

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

USO DE PROBIÓTICOS Y APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA: IMPACTO EN LA SALUD INTESTINAL HUMANA Y EN LA PRODUCTIVIDAD ANIMAL

Mazieres, Magdalena Inés – LU 1080922

Ingeniería en Alimentos

Mg. Darduin, Ana Laura



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Mayo, 2023

Resumen

El intestino humano alberga millones de microorganismos, denominados microbiota. Su función impacta en todos los procesos fisiológicos, desde la digestión, hasta la producción de neurotransmisores, afectando la salud en su total, tanto física como emocional.

Los probióticos son microorganismos que, consumidos en cantidades suficientes, ejercen un efecto sobre la microbiota nativa, derivando en beneficios para la salud del huésped. Sus efectos pueden ser la producción de metabolitos, inhibición de crecimiento de bacterias patógenas y disminución de la permeabilidad intestinal. Cada cepa puede relacionarse con cada efecto en particular.

Además de encontrarse nativamente en el organismo, estos microorganismos pueden incorporarse a través de la dieta. Son conocidos comúnmente por su presencia en lácteos y productos fermentados, y su consumo siempre fue relacionado directamente con beneficios a la salud.

La población cambia constantemente, y así también sus necesidades y preferencias. Actualmente el consumo de alimentos de origen vegetal se encuentra en aumento. A su vez, es cada vez más relevante el impacto de la alimentación en la salud.

La tecnología aplicada al desarrollo de productos funcionales logró la aplicación de cepas de probióticos sin necesidad de refrigeración, que pueden mantenerse viables durante largos períodos de vida útil. Mediante el uso de procesos como la liofilización, microencapsulación y la deshidratación, la propuesta de productos con agregado de probióticos es cada vez más amplia y creativa. Mientras que mundialmente este mercado es muy amplio, en Argentina sigue siendo reducido, pero con un futuro muy prometedor.

Más allá de pensar en el consumo directo de probióticos, es interesante analizar el efecto de los mismos cuando son consumidos por los primeros eslabones de la cadena productiva, en este caso, por aves reproductoras padres. El reemplazo de antibióticos para paliar enfermedades, por el consumo de probióticos para mejorar preventivamente la salud de los animales podría beneficiar también a los consumidores finales.

Abstract

The human intestine is home to millions of microorganisms, which are called the microbiota. Its function impacts all the physiological processes, from digestion to the production of neurotransmitters, affecting overall health, both physical and emotional.

Probiotics are microorganisms that, consumed in sufficient quantities, have an effect on native microbiota, resulting in health benefits for the host. Its effects can be the production of metabolites, the inhibition of growth of pathogenic bacteria, or the decreasing of intestinal permeability. Different strains can be related to each particular effect.

Besides being found natively in the human body, these microorganisms can be incorporated through the diet. They are commonly known for their presence in dairy and fermented products, and their consumption has always been directly related to health benefits.

The population is constantly changing, and so are their needs and preferences. Currently the consumption of plant-based foods is on the rise. In turn, the impact of diet on health is increasingly relevant.

Technology applied to the development of functional products has managed to apply probiotic strains without the need for refrigeration, which can remain viable for long periods of shelf life. The offer of products with added probiotics is becoming broader and more creative through the use of processes such as freeze-drying, microencapsulation and dehydration. While this market is very broad worldwide, in Argentina it is still small, though with a very promising future.

Beyond considering the direct consumption of probiotics, it is interesting to analyze their effect when they are consumed by the first links in the production chain, in this case, by parent breeding birds. Replacing antibiotics as a means to diminish diseases with the consumption of probiotics to preventively improve the health of animals could also benefit end consumers.

Contenidos

1. Introducción.....	7
1.1. Objetivos	7
1.2. Relevancia	7
1.3. Estructura del trabajo	8
2. Hipótesis.....	9
3. Marco teórico	10
3.1. Alimentos fermentados	10
3.1.1. Historia	10
3.1.2. Efectos de la fermentación	11
3.2. Alimentos funcionales.....	13
3.2.1. Breve historia	13
3.2.2. Definición.....	13
3.3. Probióticos	14
3.3.1. Historia	14
3.3.2. Actualidad	15
3.4. Microbiota y microbioma.....	16
3.4.1. Mecanismos de acción de los probióticos	18
3.5. Probióticos en la salud	19
3.5.1. Salud metabólica	21
3.5.2. Salud dermatológica.....	21
3.6. Regulación.....	22
3.6.1. Probióticos naturales	23
3.7. Industria.....	26
3.7.1. Desarrollo de productos	26
3.7.2. Aspectos que afectan la viabilidad en el alimento	27
3.7.2.1. Factores internos.....	27
a) Factores químicos.....	27
b) Presencia de oxígeno.....	27
c) Matrices lácteas	28

d) Matrices con bajos niveles de actividad acuosa	28
3.7.2.2. Factores externos	28
a) Envasado	28
3.7.3. Formulación	29
3.7.4. Aplicación	29
3.7.4.1. Deshidratación	29
3.7.4.2. Microencapsulación	32
3.7.4.3. Liofilización	33
3.7.4.4. Secado por spray	33
3.7.4.5. Secado al vacío	34
3.7.4.6. Emulsificación	34
3.8. Cepas comerciales	35
3.8.1. Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12®	35
3.8.2. Ganeden BC ³⁰	36
3.9. Matrices de aplicación de alta humedad	37
3.9.1. Matrices lácteas	37
3.9.2. Productos frutales	37
3.10. Matrices de aplicación de baja humedad	39
3.10.1. Productos en polvo	39
3.10.2. Pasta de maní	39
3.10.3. Chocolate	40
3.10.4. Barras de cereal	40
3.10.5. Papas fritas	41
3.11. Consumo de productos con probióticos	41
3.12. Mercado en Argentina	42
3.13. Mercado internacional	46
3.14. Probióticos de nueva generación	48
3.15. Prebióticos	49
3.16. Posbióticos y paraprobióticos	50
4. Metodología	52

4.1. Desarrollo de un producto innovador	52
4.1.1. Formulación y proceso	54
4.1.1.1. Elección de cepa probiótica.....	54
4.1.1.2. Proceso de elaboración.....	56
4.1.1.3. Detalle del proceso	57
4.1.1.4. Formulación:	58
4.1.2. Marco legal.....	59
4.1.3. Información nutricional:.....	60
4.2. Administración de probióticos en aves reproductoras padres	61
4.2.1. BioPlus 2B	61
4.2.2. Antecedentes de uso del BioPlus 2B.....	61
4.2.3. Antecedentes en otras especies	62
4.2.4. Toma de muestras	62
4.2.5. Análisis de resultados.....	63
5. Prospectiva	66
6. Conclusión.....	67
7. Bibliografía.....	68

1. Introducción

1.1. Objetivos

El objetivo de este trabajo consiste en presentar una profunda y actualizada investigación bibliográfica acerca de un tema de creciente relevancia en el mercado de los alimentos.

Exponer los beneficios de los probióticos sobre la salud humana, considerando su influencia sobre el sistema inmune, neurológico y dermatológico, con el fin de establecer la importancia que representa el desarrollo de nuevos productos en el mercado.

Presentar el estado de arte actualizado de la industria alimenticia en torno a las nuevas tendencias con respecto a los probióticos. Esto incluye nuevas tecnologías y nuevos desafíos en cuanto a desarrollos.

Presentar el desarrollo de un producto innovador en el mercado argentino, que pueda ser un disparador tanto de nuevos productos, como de un nuevo mercado, como el de las golosinas funcionales, todavía inexistente en el país.

Seleccionar la información más actualizada de la totalidad disponible, de manera tal de servir como fuente de consulta con respecto al tema.

Presentar la información seleccionada de forma minuciosa, concatenada de manera ordenada en diversos temas, para explorar como se relacionan entre ellos.

Extrapolar los conocimientos adquiridos y la información disponible al uso de probióticos en las granjas de aves reproductoras padres a grandes escalas. Esto podría implicar el reemplazo del uso de antibióticos indiscriminados, por la administración de probióticos, haciendo hincapié en la salud de los animales, y abordando el tema desde los inicios de la cadena productiva.

1.2. Relevancia

El conocimiento sobre los probióticos se encuentra en constante aumento. A lo largo de unos años, el concepto se ha ido instaurando en el consumidor promedio. A pesar de no poseer gran información acerca del tema, el término se relaciona automáticamente con la salud, y ya es considerado un factor deseado al momento de la elección de un producto. En las

góndolas ya pueden encontrarse estos productos con claims nutricionales como “contiene probióticos” o “fuente de probióticos”. Este es el claro ejemplo de la fuerza del consumidor sobre la industria, que debe adaptarse constantemente para satisfacer las necesidades de una población que busca alimentos cada vez más saludables.

La relevancia del tema recae en el futuro hacia el cual tiende la industria. Con consumidores cada vez más informados y más interesados en el consumo de alimentos saludables, la aplicación de probióticos en productos industrializados se presenta como una respuesta para esta creciente demanda.

1.3. Estructura del trabajo

El trabajo se conforma de la siguiente manera: Se presenta la definición de probióticos y su presencia de forma natural en los alimentos y los antecedentes históricos. Se exponen los beneficios comprobados sobre la salud;

Se realiza una profunda investigación actualizada acerca de las metodologías de aplicación en la industria, así como el estudio del mercado mundial y nacional, presentando también las nuevas tendencias;

Finalmente, se propone la aplicación de probióticos en golosinas, como presentación de una propuesta disruptiva en el mercado argentino.

Seguido de esto, la evaluación de la utilización de probióticos en granjas avícolas como propuesta de reemplazo al uso de antibióticos como promotores de crecimiento, y logrando así una producción más limpia. El concepto es interesante al momento de introducir los probióticos en el primer eslabón de la cadena productiva.

2. Hipótesis

El consumo de alimentos con probióticos se encuentra en constante aumento, lo cual provoca indefectiblemente, cambios en el mercado.

La presión que ejercen los consumidores es cada vez mayor, y condiciona el curso de la industria, que deben actualizarse constantemente para mantenerse competitiva.

Los efectos beneficiosos del consumo de probióticos son conocidos desde cientos de años, sabiendo saludables a los alimentos fermentados, y todos aquellos que involucraran microorganismos vivos al momento de su consumo.

La aplicación de probióticos en matrices lácteas es la única conocida en Argentina, en un mercado todavía pequeño. Sin embargo, mundialmente se encuentra muy avanzado.

Conocer el estado de los productos con probióticos a nivel mundial es una manera de desafiar el mercado nacional, y abrir nuevas posibilidades.

Debido a esto, en un panorama donde se cuestiona cada vez más el rol de la industria, es de suma importancia saber satisfacer esas necesidades y afrontar desarrollos que puedan ser funcionales a lo que pide la población.

La aplicación de antibióticos como promotores de crecimiento en granjas de aves reproductoras padres puede ser reemplazada por la administración de probióticos. De esta manera puede mejorarse la crítica situación de resistencia a los antibióticos en el ámbito de la salud, y al mismo tiempo mejorar la salud tanto de los animales como de los consumidores.

3. Marco teórico

3.1. Alimentos fermentados

3.1.1. Historia

Los alimentos fermentados se definen como alimentos producidos a partir del crecimiento microbiano controlado y la conversión de componentes mediante acción enzimática (Dimidi *et al.*, 2019). Se diferencia de la putrefacción, ya que esta implica la multiplicación de microorganismos no deseados que alteran las características organolépticas y la inocuidad del alimento. (Vinderola, 2019)

La presencia de microorganismos fermentativos en el alimento puede ser nativa, como en el caso del chucrut (repollo fermentado), el vino, el miso (soja fermentada) y la masa madre. También pueden ser añadidos, como el caso de los lácteos fermentados (yogurt y queso), cerveza o pan.

El consumo de alimentos fermentados se remonta a 11700-9700 años a.C. Se cree que grupos de cazadores-recolectores ya elaboraban cerveza a partir de la fermentación de cereales silvestres.

A lo largo de la historia, los egipcios hacían pan rutinariamente a partir de trigo fermentado. Para ello utilizaban la masa madre, una porción de harina fermentada con las levaduras presentes en la misma, para la elaboración del pan del día siguiente.

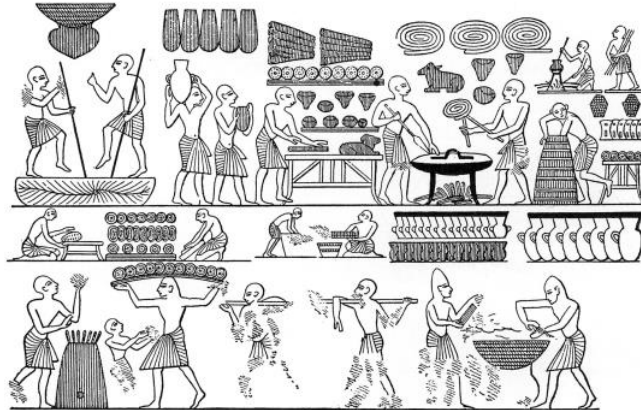


Figura 1: Pinturas halladas en la tumba de Ramsés III, que demuestran la elaboración de pan en tiempos antiguos. Fuente: Panificación, biotecnología nuestra de cada día. <https://unabiologaenlacocina.wordpress.com>

Otros pueblos, en diversos lugares geográficos, comenzaron la fermentación de la leche. Se cree que esto se produjo de manera simultánea, y a su vez, con leche proveniente de diferentes animales, como vaca, oveja, búfala o cabra. En ese entonces se utilizaban estómagos de animales como fuente de las bacterias fermentativas (Vinderola, 2019). En estas épocas, la fermentación se realizaba con el objetivo de la conservación del sabor durante un tiempo prolongado.

Antiguamente, los alimentos fermentados ocupaban un espacio místico en la cultura, ya que sufrían modificaciones organolépticas, pero nadie sabía realmente lo que pasaba con ellos.

3.1.2. Efectos de la fermentación

La fermentación produce cambios organolépticos deseables, como el desarrollo de aroma y acidez, y alcohol en el caso de las bebidas. Puede controlarse proveyendo las condiciones ideales para que esto suceda, como el manejo del tiempo y temperatura, el agregado de cultivos que inicien la fermentación, o sales que la controlen.

