mismo, en dicho trabajo, mediante ensayos *in vitro*, se comprobó que el EPS producido por la cepa de *B. longum* BCRC 14634, aumentaba la proliferación de macrófagos y la producción de IL-10 mostrando un efecto inmunomodulador, lo cual podría favorecer la disminución de infecciones gastrointestinales siendo responsable el biopolímero.

En relación a la respuesta inflamatoria, en un estudio comparativo, realizado con la estirpe *P. parvulus* productora de (1,3)- β -D-glucano con ramificaciones (1,2) y con estirpes mutantes no productoras, se ha detectado que la presencia del EPS disminuye la respuesta proinflamatoria de macrófagos humanos expuestos a esta cepa (revisado por Werning, 2012).

Finalmente, en diversos estudios se han descrito otro tipo de efectos beneficiosos para la salud relacionados con los EPS. Entre ellos cabe destacar los realizados en modelos *in vitro* de epitelio intestinal humano que sugieren un posible efecto antitumoral de los EPS producidos por las BAL. Además, recientemente se ha demostrado en un modelo murino que el EPS producido por una cepa de *L. rhamnosus* inhibe la producción de autoanticuerpos artritogénicos lo que se manifiesta suprimiendo la artritis inducida por colágeno (CIA). Se trata de unos resultados que, aunque tienen que ser validados en pacientes humanos, revelan una potencial aplicación de los EPS en el desarrollo de alimentos funcionales con una función específica para prevenir enfermedades (Nowak, 2012).

5D.5 CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas hasta el momento han revelado que los EPS sintetizados por BAL tienen interés en la industria alimentaria como espesantes, gelificantes y como

mejorantes de la textura, sobre todo de productos lácteos. Ya que la producción natural de estos biopolímeros no es cuantitativamente demasiado elevada, su aplicación requiere de la síntesis *in situ* del EPS por BAL incluidas en los alimentos. De esta forma, los polímeros no se añaden como aditivos extras, evitando elevar los costes económicos, y además, los productos finales que contienen EPS no tienen un mayor contenido en grasa, ni hidrocoloides añadidos, y presentan la textura deseada por el consumidor.

Además del interés de los EPS producidos por BAL en la industria alimentaria, existe un potencial interés para la industria farmacéutica principalmente por su relación con los posibles beneficios en la salud. En el pasado, se creía que la activación del sistema inmune y de la respuesta adaptativa era debida exclusivamente a proteínas que funcionaban como antígenos, y que las bacterias habían desarrollado la cápsula para eludir este reconocimiento antigénico. Sin embargo, hoy en día, se sabe que los polisacáridos bacterianos también pueden activar la respuesta inmunitaria lo que los convierte en candidatos como nuevas dianas para la regulación del sistema inmune.

Finalmente, a pesar de que son necesarios más estudios relacionados con la posible utilización de los EPS como sustratos fermentables para las bacterias intestinales, y teniendo muy en cuenta su estructura química y su funcionalidad, es evidente que dichos EPS producidos por BAL, podrían ofrecer un valor añadido a los productos que los incluyeran, gracias a su efecto prebiótico lo que les permitiría competir en un mercado cada vez más potente.

REFERENCIAS

1. Anastasio, M., Pepe, O., Cirillo, T., Palomba, S., Blaiotta, G., y Villani, F. (2010) Selection and use of phytate-degrading LAB to improve cereal-based products by mineral solubilization during dough fermentation. *J. Food Sci.* 75:28-35.
2. Badel, S., Bernardi, T. y Michaud, P. (2011) New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotech. Advan.* 29:54-66.
3. Capozzi, V., Russo, P., Dueñas, M.T., López, P. y Spano, G. (2012) Lactic Acid Bacteria producing β -group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s00253-012-4440-2.
4. Fanning, S., Hall, L.J. y van Sinderen D. (2012) *Bifidobacterium breve* UCC2003 surface exopolysaccharide production is a beneficial trait mediating commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Gut Microbes.* 3:420-425.
5. Kim, Y., Oh, S. y Kim, S.H. (2009) Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379:324-329.
6. Korakli, M. y Vogel, R.F. (2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycansucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:790-803.
7. Ming-Hsiu, W., Pan T.-M., Wu Y.-J., Chang, S.-J, Ming-Song, Chang, M.-S. y Hu C.-Y. (2010) Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. *Int. J. Food Microbiol.* 144:104-110.
8. Mozzi, F., Vaningelgem, Hérbet, E.M., van der Meulen, R. Foulquié-Moreno, M.R., Font de Valdez, G. y de Vuyst, L. (2006) Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4431-4435.
9. Nowak, B., Cizek-Lenda, M., Sróttek, M., Gamian, A., Kontny, E., Górská-Frażczek, S. y Marcinkiewicz, J. (2012) *Lactobacillus rhamnosus* exopolysaccharide ameliorates arthritis induced by the systemic injection of collagen and lipopolysaccharide in DBA/1 mice. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 60:211-220.
10. Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Kolida, S., Collins, M., Rastall, R., Gibson, G. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2009) Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 135:260-267.
11. Sengül, N., Işık, S., Aslım, B., Uçar, G. y Demirbağ, A.E. (2011) The effect of exopolysaccharide-producing probiotic strains on gut oxidative damage in experimental colitis. *Dig. Dis. Sci.* 56:707-714.

12. Russo, P., López, P., Capozzi, V., Fernández de Palencia, P., Dueñas, M.T., Spano, G. y Fiocco, D. (2012). Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *Int. J. Mol. Sci.* 13:6026-6039.
13. Stack, H.M., Kearney, N., Stanton, C., Gerald F. Fitzgerald, G.F. y Ross, R.P. (2010). Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 6:500–507.
14. Tsuda, H. y Miyamoto, T. (2010) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Sci. Technol. Res.* 16: 87-92.
15. Werning, M.L., Notararigo, S., Nácher, M., Fernández de Palencia, P., Aznar, R. y Lopez, P. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Chapter 5 In: *Food additives*. pp. 83-114. El-Samragy, Y. (Ed.). Intech. Croacia.
16. Zannini, E., Pontonio, E., Waters, D.M., y Arendt, E.K. (2012) Applications of microbial fermentations for production of gluten-free products and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:473-485.