Este proceso implica a su vez, cambios en las propiedades nutricionales de los alimentos. La acción de las bacterias puede transformar compuestos en sus componentes activos, como también eliminar compuestos indeseados o anti nutrientes, aumentar las vitaminas, ácidos grasos y aminoácidos disponibles, y mejorar su digestibilidad.

Los anti nutrientes con compuestos que protegen los granos de cereales y semillas, pero su consumo puede producir problemas nutricionales en el ser humano, como la interferencia en la absorción de otros nutrientes. En el caso del ácido fítico, este se encuentra en concentraciones del 1-2%, y forman quelatos insolubles con diversos minerales esenciales, como calcio, hierro, magnesio y zinc (Frontela *et al.*, 2008). La reducción de los niveles de pH del medio, producto de la fermentación, logra la remoción del ácido fítico en los cereales.

La fermentación de polisacáridos en productos como la masa madre, mejora su tolerancia en individuos con problemas digestivos.

En el caso de los quesos y yogures, lo mismo sucede con la lactosa, que al ser hidrolizada posibilita su consumo a intolerantes a la misma.

En otros casos, pueden producirse compuestos nuevos como el ácido láctico. Se ha encontrado relación con una respuesta moduladora del sistema inmune, mediante la reducción de citoquinas proinflamatorias. A su vez, la producción de vitaminas de grupo B y proteínas secretadas en la fermentación. Estas últimas han demostrado funciones antioxidantes y también protectoras, evitando la adhesión de microorganismos patógenos a la mucosa intestinal (Marco *et al.*, 2017)

Diversos estudios han demostrado los beneficios en la salud relacionados con el consumo de alimentos fermentados, como la reducción de riesgos de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad, reducción de niveles de glucosa en sangre y mejoras en otras patologías como artritis y esclerosis. En los últimos años, el consumo se ha incrementado debido al creciente conocimiento de sus potenciales efectos sobre la salud.

A pesar de colonizar el intestino temporalmente, la exposición de nuevas bacterias brinda grandes beneficios, especialmente en poblaciones donde los hábitos dietarios implican alto consumo de alimentos procesados. Combinado con altos niveles de higiene reduce la variedad de la microbiota, debilitando el desarrollo de la misma.

3.2. Alimentos funcionales

3.2.1. Breve historia

El término se originó en Japón, cuando ante los altos gastos sanitarios destinados a la población mayor debido a su longevidad, el gobierno determinó que debía garantizarse una mejora en la calidad de vida. Con esta finalidad, se desarrollaron productos alimenticios que redujeran el riesgo de enfermedades y mejoraran la salud. Surgió de esta manera el término FOSHU, de sus siglas en inglés, Foods for Specified Health Uses. Son definidos como *“aquellos alimentos de los que se espera que ejerzan un efecto específico sobre la salud, por adición de determinados constituyentes activos, por un efecto derivado de la supresión de los mismos alérgenos alimentarios”*. Japón fue el primer país en legislar este grupo de alimentos. (Valenzuela *et al.*, 2014)

3.2.2. Definición

Actualmente no existe una definición consensuada acerca de estos productos. La dificultad se centra en la diversidad de ingredientes y los efectos que puede conllevar cada uno de ellos en cada organismo en particular. En adición, los efectos pueden verse modificados por la interacción con otros ingredientes, otros alimentos o el propio organismo.

Según el ILSI Europa (International Life Sciences Institute), pueden definirse como alimentos consumidos como parte de la dieta y que más allá de su carácter nutricional tienen efectos relevantes favoreciendo el estado de salud y bienestar, o una reducción del riesgo de una enfermedad.

Cabe destacar que es indispensable que sean alimentos, y no tan sólo compuestos bioactivos encapsulados, lo que se conoce como nutraceuticos.

Un alimento funcional debe cumplir los siguientes requisitos:

- Debe presentarse en forma de alimento, no un suplemento dietario o nutraceuticos,
- Debe formar parte de la dieta habitual,
- Debe aportar propiedades nutritivas y beneficiosas para el organismo,

- Debe poder demostrarse sus efectos beneficiosos dentro de las cantidades que se consumen normalmente en la dieta.

Los componentes benéficos en los alimentos funcionales son componentes naturales, es decir, se encuentran en la naturaleza. No así los alimentos funcionales en sí, ya que puede tratarse de alimentos naturales o procesados. Estos últimos pueden sufrir modificaciones como adición, sustitución o eliminación de componentes, modificaciones en la biodisponibilidad de alguno de sus componentes.

El aumento del consumo e interés por este grupo de alimentos puede basarse en amplias razones, como ser: el conocimiento de la relación e impacto de la alimentación en la salud, el aumento de la longevidad, el incremento de las enfermedades crónicas, el deseo de una vejez saludable, la prevención de enfermedades y/o nuevas tecnologías aplicadas a la industria alimentaria (Beltrán de Heredia, 2016). Existe en la población un creciente deseo de vivir más, pero asegurando una buena calidad de vida.

Los alimentos funcionales pueden clasificarse según las funciones que cumplen en el organismo. (Beltrán de Heredia, 2016). Estas pueden ser:

- Crecimiento, desarrollo: Aporte de nutrientes desde la etapa del embarazo hasta los primeros años de vida.
- Regulación del metabolismo
- Defensa contra el estrés oxidativo
- Soporte al Sistema cardiovascular
- Mejora de la salud del tracto gastrointestinal

3.3.Probióticos

3.3.1. Historia

Hace más de un siglo, Ilya Ilyich Metchnikoff recibió el Premio Nobel de Medicina en 1908 tras descubrir el mecanismo de acción de la leche fermentada y sus beneficios. Sugirió que la longevidad de la población búlgara era consecuencia del consumo de leche agria. La leche agria es un producto obtenido de la fermentación de bacterias presentes

naturalmente en la leche cruda. Metchnikoff postuló que la modificación de la microbiota intestinal podría tener beneficios sobre la salud a través del consumo de bacterias benéficas encontradas productos lácteos fermentados, como la leche agria o el yogurt.

En 1965 Lilly y Stilwell mencionaron por primera vez el término “probiótico”, para referirse a “sustancias secretadas por un organismo que estimulan el crecimiento de otro”.

Parker propuso en 1974 el concepto utilizado actualmente, definiendo los probióticos como “organismos vivos que contribuyen al balance microbiano intestinal”.

Las cepas probióticas utilizadas incluyen principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Bifidobacterium*, y hongos del género *Saccharomyces*.

3.3.2. Actualidad

La International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics los define como “*microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio saludable al hospedador*”. Para que puedan llamarse bacterias probióticas, estos microorganismos deben estar vivos en el momento de su consumo. La dosis debe ser suficientemente alta (10^6 - 10^9 células vivas por día) para que tengan efecto, y debe existir un efecto fisiológico beneficioso demostrado.

La variabilidad de los probióticos se basa en las cepas utilizadas, la composición administrada, la sinergia entre cepas y la interacción con las matrices y la dieta.

Antiguamente, se consideraba la salud sólo cuando el sistema inmune poseía capacidad para controlar patógenos. Esto puede darse mediante la reducción del número de patógenos (a través del uso de antibióticos), o mejorando la capacidad del sistema inmunológico con la aplicación de vacunas.

El uso de probióticos en la actualidad se enfoca en reducir las bacterias patógenas mediante el incremento de bacterias benéficas, promover el crecimiento (en gran medida debido a la reducción de patógenos), y mejorar la biodisponibilidad de nutrientes. Esto implica la cantidad de nutrientes que llegan al torrente sanguíneo desde el tracto gastrointestinal, es decir, lo que es realmente absorbido por el organismo.

3.4. Microbiota y microbioma

La microbiota intestinal (MBTi) comienza su desarrollo ya en el vientre materno. Los primeros 1000 días de vida son críticos para el desarrollo de la misma, ya que los bebés sufren cambios en los órganos, especialmente en el tracto gastrointestinal. La microbiota se ve afectada por el parto, la lactancia, y la incorporación de alimentos. Las características adquiridas en estos momentos se conservan durante toda la vida, sentando las bases para su desarrollo y la respuesta a los estímulos ambientales. Es importante aclarar que la microbiota se modifica con el tiempo, por lo que estas características implican la predisposición de su composición, pero no son determinantes.

La mayor colonización sucede al momento del parto. Por eso, el paso por el canal del parto condiciona este evento, que determina la cantidad y características de las bacterias iniciales. En el caso de los nacimientos por cesárea, esta exposición inicial se ve reducida. La siguiente colonización sucede en la etapa de la lactancia.

La leche materna es otra vía de colonización. Se han encontrado coincidencias en bacterias específicas tanto en el intestino y leche maternos, y el intestino del bebé. Por lo mencionado, la salud de la madre durante el embarazo, así como otros factores externos como el estrés y el uso de antibióticos pueden condicionar la calidad de la carga microbiana que recibirá luego el bebé.

La incorporación de alimentos luego del destete es el siguiente factor que afecta la composición de la microbiota. Una dieta basada en vegetales seleccionará a un grupo de microorganismos distinto que una dieta alta en proteínas y grasas animales. La dieta y la ubicación geográfica determinan los alimentos y los nutrientes que promueven el desarrollo de determinados grupos de bacterias.

La combinación de estos factores determina la maduración y evolución de la microbiota intestinal en estado de eubiosis o disbiosis. La presencia de mascotas y hermanos favorece a la diversidad de bacterias de manera beneficiosa, así como atenta contra ello el exceso de higiene en el hogar, ya que no se presentan los estímulos necesarios para el desarrollo de una inmunidad completa.

La microbiota responde activamente a los cambios endógenos y exógenos, manteniendo una relación bidireccional con el huésped. El microbioma es el conjunto de genomas de la microbiota. Este posee más de 10 millones de genes externos que aportan funciones que no están codificadas en el genoma del huésped. Así como la variedad y cantidad de microorganismos se ve modificada por los hábitos y factores ambientales, la dieta, el ejercicio, la exposición a la naturaleza o el consumo de antibióticos, el ecosistema presente en el intestino puede modificar al huésped, afectando directamente su salud. Es esta la razón por la cual la disbiosis intestinal es causante de muchas enfermedades.

A pesar de las diferencias individuales, la composición central de la microbiota es similar. Se han propuesto 3 enterotipos, según la predominancia de las bacterias, determinados principalmente por el tipo de dieta, el espacio geográfico y la situación socioeconómica y cultural de la población. El enterotipo 1, caracterizado por el género *Bacteroides*, se ve favorecido en una dieta rica en proteínas y grasas. El enterotipo 2, con predominancia del género *Prevotella*, con una dieta rica en hidratos de carbono. El enterotipo 3, se caracteriza por el género *Ruminococcus*, y es el más común en la población. (Robles-Alonso y Guarner, 2013)

La microbiota intestinal favorece el desarrollo del intestino, mejorando la superficie intestinal, mayor grosor en las vellosidades, mejorando la absorción, el metabolismo del ácidos biliares y colesterol y la respuesta a las infecciones. Sobre la mucosa epitelial del intestino, la microbiota compete por nutrientes y espacio, evitando su adhesión mediante el fenómeno de exclusión competitiva.

Se denomina eje intestino-cerebro a la comunicación bidireccional entre el tracto gastrointestinal y el SNC. Esta relación está mediada por los niveles del neurotransmisor serotonina. Se cree que el 95% de la serotonina total se encuentra a nivel intestinal, y su disponibilidad se debe a la microbiota.

Una microbiota sana contribuye a un buen estado de salud del huésped, así como un estilo de vida saludable contribuye a una microbiota sana.

El uso indiscriminado de antibióticos, la alta tasa de nacimiento por cesárea, la excesiva limpieza, la pobre alimentación de los niños, el consumo excesivo de productos procesados deriva en una reducción de la diversidad de la microbiota. Esto se ve reflejado en las patologías como problemas gastrointestinales, enfermedades metabólicas o cardiovasculares.

3.4.1. Mecanismos de acción de los probióticos

Los efectos de los probióticos pueden darse por diversos factores:

1. Estimulación del sistema inmune (innato y adaptativo)
2. Incremento de la diversidad de la microbiota
3. Inhibición directa de patógenos
4. Producción enzimática
5. Por diferenciación de células caliciformes (incremento de eficacia de la capa mucosa)
6. Salud endocrinológica
7. Salud neurológica

Según Blajman *et al.*, existen 3 mecanismos de acción de los probióticos:

1. Exclusión competitiva: Es la competencia de las bacterias probióticas con las patógenas por los nutrientes y la adhesión al epitelio intestinal, lo que produce el desplazamiento de las bacterias patógenas.
2. Producción de sustancias antimicrobianas: algunos metabolitos de las bacterias probióticas, como son diacetilo, bacteriocinas y ácidos orgánicos podrían inhibir el desarrollo de patógenos en el intestino. La producción de ácido láctico, ácido propiónico y ácido acético por parte de las bacterias probióticas modifican la acidez del medio, creando un ambiente poco favorable para el desarrollo de microorganismos patógenos, que viven en pH entre 5,5 y 7,5. Se observó que los tractos intestinales inoculados con *Lactobacillus* tenían niveles de pH más bajos.

- Estimulación de la inmunidad: los probióticos favorecen la generación de macrófagos, lo que aumenta la capacidad de fagocitar células muertas. También pueden aumentar la cantidad de anticuerpos en respuesta a determinados antígenos (Blajman *et al.*, 2015).

Cabe aclarar que los mecanismos de acción varían tanto en tipo de mecanismo como de intensidad según las cepas de microorganismos involucrados.

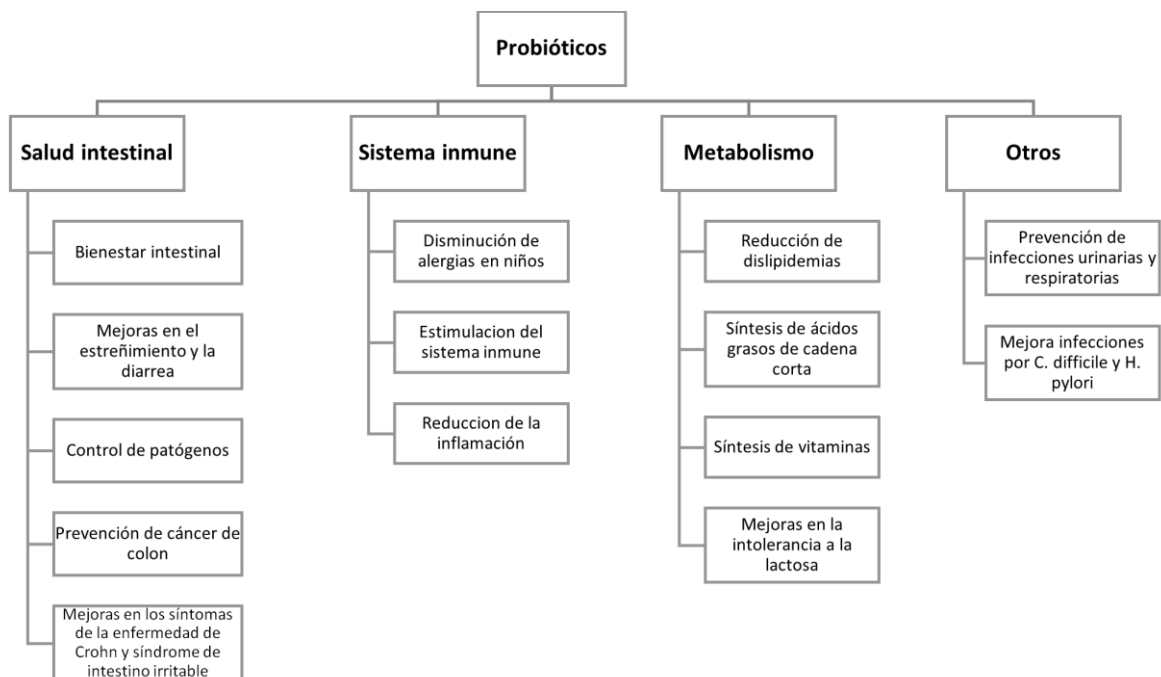


Figura 2. Beneficios en la salud por el consumo de probióticos.

Fuente: Castillo Escandón *et al.* (2019)

3.5. Probióticos en la salud

Se define la disbiosis como la alteración de la composición de la microbiota intestinal (Petersen & Round, 2014). La microbiota puede verse afectada por la genética, el consumo de antibióticos, estilo de vida, la dieta, y por lo tanto, también por el consumo de probióticos (Kim *et al.*, 2019).

La disbiosis puede clasificarse según varias causas, no excluyentes entre sí. Puede darse por pérdida de bacterias benéficas, causado por tratamiento con antibióticos. A su vez puede ser causada por el aumento de las bacterias patógenas. Estos microorganismos,

potencialmente patógenos, se encuentran en el intestino en bajos niveles, sin embargo, en casos donde la microbiota se ve reducida, como tras el uso de antibióticos, puede desencadenarse la colonización y desarrollo de alguna enfermedad. La tercera causa de disbiosis es la pérdida de la diversidad de la microbiota, la cual es indispensable para las interacciones simbióticas entre especies presentes, para potenciar los efectos benéficos sobre la salud.

Se ha comprobado que un equilibrio en la microbiota implica un beneficio para la salud (Satokari, 2019). Es indispensable tanto el equilibrio como la diversidad de la microbiota para potenciar los efectos beneficios sobre la salud del huésped (Petersen & Round, 2014).

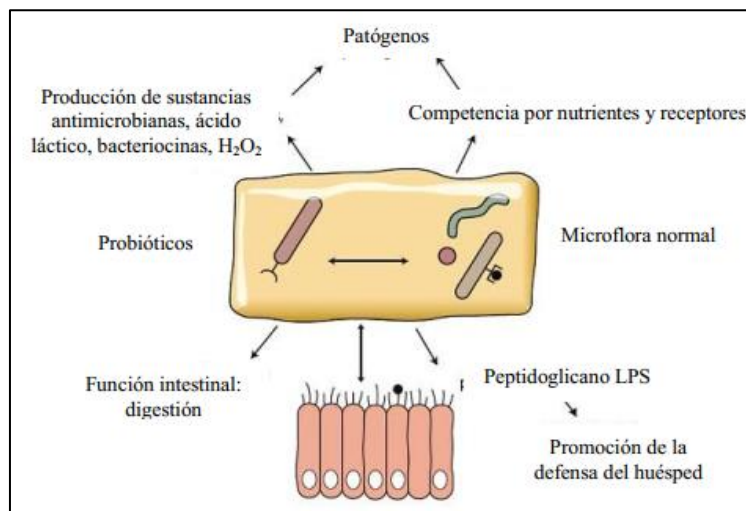


Figura 3. Interacción entre los probióticos y la microbiota del huésped.

Fuente: Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología, 2017.

En edades tempranas, cuando la microbiota aún no se encuentra desarrollada completamente, la colonización es altamente efectiva, y puede tener efectos a largo plazo. La colonización del intestino por parte de las cepas ingeridas se ve influida por la composición de la microbiota propia del huésped. En adultos, la colonización por consumo de probióticos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* es temporal, por lo que su administración debe ser sostenida en el tiempo (Satokari, 2019).

3.5.1. Salud metabólica

Las enfermedades metabólicas son producto de alteraciones en el metabolismo normal. Se dan más frecuentemente en personas adultas, debido a la disminución de la calidad de vida por falta de capacidad funcional.

Los ácidos biliares son componentes de la bilis pancreática. El colesterol es convertido en ácidos biliares primarios a través de vías enzimáticas. Al conjugarse son secretados junto con la bilis. Estos ácidos son desconjugados por acción bacteriana. Luego son reabsorbidos, o excretados en las heces, en menor medida.

La microbiota intestinal regula el metabolismo de los ácidos biliares. En consecuencia, la cantidad y diversidad de la microbiota condiciona la composición de la bilis, lo cual afecta el metabolismo de huésped y, por lo tanto, el desarrollo de patologías metabólicas. (Sivamaruthi *et al.*, 2020)

Varios estudios han demostrado la influencia de algunas cepas probióticas en la reducción de los niveles de colesterol. Esta puede darse por asimilación del colesterol, incorporación en las membranas celulares de las bacterias, o unión a los ácidos biliares.

Los ácidos biliares desconjugados son menos propensos a ser reabsorbidos, por lo que son excretados. Al ser un proceso de modulación negativa, aumenta su síntesis cuando disminuye su disponibilidad. Por lo tanto, la demanda de colesterol se verá incrementada, causando una disminución del colesterol sanguíneo, que se ve favorecida con una mayor población de microorganismos benéficos en el intestino. (Sivamaruthi *et al.*, 2020)

3.5.2. Salud dermatológica

La piel también posee una flora bacteriana característica, la cual se denomina microbiota dérmica. Al igual que en el intestino, juega un rol fundamental en la salud de este tejido. A su vez, los efectos de la microbiota intestinal en cuanto a la respuesta inmunitaria e inflamatoria, también repercute en la función de la barrera cutánea. La afección cutánea sobre la cual se ha estudiado mayormente el efecto del consumo de probióticos es la dermatitis atópica. Se caracteriza por la aparición de erupciones y descamaciones, hinchazón, picazón o enrojecimiento, como reacción a diversos factores ambientales.

El efecto inmunomodulador de los probióticos parecería mejorar la condición de los pacientes con dermatitis atópica, adjudicado a la reducción de la inflamación sistémica generada por distintos alérgenos ambientales. (Farías y Kolbach, 2011)

3.6.Regulación

El uso y definición de probióticos en la Argentina se encuentra contemplado en el Código Alimentario Argentino, Capítulo XVII – Alimentos de Régimen o Dietéticos. Indica que, *“con la denominación de Probióticos, se entiende los microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor”*. Las cepas utilizadas deberán cumplir con el *“protocolo de Evaluación de un Probiótico como Ingrediente para Alimentos”*, según señala el CAA.

Según el CAA, el proceso para la evaluación de un probiótico como ingrediente para alimentos se da de la siguiente manera:

1. Identificación de la cepa: los análisis se realizarán mediante protocolos de metodología validados, y en laboratorios autorizados por la Autoridad Sanitaria competente.
2. Caracterización “in Vitro” e “in Vivo”: se evaluarán tres tipos de resistencias, gástrica, con el fin de comprobar que la cepa llegue viable al intestino, luego del paso por el estómago; a bilis, como indicador que la cepa es resistente a la bilis presente en el duodeno; a lisozima, para asegurar que la cepa es resistente a la enzima presente en la saliva e intestino delgado.
3. Ensayos “in Vivo” e “in Vitro”: se deberán comprobar los efectos adjudicados a dicha cepa mediante estudios reconocidos.
4. Seguridad: la cepa no debe presentar riesgo alguno para la salud del consumidor. No puede presentar ni promover la translocación bacteriana, lo cual implica el pasaje de bacterias más allá del intestino. (Extraído del Art. 1389, CAA)

En adición a los ensayos mencionados anteriormente, deberán llevarse a cabo pruebas complementarias para asegurar la seguridad de la cepa elegida. Deberá garantizarse la ausencia de genes de resistencia, debido al problema sanitario que implica la diseminación de cepas resistentes en el tratamiento de enfermedades; la ausencia del factor de virulencia

responsable de actividad hemolítica, ya que es utilizado por los microorganismos como fuente de hierro, causando anemia y edema en el huésped; la ausencia de producción de toxinas de las cepas.

El CAA contempla como Alimento con Probióticos a aquellos que posea entre 10^6 y 10^9 UFC/g de células viables durante toda su vida útil. Para su comercialización, el producto deberá presentar un envase bromatológicamente apto, y será rotulado como la denominación de venta del producto, seguido del término “con probióticos”.

3.6.1. Probióticos naturales

a) Kéfir

El kéfir se encuentra contemplado en el artículo 576 del Código Alimentario Argentino, dentro del Capítulo VIII destinado a productos lácteos.

El kéfir es el “*producto cuya fermentación se realiza con cultivos acidolácticos elaborados con granos de kéfir, Lactobacillus kefir, especies de los géneros Leuconostoc, Lactococcus y Acetobacter, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono*”. (CAA, Art. 576, 1.3), y se encuentra enmarcado dentro de la definición de las leches fermentadas.

Los cultivos responsables de la fermentación se encuentran en forma de gránulos. Estos tienen un aspecto blanquecino y textura gelatinosa. Están conformados por agua, proteínas y polisacáridos, dentro de los cuales pueden encontrarse bacterias ácido lácticas, levaduras y bacterias ácido acéticas. Dentro de las mismas pueden mencionarse *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces exiguus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp* y *Streptococcus salivarius subsp. termophilus*. Los microorganismos conviven en una relación simbiótica, donde los metabolitos de algunos microorganismos sirven como sustratos para otros.

A pesar de que los microorganismos encontrados en los gránulos pertenecen mayoritariamente al género *Lactobacillus*, en la leche fermentada con estos gránulos, los géneros predominantes son *Streptococcaceae*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Acetobacter*.

La preparación del kéfir consiste en la adición de los gránulos a la leche en un 5%, y la fermentación durante 12-24hs a temperatura ambiente. Luego de la fermentación, los gránulos pueden ser lavados y utilizados para nuevas fermentaciones. Los gránulos pueden multiplicarse luego de algunas fermentaciones. Esta bebida es originaria del Cáucaso, Europa del Este y los Balcanes, y se cree que los gránulos de kéfir han sido transmitidos a través de las generaciones por más de 4000 años.

La palabra kéfir deriva del turco keif, que significa “sentirse bien”. Actualmente su consumo se ha incrementado considerablemente, a causa de los nuevos conocimientos acerca de los beneficios del consumo de probióticos en la salud.

Tiene sabor ácido y levemente alcohólico, consistencia cremosa y gaseosa. La composición del kéfir depende del origen de los gránulos, las condiciones de fermentación, y el tipo y cantidad de leche utilizada (Frag et al, 2020).

La viscosidad final del producto se ve afectada por el cultivo starter utilizado. El ácido láctico producido en la fermentación provee de sabor, y cumple funciones como conservante, evitando el desarrollo de otros microorganismos debido a la reducción del pH del producto. Los ácidos grasos libres obtenidos como producto de la lipólisis también aportan al sabor característico. Levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* proporcionan aroma por la producción de ésteres volátiles (Frag et al, 2020).

Las caseínas en la leche son degradadas por bacterias ácido-lácticas y levaduras vía proteólisis, dando como resultado aminoácidos que derivan en alcoholes y aldehídos. Las grasas son oxidadas en compuestos como hexanal y hexanol que dan aromas frutales y florales. La fermentación de la lactosa por bacterias y levaduras produce diacetilo, acetaldehído, acetona, ácido láctico y acético, obteniendo como productos finales etanol y dióxido de carbono (Frag et al, 2020).

Nutricionalmente el kéfir contiene calcio, magnesio, potasio, sodio, vitaminas y minerales.

Industrialmente el kéfir se produce a partir de cultivos starters. De esta manera se logran estandarizar las características deseadas, lo que no sería posible en el caso de utilizar

los gránulos originarios. Estos cultivos se encuentran liofilizados o congelados para su uso, y no son recuperados luego de la fermentación. El proceso industrial para la producción de kéfir comienza con la estandarización de la leche al tenor graso deseado y posterior pasteurización. Luego es enfriada e inoculada con los cultivos de kéfir en un 2-8%. La fermentación se realiza en tanques por 18-24hs. El coagulo formado se rompe mediante bombas, y se dosifica en botellas, donde se deja madurar 24hs a 10 °C. El producto terminado debe almacenarse a refrigerado a 4 °C. (Otles y Cagindi, 2003)

Debido a las delicadas condiciones de almacenamiento y corta vida útil del kéfir industrial, se ha comenzado a producir kéfir en polvo, que posee larga vida útil aún sin refrigeración. Este es obtenido mediante procesos como secado por spray o liofilización. Sin embargo, estos tratamientos pueden involucrar la pérdida de viabilidad de los microorganismos presentes debido a las altas temperaturas utilizadas (Frag et al, 2020), lo cual implicaría la pérdida de las características probióticas del kéfir en polvo. Esto puede evitarse mediante la adición de sustancias termoprotectoras como maltodextrina o leche en polvo, que permiten la supervivencia de las bacterias en los tratamientos mencionados (Teijeiro *et al.*, 2017).

b) Kéfir de agua

En Argentina no se encuentra regulado en el Código Alimentario Argentino. Es una bebida dulce, producto de la fermentación de los azúcares de las frutas adicionadas (Frag *et al.*, 2020). Para la producción del kéfir de agua se añaden frutas deshidratadas como pasas de uva o ciruelas pasas, azúcar y algún cítrico al agua, junto con los gránulos de kéfir. La composición microbiana de los mismos difiere de la encontrada en los gránulos de kéfir de leche.

La fermentación se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 24 a 72 horas. La bebida obtenida es acida, carbonatada y levemente alcohólica. Puede realizarse una segunda fermentación con la adición de nuevas frutas (Frag *et al.*, 2020).

La producción industrial se ve dificultada por las cualidades organolépticas y características fisicoquímicas deseadas del producto, ya que es la interacción entre los microorganismos aquella que determina la calidad sensorial final del producto.

3.7. Industria

3.7.1. Desarrollo de productos

Con el conocimiento del beneficio del consumo de alimentos probióticos, el desarrollo de alimentos funcionales de este tipo presenta un futuro muy prometedor. Sin embargo, al tratarse de microorganismos que deben permanecer viables en el intestino, su aplicación presenta diversos desafíos tecnológicos.

Para la aplicación de probióticos en la industria es indispensable el conocimiento de cada una de las cepas a utilizar. La caracterización de las mismas implica la determinación genética, la conservación de sus propiedades funcionales y la estabilidad y viabilidad del microorganismo durante el procesamiento y el almacenamiento del producto terminado.

Para la industria, cualquier producto que sea consumido habitualmente se presenta como un potencial vehículo para la adición de probióticos, por lo que el panorama se ha ampliado a través de los años, con el desarrollo de nuevos productos probióticos no lácteos. En teoría, cualquier alimento podría ser transformado en un alimento probiótico, si tecnológicamente se resuelve la incorporación de las bacterias probióticas y la correcta viabilidad y funcionalidad en el mismo.

La adición de probióticos puede causar cambios en el sabor o aroma del producto final debido a la producción de metabolitos como ácidos orgánicos por la fermentación en tiempos de almacenamiento prolongados. Es de suma importancia considerar estos efectos para no modificar la aceptación del producto por parte del consumidor (Castillo Escandón *et al.*, 2019).

La cepa elegida dependerá de las características del proceso productivo. En este caso deben considerarse las condiciones adversas a las que se ven expuestos los probióticos como el proceso de deshidratación, los largos tiempos de almacenamiento para garantizar la supervivencia en el tracto digestivo, de manera de llegar en cantidades adecuadas al intestino (Terpou *et al.*, 2019).

Una vez ingeridas, las bacterias se ven expuestas a diversos factores de estrés, como exposición a ácidos presentes en el estómago, sales biliares, enzimas pancreáticas, altas

concentraciones de iones, ausencia de nutrientes, estrés oxidativo, variaciones osmóticas, junto al estrés causado por el pasaje a través del sistema gastrointestinal (Terpou *et al.*, 2019), lo cual puede afectar tanto su viabilidad como su funcionalidad.

3.7.2. Aspectos que afectan la viabilidad en el alimento

Para la elaboración de un alimento probiótico deben tenerse en cuenta diversos factores, comenzando por la elección de la matriz de aplicación. Esta incluye las propiedades fisicoquímicas del alimento, que puedan afectar positiva o negativamente la supervivencia de las bacterias seleccionadas (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

3.7.2.1. Factores internos

Estos factores intrínsecos de los productos incluyen la acidez, oxígeno, actividad acuosa, presencia de sales, azúcares, bacteriocinas, peróxidos, sustancias artificiales como colorantes y saborizantes.

a) Factores químicos

Dentro de los factores químicos pueden mencionarse la presencia de azúcares, sales o compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos microbianos con gran actividad antimicrobiana, producida principalmente por bacterias lácticas. Su presencia puede afectar negativamente la viabilidad de las cepas probióticas en el alimento, mientras que la presencia de prebióticos tiene un efecto positivo.

b) Presencia de oxígeno

Tanto los niveles de oxígeno como el potencial redox impactan en las etapas de almacenamiento, afectando principalmente a las bacterias aerobias. En este caso, el género *Lactobacillus* es más tolerante que el género *Bifidobacterium*, En estos casos debe tenerse en cuenta el efecto del envase, manteniendo bajos los niveles de permeabilidad para controlar los niveles de oxígeno. También pueden adicionarse sustancias antioxidantes o utilizar métodos como el envasado al vacío.

El sistema inmune y la microbiota del consumidor también juegan un papel importante en la supervivencia de los probióticos (Castillo Escandón *et al.*, 2019). Es por ello

que la elección de la matriz debe asegurar la suficiente protección de los microorganismos hasta su llegada al intestino.

c) Matrices lácteas

Tradicionalmente, los probióticos han sido añadidos a alimentos fermentados de origen lácteo, principalmente en yogures. Los bajos niveles de pH causados por la fermentación, junto con la presencia de cultivos starters afectan la supervivencia de los probióticos añadidos, así como el oxígeno disuelto en el alimento (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

d) Matrices con bajos niveles de actividad acuosa

La actividad acuosa determina la cantidad de agua disponible para las reacciones químicas. Productos con valor de a_w entre 0.2 y 0.6, poseen largos periodos de vida útil, sin necesidad de refrigeración. Los bajos niveles de actividad acuosa proveen un ambiente estable, y favorecen la viabilidad de los probióticos en estados metabólicamente inactivos. Sin embargo, el estrés causado en los procesos de deshidratación de los microorganismos puede afectar su supervivencia, por lo que debe trabajarse en la optimización dichos tratamientos.

3.7.2.2. Factores externos

a) Envasado

Las propiedades físicas de los materiales utilizados para el envase pueden influir en la viabilidad de las bacterias. Las cepas probióticas requieren de bajos niveles de oxígeno para su supervivencia. Tanto *Bifidobacterium spp* como *Lactobacillus acidophilus* se ven afectados ante la presencia de oxígeno disuelto en el producto, por lo que la utilización de un envase permeable afectará su aplicación técnica. Miller *et al.*, demostraron que el uso de envases de yogurt con baja permeabilidad permitía mejor conservación de los probióticos en el producto, eliminando un factor que inhibe su supervivencia. En el caso de *L. acidophilus*, se encontró que este género toleraba mejor la vida útil en envases de vidrio en comparación a envases de plástico. Sin embargo, estudios demostraron que la utilización de envases de baja permeabilidad al oxígeno producía mayor acidificación en los productos, debido al proceso de fermentación de los microorganismos (Cruz *et al.*, 2013).

El uso de envases de vidrio implica un alto costo adicional en el producto final, por lo que la aplicación de técnicas como agentes de barrido de oxígeno, envasado al vacío o utilización de envases activos para la eliminación de oxígeno parecen ser las soluciones más efectivas (Terpou *et al.*, 2019).

3.7.3. Formulación

La formulación de probióticos es un punto clave a tener en cuenta, ya que condiciona la disponibilidad luego de su aplicación en el producto final, y que las cepas elegidas lleguen al consumidor en cantidades necesarias. Además, esto permite la adición de claims nutricionales en el rotulado, brindando al producto un valor agregado comprobable.

La formulación implica la elección de la cepa, partiendo con una fermentación controlada de la misma, para obtener una cantidad cuantificable del microorganismo. La adición de otros componentes condiciona la disponibilidad de dicho probióticos, que debe llegar sano al intestino para poder ser efectivo como tal.

Se añaden aglutinantes, normalmente celulosa microcristalina y maltodextrinas de arroz. Luego se utilizan agentes de recubrimiento, modificadores de viscosidad, color y sabor.

La estabilidad del probiótico se ve condicionada por su paso por el tracto digestivo. La saliva es el primer encuentro con enzimas que pueden degradarlo. Luego, el ácido del estómago y el intestino. Puede suceder también, que el probiótico sea demasiado estable, con lo cual, pase por el cuerpo sin liberarse, y por lo tanto, sin ejercer el efecto deseado (iFormulate Revisited, 2020).

3.7.4. Aplicación

Para la adición de probióticos a una matriz, estos deben sufrir previamente algún proceso para su conservación.

3.7.4.1. Deshidratación

La deshidratación provoca una reducción extrema en el metabolismo de las células, lo que permite su supervivencia bajo condiciones apropiadas. La suspensión temporal

de las funciones vitales debido a bajos niveles de actividad acuosa (a_w) se conoce como anhidrobiosis (Marcial-Coba *et al.*, 2019). El uso de probióticos deshidratados propone viabilidad a largo plazo, y la posibilidad de ser incorporados en alimentos de baja humedad. La deshidratación de los microorganismos implica simultáneamente la encapsulación de los mismos, ya que se adicionan sustancias protectoras. Estas sustancias cumplen el papel de proteger los microorganismos frente a condiciones adversas a las que son expuestas durante el procesamiento.

Se han utilizado alginatos, gomas, almidón, proteínas (tanto gelatina como proteínas lácteas y de soja) y grasas (parafinas, ácido esteárico) como materiales de recubrimiento (Rodríguez *et al.*, 2016).

a) Alginatos

Los alginatos son polisacáridos naturales compuestos de ácido manurónico y glucurónico, en diversas proporciones según su origen. La estructura de red compuesta por bloques de ambos ácidos logra el efecto protector. Tienen la capacidad de formación de gel a bajo pH, y solubilización a niveles de pH alcalinos. (Zou *et al.*, 2012).

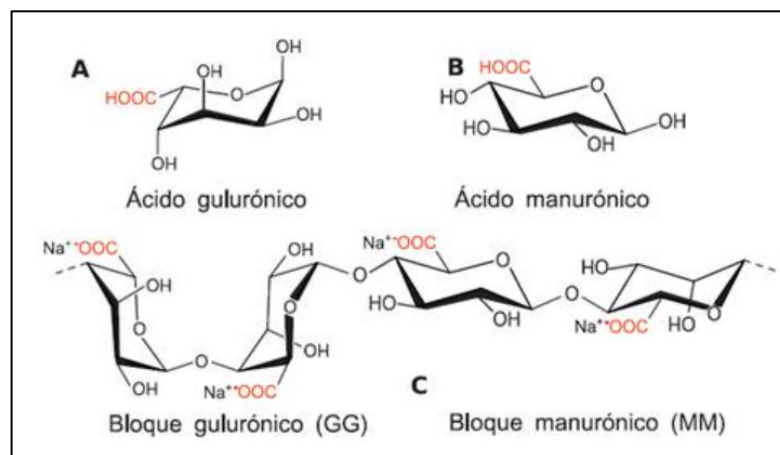


Figura 4. Composición del alginato con bloques de ácido glucurónico y ácido manurónico. Fuente: Ore B., Yerald *et al.*, 2020.

Los más utilizados son los alginatos de sodio y calcio (Marcial-Coba *et al.*, 2019). Sin embargo, el alginato de calcio, usado frecuentemente en la industria alimenticia

posee baja estabilidad frente a los medios ácidos, por lo que su uso se encuentra en discusión, ya que no resistiría los ácidos estomacales (Rodríguez *et al.*, 2016).

Su acción puede ser mejorada a través de la adición de leche, proteína del suero de leche o caseína micelar (Shori, 2016), logrando de esta manera mejor viabilidad de los probióticos en el tracto intestinal. Se ha encontrado la supervivencia de cepas probióticas encapsuladas con alginatos tanto tras 120 días de almacenamiento como tras el paso por el tracto gastrointestinal superior.

b) Goma Gellan y goma Xantana

Se trata de compuestos exopolisacáridos de origen microbiano. La goma Gellan presenta alta tolerancia al calor y a bajos niveles de pH, mientras que la goma Xantana es estable antes grandes variaciones de pH y temperatura. Para maximizar su efectividad se utilizan de manera conjunta (Marcial-Coba *et al.*, 2019). La estabilidad presentada frente a los ácidos demuestra mejores resultados para la encapsulación que el uso de alginatos (Rodríguez *et al.*, 2016).

La combinación de alginato y gelatina demostró una tasa de supervivencia que duplica la de los probióticos encapsulados con alginato, y triplica la de las bacterias sin tratar (Moreira Guimarães *et al.*, 2019).

c) Proteínas lácteas

Pueden ser utilizadas en todos los métodos de encapsulación mencionados. La exposición a la pepsina reduce considerablemente la viabilidad de las células, por lo que es recomendable la adición de una segunda capa protectora para evitar su degradación prematura.

d) Almidón

La principal ventaja reside en que el almidón resistente no es atacado por enzimas pancreáticas, por lo que llega al intestino sin modificaciones, donde permite la liberación de las cepas probióticas (Marcial-Coba *et al.*, 2019). Esto permite considerar al almidón resistente como un eficiente vehículo de probióticos. Sin embargo, pueden presentarse

dificultades en el secado en casos de altas concentraciones de almidones por aumento de la viscosidad (Rodríguez *et al.*, 2016).

e) Prebióticos

Al tratarse de compuestos no digeribles, su utilización se presenta como una opción eficaz para la protección de las células frente a las sales biliares durante la digestión, para su posterior liberación en el intestino, donde pueden ser fermentados. Los encapsulados con inulina presentaron mayor supervivencia que aquellos recubiertos con FOS, ya que su mayor tasa de polimerización proveyó a las células con glucosa por tiempo prologando. Sin embargo, estos compuestos parecerían ser aplicables solo a matrices de baja hidratación debido a las altas concentraciones de azúcares simples (Rodríguez-Barona *et al.*, 2016).

Capela *et al.* estudiaron la viabilidad de las cepas probióticas encapsuladas y libres en yogurt, con la adición de sustancias crioprotectoras y prebióticos. La mortalidad en los lotes adicionados con probióticos micro encapsulados fue menor en comparación a aquellos lotes con cepas libres. A su vez, luego de un mes a 37 °C, las cepas encapsuladas fueron las únicas que se encontraron viables. La utilización de prebióticos y crioprotectores no influyó en la supervivencia de los microorganismos.

3.7.4.2. Microencapsulación

La encapsulación es el proceso mediante el cual alguna sustancia, en este caso bacterias, son inmovilizadas y envueltas en un material de recubrimiento que brinda protección frente a factores externos desfavorables (Terpou *et al.*, 2019). Esta capa provee protección física al oxígeno, sales biliares y bajos niveles de pH presentes a lo largo del tracto digestivo (Marcial-Coba *et al.*, 2019), lo que permite que las cepas probióticas alcancen el intestino de forma viable y fisiológicamente activas, condición indispensable para poder clasificarse como tales (Shori, 2016).

Condiciones como el tipo de cepa, la tolerancia a factores externos, el material de recubrimiento, la temperatura del proceso y de almacenamiento, la actividad acuosa el material de envasado influyen tanto en la encapsulación como en el procesamiento y almacenamiento. (Rodríguez *et al.*, 2016)

La selección del material de recubrimiento correspondiente dependerá de su solubilidad, difusividad, su capacidad emulsionante y la de establecer una barrera con el exterior. A su vez deberá considerarse la matriz del alimento al cual se incorporará la sustancia encapsulada. (Rodríguez *et al.*, 2016)

Existen diversos métodos para lograr la deshidratación y encapsulación de los probióticos. La selección de cada método depende de la relación costo beneficio de cada uno de ellos.

3.7.4.3. Liofilización

Consiste en la concentración por sublimación de una suspensión congelada de células y su posterior desorción hasta niveles extremadamente bajos de humedad. El producto obtenido es una masa de células. Los principales riesgos implican la formación de cristales internos y súbitos cambios osmóticos que pueden dañar la estructura celular. La adición de compuestos crioprotectores como sacarosa (Zou *et al.*, 2012), polialcoholes, aminoácidos y proteínas pueden actuar reduciendo los efectos indeseados.

La aplicación de este método demuestra altas tasas de supervivencia frente a largos periodos de almacenamiento (Marcial-Coba *et al.*, 2019), sin embargo, al tratarse de un proceso en lote, implica gran consumo de tiempo, lo que se presenta como principal desventaja para su utilización en la industria alimenticia. A pesar de esto, continúa siendo el método más elegido al momento del tratamiento de probióticos (Fu *et al.*, 2018).

3.7.4.4. Secado por spray

Este proceso implica la pulverización de un líquido que contiene las bacterias, comúnmente en forma de suspensión o emulsión (Fu *et al.*, 2018) en una corriente de aire caliente. Presenta ventajas con respecto a los costos, disponibilidad de equipos, y al volumen de producción, ya que puede trabajarse de manera continua.

Debido a las altas temperaturas utilizadas implica mayor estrés para las células, lo que puede afectar la supervivencia de las cepas debido al daño a la membrana celular y el ADN. Al tratarse de un proceso muy rápido, no es la temperatura del proceso, si no la de la

micro gota obtenida la cual condiciona la viabilidad de las bacterias (Fu *et al.*, 2018). Por lo tanto, el control de este parámetro puede reducir considerablemente la inactivación de las células. Para ello, la utilización de agentes termoprotectores como gelatina, goma arábiga y ftalato-acetato de celulosa puede implicar grandes beneficios.

Los microencapsulados obtenidos mediante este método son partículas de ente 10 y 100 μm hasta 2 y 3 mm. Estos productos son utilizados en fármacos, plaguicidas y alimentos, teniendo en consideración las condiciones ambientales que puedan afectar su estabilidad.

La combinación de ambos procesos mencionados anteriormente puede mejorar considerablemente la relación costo-beneficio de su aplicación.

3.7.4.5. Secado al vacío

Permite el secado a menor temperatura, ya que el punto de ebullición del agua se ve disminuido en condiciones de vacío. El producto final requiere de posterior tratamiento para la obtención de partículas individuales. Algunos compuestos como el sorbitol y la sacarosa pueden tener efectos estabilizadores en la membrana celular (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

3.7.4.6. Emulsificación

Consiste en la incorporación de la mezcla hidrocóloidea que contiene las células en un líquido inmiscible. Con este fin suele utilizarse aceite, ya que posteriormente se utiliza en la producción de alimentos. Las micro cápsulas son obtenidas tras la adición de cloruro de calcio. El tamaño de las células encapsuladas no es completamente uniforme, ya que se ve afectado por las condiciones de agitación y el tipo de equipos seleccionados. Esto se presenta como la principal desventaja de este método (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

Tras la microencapsulación, las partículas pueden ser deshidratadas, o bien aplicadas en alguna matriz alimenticia. Sin embargo, la variabilidad en los diámetros de las partículas obtenidas puede llegar a percibirse como textura granulada en el producto. Esto podría implicar un potencial defecto en términos organolépticos.

3.8. Cepas comerciales

Así como aumenta la demanda de productos y alimentos con probióticos, también los hace la demanda de productos de origen vegetal (Moreira Guimarães *et al.*, 2019). La tendencia hacia una alimentación libre de productos animales es una realidad. Es por ello, que debe adaptarse el futuro de los probióticos hacia el panorama futuro.

Los productos lácteos son comúnmente utilizados como matriz de aplicación de los probióticos, ya que se almacenan refrigerados, poseen alta cantidad de nutrientes, y muy buena aceptación por parte de los consumidores.

Las cepas más utilizadas en lácteos son *Lactobacillus casei* Shirota, *L. rhamnosus* GG., *L. acidophilus* LA-5., *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* BB536, *B. animalis*, *B. lactis* BB-12.

3.8.1. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®

Bifidobacterium es una bacteria gran positiva, productora de ácido láctico, no esporulada. Forma parte de la microbiota humana, presente en el tracto intestinal.

La cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* es comercializada bajo el registro BB-12 por la empresa Chr. Hansen. Es la cepa probiótica más estudiada. Tolera los ácidos gástricos y biliares, superando de esta manera el pasaje por el tracto gastrointestinal, llegando viable al intestino.

Bifidobacterium BB-12 fue especialmente seleccionado para la formulación de productos lácteos y ha sido utilizado en alimento fórmula para infantes, productos lácteos fermentados, liofilizados y suplementos dietarios. (Jungersen *et al.*, 2014). BB 12 posee alta adherencia a las mucosas intestinales, inhibición de patógenos, estimulación del efecto barrera y mecanismos de inmunidad, características deseables en una cepa probiótica. Se han comprobado sus efectos en la salud, dentro de los cuales se le atribuyen protección contra la diarrea y la mejora en los efectos adversos por el tratamiento con antibióticos.

Los productos secos presentan grandes beneficios en comparación a los alimentos frescos, como los lácteos. Entre ellos pueden destacarse largos periodos de vida útil, mayor estabilidad en el tiempo y facilidad para su transporte y distribución (Fu *et al.*, 2018).

La adición de probióticos en matrices no lácteas se presenta como una alternativa a este desafío. Se han analizado diversos alimentos que cumplen con dichas características, sin embargo, su presencia en Argentina es nula.

3.8.2. Ganeden BC³⁰

En el mercado Ganeden BC³⁰ es un probiótico comercial que contiene esporas de la cepa *Bacillus coagulans* Ganeden BC³⁰, reconocida como inocua (GRAS, por sus siglas en inglés).

Bacillus coagulans, anteriormente conocido como *Lactobacillus sporogenes*, es un microorganismo esporulado productor de ácido láctico. *B. coagulans* produce coagulina, una bacteriocina que inhibe el desarrollo de patógenos intestinales (Castillo Escandón *et al.*, 2019). Dentro de los beneficios del consumo de *B.coagulans* se ha demostrado mayor absorción de aminoácidos, ya que en las condiciones intestinales produce enzimas proteolíticas más efectivas que las humanas. También se le atribuyen la disminución en la inflamación y mejoras en la salud intestinal e inmune (Jäger *et al.*, 2017). Esto se debe a que *Bacillus coagulans* mejora las condiciones de la pared intestinal, favoreciendo de esta manera la absorción de nutrientes y el desarrollo de las vellosidades intestinales. Se han demostrado los beneficios de mejorar la salud intestinal, el sistema inmune y la utilización de las proteínas.

La principal ventaja es la formación de esporas, que protege a *Bacillus coagulans* de las condiciones adversas en los procesos productivos, tales como bajo pH, presión, altas temperaturas, o congelación. Esto le permite permanecer en estado de latencia durante el proceso de elaboración, transporte y almacenamiento hasta su llegada al intestino. Es allí donde se encuentran las correctas condiciones de temperatura y humedad para su germinación. Ni *Lactobacillus* ni *Bifidobacterium* poseen esta cualidad, que son considerados probióticos vegetativos. Esto permite la elaboración de productos que no requieren de refrigeración.

La vida útil puede extenderse hasta 2 años, dependiendo de la matriz y método de aplicación. Se utiliza en la producción de alimentos funcionales. Este suplemento está siendo utilizado en el mercado para el desarrollo de productos que requieren de exposición a altas temperaturas, tanto en el proceso productivo como en su consumo, haciendo uso de su ventaja frente a otras cepas comercializadas.

3.9. Matrices de aplicación de alta humedad

3.9.1. Matrices lácteas

Las bacterias probióticas se ven afectadas por el entorno que los contiene. El oxígeno disuelto, el pH del alimento, así como los metabolitos, ácidos orgánicos y sales, afectan su supervivencia.

La ventaja de las matrices lácteas recae en que algunos componentes en la leche proveen protección a los probióticos. Las proteínas como la lactoalbúmina y la lactoglobulina tienen efectos protectores en ambientes ácidos, al igual que la grasa, ya que funcionan como recubrimiento. Otras, como las caseínas, permiten el crecimiento de las bacterias al servir como fuente de nitrógeno (Castillo Escandón *et al.*, 2019).

En las matrices lácteas puede destacarse la presencia de hidratos de carbono no digeribles y vitaminas, que estimulan el crecimiento de los probióticos.

3.9.2. Productos frutales

El principal atractivo para el desarrollo de este tipo de productos que contengan probióticos se atribuye a la gran aceptación de los mismos por parte de los consumidores. Los carbohidratos, vitaminas y minerales presentes pueden ayudar al crecimiento de los microorganismos presentes.

Productos como frutas deshidratadas también han sido estudiados satisfactoriamente para ser utilizados como matriz de probióticos. Debido a la alta concentración de azúcares causada por el procesamiento, el producto final presenta valores de a_w cercanos a 0,3, lo cual permite estabilidad a temperatura de ambiente por largos períodos de tiempo (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

La presencia de antioxidantes y azúcares en helados frutales, juntos a las cualidades fisicoquímicas como el bajo pH proporcionan condiciones para la supervivencia de las cepas, en adición a las bajas temperaturas de almacenamiento de dicho producto (Moreira Guimarães *et al.*, 2019).

También existen jugos de fruta con probióticos. Estos pueden ser logrados mediante la adición de los probióticos a los jugos, o bien, la fermentación de los jugos con los probióticos. El proceso consta del lavado y prensado de las frutas, y la posterior filtración y pasteurización del jugo. Luego de esto se adicionan los probióticos, y se mantiene refrigerado. En el caso de los jugos fermentados, estos son almacenados a temperaturas controladas con el fin de permitir el proceso fermentativo (Castillo Escandón *et al.*, 2019).

El pH de los jugos se encuentra entre 2,5 a 3,7, por lo que deben elegirse cepas resistentes a estos niveles. Se han adicionado mayoritariamente cepas del género *Lactobacillus*. Sin embargo, la supervivencia de las cepas difiere en las frutas utilizadas. En el caso de *L. acidophilus*, se ve inhibido su crecimiento en jugos de kiwi y ananá, mientras que el jugo de frutilla inhibe a *L. casei* (Vinderola *et al.*, 2002).

En los jugos fermentados, el principal factor que condiciona la supervivencia de los microorganismos es la temperatura de fermentación. Una vez refrigerados, la concentración de probióticos se mantiene relativamente estable, suficiente para proporcionar los efectos beneficiosos (Castillo Escandón *et al.*, 2019).

Para el desarrollo de frutas impregnadas, se encontró que la aplicación de pulsos de vacío mejoró considerablemente la cantidad de microorganismos que lograron penetrar en las frutas. La deshidratación osmótica consta en la inmersión del alimento en una solución hipertónica, logrando de esta manera la migración de los probióticos de la solución al alimento y la deshidratación en simultáneo.

Más allá del proceso elegido para la adición de los probióticos, la etapa crucial es el almacenamiento. Se ha demostrado que niveles de a_w superiores a 0,327 afectaron considerablemente la viabilidad de los mismos (Castillo Escandón *et al.*, 2019).

En algunos casos, una posible solución puede ser la adición de leche para que las proteínas ejerzan el efecto protector sobre las bacterias. Otra opción es la adición de probióticos microencapsulados. En este caso, el tamaño de las partículas es fundamental, ya que puede tener efectos sobre las características organolépticas del producto, causando sensación arenosa.

En caso del desarrollo de un alimento puramente basado en plantas, la adición de leche no es factible. Podría considerarse la adición de prebióticos, como los fructooligosacáridos (FOS) y la inulina, que en algunos casos han demostrado beneficios en la conservación de la viabilidad de los probióticos adicionados a jugo de manzana (Castillo Escandón et. al, 2019). En estos casos se utiliza el término simbiótico, cuando los probióticos son adicionados junto con los prebióticos. La encapsulación conjunta podría favorecer la supervivencia de los microorganismos en los jugos (Castillo Escandón et. al, 2019).

3.10. Matrices de aplicación de baja humedad

3.10.1. Productos en polvo

La forma más efectiva es la adición de los probióticos microencapsulados al polvo de frutas ya secado. El método de adición impactará de manera importante sobre la supervivencia de los microorganismos. Para la deshidratación debe considerarse la adición de proteínas lácteas o carbohidratos complejos para proteger los probióticos. Otra opción es la encapsulación en pectinas o alginatos.

3.10.2. Pasta de maní

La pasta de maní posee a_w de 0,35 y pH de 6,3, condiciones que evitan el desarrollo de bacterias patógenas y alterativas y le confieren larga vida útil (He et al, 2013). Estudios realizados demostraron que los probióticos adicionados se mantuvieron estables durante el tiempo de almacenamiento como tras su paso por el tracto digestivo. Sin embargo, considerando la dosis diaria de pasta de maní, la concentración de bacterias adicionadas debería ser muy alta para lograr su acción como alimento probiótico (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

3.10.3. Chocolate

La alta concentración de materia grasa en el chocolate y su bajo a_w (0,3) se relacionan directamente con su estabilidad y larga vida útil. Se ha comprobado la supervivencia en el almacenamiento de cepas probióticas adicionadas, así como en el paso del tracto digestivo, en tasas superiores a las de las células presentes en yogurt. Esto podría deberse a la protección de las bacterias por la presencia de grasa en este alimento (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

Moreira Guimarães *et al.*, (2019) estudiaron la adición de cepas extraídas de queso artesanal de Brasil en pulpa de cacao lavada y tratada con agua hirviendo, y luego almacenada 3 meses a -20°C .

La pulpa del cacao es un subproducto del cacao. Presenta alto valor nutricional, junto con vitaminas, antioxidantes y polifenoles que favorecen la supervivencia de microorganismos como bacterias ácido lácticas y levaduras. Estas bacterias se encuentran naturalmente en el grano de cacao y son las responsables de la fermentación del fruto. Además de la supervivencia de las bacterias, cabe destacar que no se modificaron sus aspectos organolépticos tras el tratamiento. Más allá de la viabilidad de los probióticos, la estabilidad de dichas cualidades se presenta como un gran desafío tecnológico a la hora del desarrollo de estos productos, ya que condiciona la aceptación por parte de los consumidores (Moreira Guimarães *et al.*, 2019).

La adición y comprobada viabilidad de las cepas tras el congelamiento y almacenamiento puede presentarse como alternativa a dietas libres de alimentos de origen animal como para alergias a lácteos.

3.10.4. Barras de cereal

El bajo a_w de estos productos permite la estabilidad de las cepas probióticas. Se utilizan principalmente *Bacillus coagulans* y *Bifidobacterias*. Las bacterias son adicionadas en los recubrimientos de azúcar o en bases grasas que otorgan protección.

A pesar de poseer a_w mayor al ideal para la viabilidad de los probióticos, su almacenamiento a bajas temperaturas favorece la supervivencia de cepas encapsuladas mediante agentes lipídicos (Marcial-Coba *et al.*, 2019).

3.10.5. Papas fritas

Al ser el producto de comida rápida más elegido, se presenta como una gran opción para la adición de probióticos. Los probióticos fueron liofilizados en leche descremada y en solución de gelatina y glicerol. Los sólidos de la leche actuaron como protectores, permitiendo mantener su viabilidad. Luego de la fritura, las papas se almacenaron en bolsas y adicionadas con polvo de bacterias liofilizadas, para adherirse en la superficie.

El aceite absorbido durante la fritura puede presentar problemas de oxidación durante su almacenamiento, derivando en defectos organolépticos. La adición de probióticos también tuvo resultados positivos en cuanto a condiciones de almacenamiento, ya que mejoró la estabilidad y calidad sensorial debido a la capacidad de limitar las cantidades de radicales libres propensos a la oxidación (Mostafa, 2020)

Las papas fritas resultaron un medio apto para la adición de probióticos. Sin embargo, la adición de probióticos en un producto procesado y frito puede resultar un poco contradictoria a los ojos de los consumidores.

3.11. Consumo de productos con probióticos

Se estima que existen más de 50 millones de consumidores de probióticos. Sin embargo, el consumo de probióticos a través de suplementos alcanza un 40% (Según datos de EE.UU). De estos, un 47% tienen entre 26 y 40 años, un 33% entre 40 y 60 años y el 19% son mayores de 60 años.

La demanda de productos con probióticos se encuentra en constante aumento, ante la creciente tendencia de cuidar la salud intestinal por parte de los consumidores.

Una encuesta llevada a cabo por Kerry Group, una empresa irlandesa de alimentos, en 16 países en enero de 2021, reveló que el 47% de 13.000 consumidores consultados, estaban familiarizados con los probióticos. También comenta que, 1 de cada 4 encuestados había consumido probióticos en los últimos 6 meses.

Hace ya varios años que se conoce el término de “bienestar holístico”, el cual hace referencia a un estado de salud integral. Es sabido que para lograrlo, el primer paso es el

sistema inmune, razón por la cual, muchos consumidores están migrando a un estilo de vida más saludable, basado en alimentos y bebidas funcionales. (Kerry, 2019)

A medida que el conocimiento acerca del eje intestino – cerebro aumenta, el consumo de probióticos se asocia también a mayor claridad y funcionamiento cognitivo.

3.12. Mercado en Argentina

El mercado de productos con probióticos en Argentina es muy reducido. Hasta hace unos años, este mercado se reducía simplemente a yogures o productos lácteos adicionados con probióticos. Esto se debe a que las cepas comunmente utilizadas, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son cepas vegetativas, que requieren de refrigeración para su supervivencia. Sin embargo, este mercado se encuentra en constante expansión, a causa de la alta demanda de productos saludables por parte de los consumidores.

a) El Bioqueso Ilolay Vita fue un queso fresco que salió al mercado en el año 1999, desarrollado por la empresa Sucesores de Alfredo Williner junto con el Instituto de Lactología Industrial (Universidad del Litoral – CONICET, Santa Fe). Este fue el primer queso con probióticos de Latinoamérica. Para ello se utilizó un sistema de ultrafiltración, que permitió concentrar los sólidos del queso evitando el paso del desuerado, que implicaría la pérdida de las células viables.



Figura 5: BioQueso Ilolay Vita. Fuente: *assal.gov.ar*, 2013

El queso se presenta como una buena vía para la adición de probióticos ya que la matriz de proteína y grasa actúa como barrera protectora de los microorganismos. A su vez,

los menores niveles de pH y oxígeno permiten la supervivencia de los mismos y su llegada al intestino de forma viable.

b) Yakult es un producto lácteo fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota. Este producto nació en Japón en la década del 50, llegó al país en 1997 y se comercializó hasta el año 2012. La empresa promociona que este producto posee más de 8 mil millones de bacterias. Sin embargo, no está claro si pueden llegar viables al intestino. La polémica con este producto recae en la alta cantidad de azúcar que contiene, por lo que se contradice con la idea de un producto saludable.



Figura 6: Yakult, producto a base de leche fermentada, presente en los supermercados argentinos.

Fuente: yakult.es

c) Actimel es un producto que puede encontrarse en el mercado masivo hace muchos años. Se clasifica como “leche fermentada con probióticos”. Dentro de sus ingredientes se encuentra la cepa *Lactobacillus paracasei* ssp. L. Casei DN-114 001, que luego de 8 horas de fermentación como parte del proceso productivo, alcanza las 10 mil millones de UFC, según lo informado por la empresa.



Figura 7: Actimel, producto del mercado. Fuente: actimel.com.ar

d) Actualmente pueden encontrarse en el mercado varios productos. A nivel de consumo masivo existen yogures “Yogurísimo” de la marca “La Serenísima” lanzados en 2020, que han adicionado probióticos en sus productos. Esto surge como respuesta a la demanda de los consumidores de etiquetas más limpias, con menos aditivos, y mayor conciencia en lo que consumen. Los ingredientes incluyen leche entera, azúcar, almidón modificado, gelatina, cultivos lácticos (*L. casei* y *Bifidobacterium*), vitaminas, estabilizantes, aromatizantes y colorantes naturales.



Figura 8: Yogurísimo adicionado con probióticos. Fuente: yogurismo.com.ar, 2023

e) La marca “Ser” también realizó nuevas campañas de relanzamientos, en búsqueda de etiquetas más limpias. Los nuevos productos se componen de leche parcialmente descremada, proteínas lácteas, sólidos lácteos, almidón modificado, gelatina, lactasa, cultivos lácticos, cultivos probióticos (*L. casei*, *Bifidobacterium*), aroma, miel, edulcorantes como Stevia, Acesulfame K y Sucralosa, según la línea a la que pertenecen.



Figura 9: Yogur marca Ser, adicionados con probióticos. Fuente: yogurser.com.ar

f) La marca de alimentos veganos, “Felices Las Vacas” lanzó smoothies sabor frutos rojos, banana, y mago-maracuyá, con cultivos de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, BB-12®. La marca posee también un producto a base de leche de almendras, sabor frutilla, vainilla o durazno, que posee cultivos activos de *Bifidobacterium*. Este producto es presentado como una variante vegana del yogur, formulado a base de agua, duraznos, almendras, almidón, arroz, azúcar, aceite de coco, stevia, sal, cultivos activos bifidobacterias, goma guar, y lecitina de girasol.



Figura 10: Productos de origen vegetal, de la marca Felices Las Vacas, con adición de probióticos BB-12.

Estos ejemplos reflejan la transición de las grandes marcas al movimiento de las etiquetas limpias, y el desarrollo de nuevos productos con probióticos, lo cual implica un gran cambio en el mercado. De esta forma, marcan tendencia, y demuestran la fuerza de la demanda por parte de los consumidores.

3.13. Mercado internacional

a. La mantequilla de almendras “yumbutter”. Contiene mil millones UFC por porción (32 gramos) de la cepa *Bacillus coagulans* BC30.



Figura 11: Mantequilla de maní Yumbutter. Fuente: www.yumbutter.com

b. En España pueden encontrarse los chocolates de la marca New You. Estos contienen como probióticos, cepas de *Bifidobacterium Animalis* subsp. *Lactis* BPL1. El listado de ingredientes consta de pasta de cacao, sirope de agave, manteca de cacao, inulina de agave, *Bifidobacterium animalis* sub. *lactis* BPL1 CECT 8145 (1%), emulgente (lecitina de girasol). En este caso, la cepa no requiere de refrigeración, y puede almacenarse a temperatura ambiente, lo que permite su supervivencia en un producto de este tipo.



Figura 12: Chocolates New You con probióticos BPL1. Fuente: newyouchocolate.com

c. La empresa Orlando Bakery comercializa panes con probióticos *Bacillus Coagulans* GBI-30 6086. Poseen 5 variantes dentro de esta línea de productos. La estabilidad de esta cepa se debe a su capacidad de formación de esporas, lo que brinda resistencia a los niveles de estrés que puede sufrir en la cocción o almacenamiento. Se trata de una aplicación completamente innovadora, ya que no requiere de refrigeración, y a su vez, es interesante por ser un producto de consumo diario.



Figura 13: Panes con probióticos BC GBI-30. Fuente: truegrainsbread.com

d. Siguiendo con los productos de consumo diario, la marca canadiense Nautre's Path comercializa granolas con probióticos adicionados. Contiene avena, azúcar de caña, almendras, inulina, almidón de arroz, quinoa arrollada, canela y probióticos (*Bacillus coagulans* GBI-30 6086).



Figura 14: Granola con probióticos. Fuente: <https://www.costco.com/kirkland-signature>

3.14. Probióticos de nueva generación

En vista al creciente conocimiento de la composición de la microbiota intestinal, nuevas cepas han sido clasificadas como potencialmente benéficas. La utilización de estos organismos, presentes nativamente en el intestino se categorizan como los probióticos de nueva generación (O'Toole *et al.*, 2017).

Los Bacteroides son microorganismos anaerobios estrictos, que normalmente abarcan entre el 20% y el 80% del total de la microbiota intestinal (Tan *et al.*, 2018). Facilitan enzimas que posibilitan la hidrólisis de polisacáridos no digeribles, como la fibra, por lo que se potencian con el consumo de prebióticos.

Debido al incremento del conocimiento acerca de la influencia de la microbiota intestinal en la salud, las tendencias muestran un aumento en la demanda de alimentos con probióticos en el futuro, diseñados de manera personalizada para la microbiota de cada individuo (Marcial-Coba *et al.*, 2019). Los avances en las técnicas de modificación del material genético se presentan como herramienta para el desarrollo de probióticos específicos para las necesidades de cada consumidor (O'Toole *et al.*, 2017).

En la actualidad, varios estudios son llevados a cabo para determinar la eficacia de especies presentes en grandes cantidades en el intestino como Clostridiales y Bacteroidales. Para ello debe poder asociarse una cepa específica a un efecto beneficioso en la salud del huésped, sin efectos indeseados como puede ser la producción de toxinas o la presencia de genes de resistencia a antibióticos (O'Toole *et al.*, 2017).

La presencia de Bacteroides se ha relacionado con la reducción de los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en sangre, así como la estimulación del sistema inmune y producción de mucina en el intestino (Tan *et al.*, 2018). En niño con menor población de microorganismos de dicho género, se ha encontrado mayor tendencia a la obesidad. Estos descubrimientos proporcionan fuerte evidencia para la consideración de Bacteroides como eficaces probióticos de nueva generación.

3.15. Prebióticos

Según el Código Alimentario Argentino, se denomina fibra dietaria a “*cualquier material comestible que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano*”. Proviene mayoritariamente de origen vegetal. Puede clasificarse como fibra insoluble aquella que retiene agua, aumenta el bolo fecal, y es difícilmente fermentable. La fibra soluble, no es hidrolizada en la digestión, si no fermentada en el intestino.

Los prebióticos sirven como sustratos para la microbiota intestinal, por lo que se considera que pueden modular la composición y actividad de la microbiota. Al tratarse de compuestos no digeribles, llegan intactos al intestino, y funcionan como alimento para las bacterias allí presentes, condicionando su crecimiento y desarrollo (Holscher *et al.*, 2017).

Tienen la capacidad de modificar la microbiota existente mediante la estimulación de bacterias benéficas nativas fermentativas, como lactobacilos y bifidobacterias (Satokari, 2019). Podrían tener un efecto protector sobre infecciones intestinales, ya que estas especies producen compuestos antimicrobianos. A su vez, otro mecanismo de acción destacable es la capacidad de bloquear los lugares de adherencia de los microorganismos patógenos o sus toxinas. Los GOS (galacto oligosacáridos) poseen estructuras similares a las microvellosidades. De esta manera, las bacterias patógenas se unen a los GOS en lugar de unirse al epitelio intestinal. (Corzo *et al.*, 2015)

Los fructooligosacáridos (FOS), están conformados por azúcares simples de cadena corta, de los cuales, al menos 2 son fructosa.

La simbiosis entre prebióticos y probióticos potencia los beneficios sobre la salud, ya que permite la degradación de polisacáridos no fermentables por las enzimas humanas, permitiendo de esta manera mayor absorción de nutrientes. Se ha comprobado que una dieta variada en fibra estimula mayor diversidad de la microbiota en contraposición con un alto consumo de alimentos procesados.

3.16. Posbióticos y paraprobióticos

Estos nuevos conceptos fueron introducidos recientemente para clasificar aquellas sustancias derivadas de los probióticos, que no implican el consumo de los microorganismos vivos.

Se define como paraprobióticos a las células de microorganismos no viables, o extractos de células, que administrados en cantidades adecuadas proveen un efecto beneficioso sobre la salud.

Los posbióticos incluyen todas las sustancias producidas por los microorganismos en su metabolismo que tienen efecto biológico en el huésped (Nataraj *et al.*, 2020). Se considera que su riesgo es mínimo, ya que no implica el consumo de bacterias vivas. Es por ello que aún existen discusiones en torno a la seguridad de los probióticos, especialmente acerca de su administración a pacientes de riesgo (Żółkiewicz *et al.*, 2020). De aquí el creciente interés acerca de los posbióticos y paraprobióticos, ya que recientes investigaciones demostrarían beneficios similares en la salud, sin la necesidad del consumo de las bacterias vivas, ni de las dificultades tecnológicas de la viabilidad de los probióticos (Cuevas-González *et al.*, 2020)

Los posbióticos pueden ser exopolisacáridos, enzimas, ácidos grasos de cadena corta, o compuestos de la pared celular.

Alguno metabolitos bioactivos en suspensiones de células inactivadas del género *Saccharomyces* han presentado efectos antioxidantes y antiinflamatorios, mientras que metabolitos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han demostrado acciones antibióticas frente a *E. coli*.

Compuestos de la pared celular de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han demostrado efectos inmunoestimuladores, debido a la producción de altas cantidades de ácido lipoteicoico (Żółkiewicz *et al.*, 2020), y capacidad anticancerígena en fracciones de la pared celular de *L. casei* (Cuevas-González *et al.*, 2020).

Exopolisacáridos provenientes de *Lactobacillus kefiranofaciens* y *L. helveticus*, presentaron estimulación del sistema inmune, inhibición de la absorción del colesterol y reducción de la presión sanguínea y los niveles de glucosa. En el caso de beta glucanos, estos potencian la acción de los probióticos, ya que facilitan la adhesión de los mismos a las paredes del intestino.

Algunos metabolitos producidos por la microbiota incluyen la producción de vitamina B12 y folatos. La ventaja es que son producidos in situ, y pueden ser absorbidos en el colon, previniendo la anemia, o mejorando la coagulación en el caso de la vitamina K.

Los principales beneficios atribuidos a los compuestos mencionados son su capacidad inmunomoduladora, antitumoral, prevención de infecciones, efectos antiinflamatorios, aumento de la densidad ósea.

Cabe destacar que la mayoría de los estudios recientemente realizados fueron llevados a cabo en ratones. En estudiantes universitarios, el consumo de leche fermentada con presencia de posbióticos mejoró la calidad de sueño, y su actividad física y mental. De antemano habrían demostrado eficiencia en la prevención de enfermedades crónicas (Cuevas-González *et al.*, 2020). Sin embargo, la investigación acerca de su repercusión en la salud humana tiene un largo camino por delante.

Aun así, se presentan como una alternativa más simple para su aplicación en alimentos, ya que no requieren de la viabilidad de las células al momento de su consumo. La obtención de los posbióticos implica tratamientos con calor, irradiación, altas presiones o ultrasonido para lograr la muerte celular (Cuevas-González *et al.*, 2020).

4. Metodología

4.1. Desarrollo de un producto innovador

El objetivo de este segmento es plantear el desarrollo hipotético de un producto para el mercado local, aplicando el conocimiento adquirido a lo largo de trabajo de investigación llevado a cabo para este trabajo.

Se trata de la propuesta de una golosina adicionada con probióticos. Este tipo de productos no existe en Argentina, por lo que sería una propuesta completamente innovadora a nivel nacional. A pesar de existir productos de este rubro que destacan cualidades como “sin azúcar”, “con vitaminas y minerales”, y hasta claims como “alto en colágeno”, no existen aún con aplicación de probióticos.

El punto más disruptivo de esta propuesta es la aparición de productos con probióticos que no se encuentren refrigerados.

Según FMCG Gurus, una empresa dedicada a la investigación de tendencias del mercado, los consumidores actualmente buscan un acercamiento holístico e integral con respecto a su salud, buscando ingredientes nobles que la potencien. Tras los efectos de la pandemia, el principal objetivo es la mejora del sistema inmune. Los alimentos funcionales se encuentran en pleno auge, principalmente por el cambio de rumbo marcado por consumidores que ponen foco en los ingredientes y procesos productivos. Los términos vitaminas, minerales, antioxidantes, son frecuentemente buscados, así como los probióticos (Tendencias del consumidor 2022, informe Revista Uno)

Pero seguido a esto, también buscan productos indulgentes dentro del mismo rubro. La búsqueda de un momento de placer y escapismo sin que interfiera con sus objetivos saludables. Es por ello, que la propuesta de una golosina con probióticos se amolda perfectamente a esta creciente demanda.

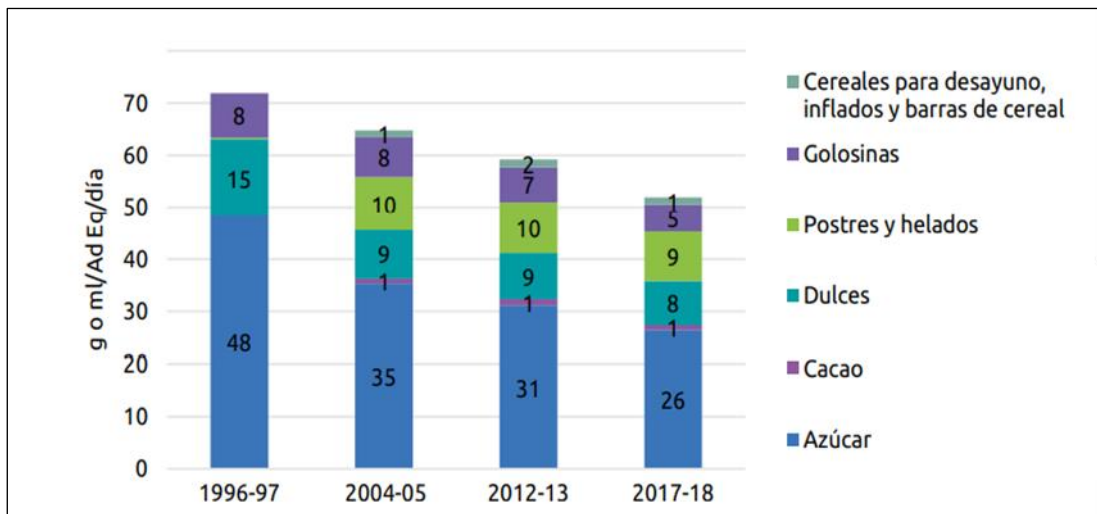


Fig 15: Consumo aparente de azúcar, dulces, postres y golosinas según período.

Fuente: CESNI, 2013 – La mesa argentina en las últimas dos décadas.

Las gomitas o confituras de azúcar pueden enmarcarse dentro del rubro de las golosinas para su análisis de consumo.

La elección de realizar la aplicación en gomitas está fundamentada en el volumen de ventas que representa este producto en el mercado de golosinas. Según datos de una de las principales empresas elaboradoras de golosinas, se producen más de 500 toneladas mensuales. Esto representa casi un 50% del total de producción de dicha empresa.

Las gomitas se presentan como un producto sumamente versátil en cuanto a sabores, formas, ingredientes. Pueden encontrarse en el mercado gomitas ácidas, rellenas, con variadas formas, aceitadas, azucaradas, confitadas, adicionadas con vitaminas o colágenos, convirtiéndolas así en un producto funcional.

4.1.1. Formulación y proceso

4.1.1.1. Elección de cepa probiótica

Para el desarrollo del producto se eligió un probiótico del mercado que es estable debido a la formación de esporas, lo que abre un camino nuevo en la formulación de productos que no necesitan refrigeración.

Ganeden BC³⁰[®]: Para la obtención de este producto se realiza una fermentación controlada de un cultivo puro de *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086, y posteriormente, las nuevas células y esporas son recuperadas de este proceso. El producto comercial se encuentra deshidratado junto con inulina. El probiótico elegido contiene 15 billones UFC/g. La dosis mínima para considerarse probiótico es de 34 mg. Esta información fue obtenida de la ficha técnica del producto comercializado por la empresa Kerry.

El principal diferencial de este producto es la tolerancia a los cambios de temperatura, sin necesidad de refrigeración, debido a que son las esporas, y no las células viables aquellas que se encapsulan. Esto provee una gran ventaja frente a otros productos comerciales, ya que puede aplicarse en todo tipo de producto, como las golosinas.

La inulina es un carbohidrato no digerible, extraído de la raíz de achicoria. Es considerada un importante prebiótico basado en su capacidad de potenciar el desarrollo de bacterias de los géneros de las bifidobacterias y lactobacilos. Esto genera a su vez, una relación positiva frente a bacterias potencialmente patógenas, como las de la especie *Clostridium spp*, disminuyendo su prevalencia en el intestino (Madrigal & Sangronis, 2007). Se compone de una cadena de moléculas de fructosa, pudiendo tener tanto una molécula de fructosa como de glucosa terminal. Comúnmente se emplea el término “fructanos” para englobar estos compuestos.

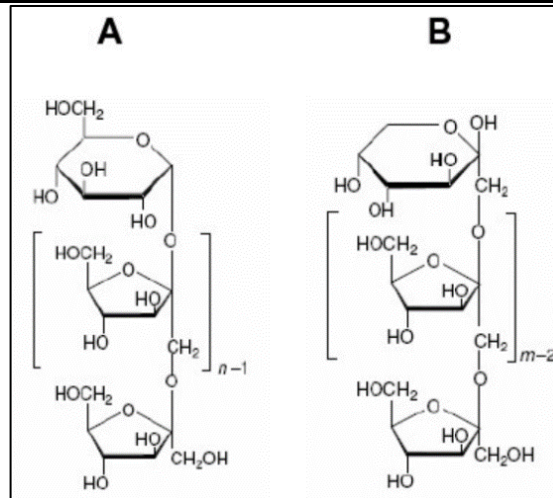


Fig 16: Estructura química de la inulina. A: con una molécula terminal de glucosa. B: con una molécula terminal de fructosa

Debido a su estructura química, la inulina no es hidrolizada por las enzimas digestivas, por lo que llega inalterada al tracto gastrointestinal. Es un compuesto prebiótico, ya que una vez en el intestino, es digerida por las bacterias allí presentes.

Es por esta cualidad que es utilizada como agente de recubrimiento en productos encapsulados. Al no ser hidrolizada en el tramo superior del tracto digestivo, provee protección al agente activo en cuestión, siendo liberado recién en el momento de su llegada al intestino.

4.1.1.2. Proceso de elaboración

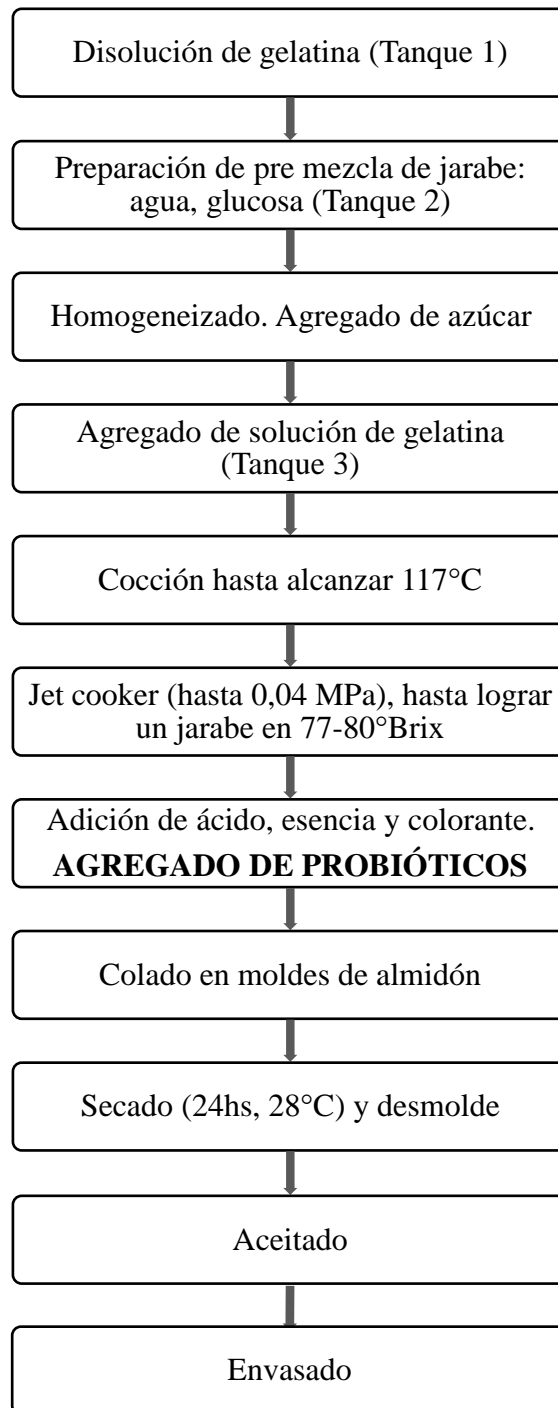


Fig 17: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de gomitas con probióticos aceitadas.

4.1.1.3. Detalle del proceso

1. Al inicio del proceso debe verificarse la limpieza y ausencia de cuerpos extraños en los equipos.
2. Cargar agua de red en uno de los tanques (Tanque 1). Cargar la cantidad establecida de gelatina, volcando lentamente en forma de lluvia para evitar la formación de grumos. Agitar hasta homogeneizar.
3. En un segundo tanque (Tanque 2) cargar agua y jarabe de glucosa y agitar. Incorporar la cantidad de azúcar y continuar la agitación hasta disolver.
4. Descargar la pre mezcla en un tercer tanque (Tanque 3) junto con la solución de gelatina. Cocinar hasta los 117°C. Luego encender la bomba de vacío. Controlar los sólidos del jarabe, que deben encontrarse entre 77 y 80°Brix.
5. Dosificar la cantidad correspondiente de ácido, esencia y colorante. Adicionar los **0,5 kg de cepa probiótica *Ganeden BC30*** de forma manual en este mismo tanque. Agitar y vaciar el jarabe en el tanque de dosificación de la coladora.
6. Colar en los moldes con almidón. Debe controlarse la humedad del almidón, que debe encontrarse entre 5 y 7% para permitir el correcto desmolde. Luego dejar secar 24 horas. Desmoldar.
7. Aceitar en tambor mediante rociado. Envasar.

4.1.1.4. Formulación:

ELABORACIÓN SOLUCIÓN DE GELATINA			
Ingrediente	Cantidad	Unidad	% en kg
Agua proceso	45,0	kg	60%
Gelatina	30,0	kg	40%
Total	75,0	kg	100%

°Brix: 0,34

ELABORACION JARABE PRE MEZCLA			
Ingrediente	Cantidad	Unidad	% en kg
Jarabe de glucosa	190,0	kg	39,2%
Agua proceso	20,0	kg	4,1%
Azúcar	200,0	kg	41,2%
Solución de gelatina	75,0	kg	15,5%
Total	485,0	kg	100%

°Brix: 0,74

°Brix Jarabe post cocción: 0,78

ELABORACIÓN SOLUCIÓN DE ACIDO CÍTRICO			
Ingrediente	Cantidad	Unidad	% en kg
Agua proceso	10	kg	50%
Acido cítrico	10	kg	50%
Total	20	kg	100%

RELACIÓN JARABE FINAL			
Ingrediente	Cantidad	Unidad	% en kg
Jarabe mezcla	460,0	kg	97,3%
Sc Color Rojo	2,30	kg	0,49%
Esencia Frambuesa	2,30	kg	0,49%
Sc Acido cítrico	7,50	kg	1,59%
Bacillus coagulans BC30	0,53	kg	0,11%
Total	472,6	kg	100%

Tabla I: Formulación por pasos de gomitas con adición de probióticos.

4.1.2. Marco legal

Este producto se rotularía como: *Pastillas de goma fantasía con probióticos sabor frambuesa.*

Para poder registrar legalmente el producto con la frase “con probióticos” debe seguirse el trámite contemplado en la disposición de la ANMAT N° 2873/2012, que prevé el funcionamiento de la “Comisión Evaluadora de Probióticos y Prebióticos”. Deberá presentarse una carta al INAL, en la cual se solicite el registro del alimento con probióticos. Según con lo establecido en el art. 1389 del Código Alimentario Argentino, para poder incluir el término “con probióticos” deberán ensayarse in vivo tal cual será consumido, para garantizar la funcionalidad que se le atribuye. Cabe destacar, que al tratarse de una cepa comercial, este ítem estaría cubierto.

Según la Ley 27.642 de Promoción de la Alimentación Saludable, el producto en cuestión llevaría en su frente un octógono con la leyenda “EXCESO DE AZÚCARES”.



Fig 18: Sello de advertencia establecido en la Ley 27.642 de Promoción de la Alimentación Saludable.

4.1.3. Información nutricional:

INFORMACIÓN NUTRICIONAL		
Porción: 30 g		
	Porción	% VD (*)
Valor energético	81 kcal / 318 kJ	4
Carbohidratos (g)	19	6
Proteínas (g)	1,2	1
Grasas totales (g)	0	-
Grasas saturadas (g)	0	-
Grasas trans (g)	0	-
Fibra alimentaria (g)	0	-
Sodio (mg)	0	-
(*) Valores diarios recomendados en base a una dieta de 200 kcal u 8400 kJ. Sus valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de sus necesidades energeticas.		

Tabla II: Formulación por pasos de gomitas con adición de probióticos

Luego de analizado el panorama de los probióticos en el mercado, es evidente que este es un rubro que Argentina aún no ha sido explotado al máximo de sus capacidades. Sin embargo, surge en simultáneo la propuesta del uso de probióticos en el nivel inicial en la cadena productiva. Se trata del uso de probióticos en la industria avícola, como reemplazo del uso de antibióticos como promotores de crecimiento. En este caso, los probióticos utilizados no llegan viables al consumidor final, pero sí implican un cambio del paradigma productivo en el cual nos encontramos, migrando a un proceso con tendencia a las etiquetas limpias.

A continuación se presentan las bases de la propuesta mencionada, administrando el probiótico BioPlus2B en aves reproductoras padres.

4.2. Administración de probióticos en aves reproductoras padres

4.2.1. BioPlus 2B

Se compone de Carbonato de Calcio, Silicoaluminato de sodio, productos secos de fermentación de *Bacillus Licheniformis* y productos secos de fermentación de *Bacillus Subtilis*. Es fuente de microorganismos viables. Contiene *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* en un ratio 1:1 y está formulado especialmente para su uso en alimentación animal.

4.2.2. Antecedentes de uso del BioPlus 2B

En el año 2003, Alexopoulos *et al.*, estudiaron la salud y productividad de ganado porcino a lo largo de toda la etapa productiva, desde el destete hasta las últimas etapas. Se observaron 5 grupos de 54 cerdos cada uno. El primer grupo fue alimentado sin probióticos, al segundo grupo se le administró BioPlus 2B únicamente en la etapa de destete. Los tres grupos restantes fueron alimentados al igual que el segundo grupo, pero luego fueron administrados de tres dosis de BioPlus 2B en las etapas de crecimiento, en baja, media y alta dosis correspondientemente. Encontraron que los animales tratados con BioPlus 2B presentaron menor tasa tanto de enfermedad como de mortalidad. A su vez, el aumento de peso, la conversión alimenticia y la calidad de la canal fue notablemente mayor en aquellos grupos tratados con BioPlus 2B, y aun mayor en los grupos 4 y 5, con dosis medias y altas. Los grupos administrados con BioPlus 2B demostraron mejores índices de productividad en comparación al grupo control, en relación con la dosis administrada.

Los períodos iniciales posteriores al destete son momentos cruciales donde los animales se ven enfrentados a diversos factores de estrés que causan una distorsión en el equilibrio de la microbiota intestinal, siendo más susceptibles a bacterias patógenas como *E. Coli*, *Salmonella spp* y *Clostridium*. Para controlar dichas bacterias patógenas se han utilizado antibióticos como promotores de crecimiento, que al mismo tiempo modifican la totalidad de la microbiota intestinal.

En base a los resultados concluyeron que es lógico considerar que debido a la capacidad de modificar la microbiota pueden tener un efecto promotor de crecimiento. El uso de probióticos parece ser una alternativa al uso de antibióticos como promotores de crecimiento

ya que se trata de microorganismos inocuos que pueden modificar la microbiota positivamente, mediante la competencia con la flora patógena y la estimulación del sistema inmune.

4.2.3. Antecedentes en otras especies

Bacillus subtilis es comúnmente utilizada como cepa probiótica en especies animales. Con el fin de comprobar los efectos sobre la salud tanto en animales como en humanos, se alimentaron patos con cepas de *Bacillus subtilis* adicionadas como probióticos.

En dicho estudio se encontró que los patos tratados con probióticos presentaron mayor peso corporal, así como mayor altura de las vellosidades intestinales, lo que concluye una mejora en el rendimiento. Además, se encontraron efectos de estimulación del sistema inmune, con la presencia de mayor cantidad de factores pro inflamatorios y proteínas antivirales. Otro estudio demostró que la suplementación con *B. subtilis* indujo la formación de citoquinas antiinflamatorias, péptidos reguladores del sistema inmune, que participan en la respuesta innata y adaptativa (Raiput *et al.*, 2013). Algunos animales fueron expuestos a *E. coli*, frente al cual aquellos alimentados con probióticos presentaron menor tasa de mortalidad en comparación al grupo control (Guo *et al.*, 2016).

4.2.4. Toma de muestras

La primera muestra fue tomada en el mes de noviembre de 2019, a partir de la materia fecal de jaulas de aves reproductoras padres. Se analizó en Argentina con personal y equipos de la empresa Chr. Hansen traídos de Dinamarca.

Se comparó la variedad y cantidad de microbiota entre reproductores padres tratados con antibióticos promotores de crecimiento en el alimento, y reproductores padres alimentados con probióticos BioPlus2B administrados en el alimento. En un primer resultado parcial, se observó que la diversidad de bacterias presentes en el tracto intestinal de las aves pertenecientes al segundo grupo era notablemente mayor.

La segunda muestra fue tomada el 18 de mayo de 2020. Debido a la pandemia por Covid-19, sólo el tutor del presente trabajo fue autorizado para acercarse a la granja a realizar el muestreo, con los protocolos de seguridad correspondientes.

Las muestras fueron tomadas a partir de la materia fecal de las aves reproductoras. Para ello, se colocaron bolsas de consorcio en los pisos, donde las aves defecarían. Al tratarse de animales costosos y delicados, ya que son genéticamente muy importantes, no se pudo ingresar a los galpones por razones de bioseguridad.

Las bolsas de las muestras fueron acercadas a la entrada de la granja, donde se tomaron 40 muestras por duplicado, con el objetivo de poseer una contra muestra ante cualquier posible inconveniente. Se tomaron cuatro grupos de muestras: dos grupos pertenecientes a dos lotes administrados con probióticos, y dos grupos de dos lotes control sin tratamiento de probiótico, con antibióticos.

Los lotes muestreados con probióticos tenían 188 y 212 días de edad respectivamente. Los lotes control de 238 y 261 días de edad.

Según observaciones del personal de la granja, uno de los lotes tratados con probióticos denotó mejores resultados productivos, siendo estos, buen peso y un alto porcentaje de postura.

La muestra fue enviada a Dinamarca el 22 de junio de 2020 para su análisis mediante el kit rápido de secuenciación de ADN que posee la empresa. El informe de los resultados obtenidos y su comparación con los resultados anteriores demostró un incremento en la diversidad de las bacterias benéficas presentes en el tracto intestinal de las aves.

4.2.5. Análisis de resultados

En la segunda etapa de muestreo se tomaron 40 muestras, segmentadas en 4 grupos. De ellas, 20 muestras correspondían a grupos control, provenientes de lotes de 261 y 238 días de edad. Las 20 muestras restantes fueron tratadas con BioPlus 2B, pertenecientes a lotes de 188 y 212 días de edad.

Las muestras tomadas el 18 de mayo del 2020 fueron enviadas a Dinamarca para ser analizadas por la empresa Chr. Hansen mediante el kit rápido de secuenciación.

Al no existir antecedentes de análisis en granjas comerciales, los resultados obtenidos no esperaban ser comparados con datos previos. A priori, los resultados observados

indicaron un incremento en la diversidad de la microbiota intestinal y en la cantidad de la misma. Esto se observa en el índice de Shannon y Simpson.

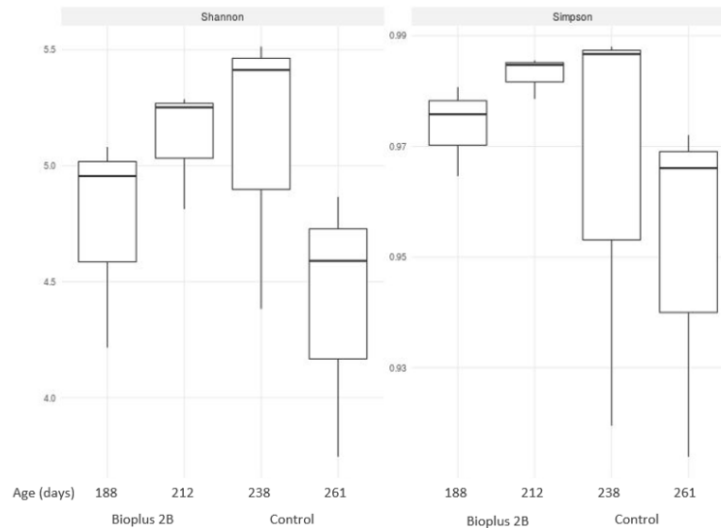


Fig 19: Índices de Shannon y Simpson de los estudios realizados sobre las aves. Fuente: Chr. Hansen

Los índices de Shannon y Simpson son indicadores de diversidad. La diversidad considera la abundancia y uniformidad de las especies (Bibi and Ali, 2013). El índice de Simpson mide la probabilidad que dos individuos al azar pertenezcan a la misma especie. Cuanto más alta es dicha probabilidad, menos diversa es la comunidad (Espinosa, 2019). El índice de Shannon mide la diversidad, cuantificando la cantidad de especies y la cantidad de individuos de cada especie.

Según la RAE, se define la robustez a una “cualidad de robusto”, “*que tiene fuertes miembros y firme salud*”. El índice de robustez, (IR) fue calculado por la empresa Chr. Hansen en Dinamarca, en base a datos propios y bibliografía, basándose en factores que correlacionan la salud con el rendimiento. El IR se correlaciona con una mayor cantidad y diversidad de la microbiota. A mayor edad en aves reproductoras padres la microbiota se encuentra más desarrollada y estabilizada, por lo que este índice tiende a aumentar con la edad.

Se observó un incremento de *Lactobacillus* en ambos grupos tratados con BioPlus 2B, duplicando los valores de los grupos control. Ciertos estudios han relacionado este

grupo de bacterias con mayor productividad, lo cual se ve reflejado en los valores de RI obtenidos. A su vez, los recuentos de *Streptococcus* en los grupos control fueron entre 3 y 5 veces mayores a los grupos alimentados con BioPlus 2B, relacionado con un menor peso en las aves.

5. Prospectiva

No hay dudas que el mercado está cambiando de rumbo, y lo hace cada vez más rápido. Y esto debido a la fuerte presión que ejercen las elecciones y las demandas de consumidores cada vez más informados.

Habiendo vivido una etapa de pandemia, el cambio en la mentalidad de la población y su perspectiva sobre la salud es tanto más veloz y evidente.

Esta investigación es una exposición de lo que parece ser sólo el comienzo de un largo camino que está transitando toda la población. Esta transformación arranca con los consumidores, y obliga a las empresas a adaptarse. Esto no deja de ser un desafío para la industria, para lograr adaptarse a la demanda de sus clientes, así como para lograr posicionarse competitivamente frente a sus colegas.

Estos cambios tan notorios también marcan precedentes para el futuro, dejando entrever el gran poder que pueden ejercer las exigencias de los consumidores sobre el mercado masivo.

Además de un ejercer un efecto probiótico en los consumidores, mejora los problemas relacionados con la resistencia a los antibióticos, y evitan afectar la microbiota de los consumidores. Por lo tanto, ¿por qué no incluirlos desde las bases de la cadena?

6. Conclusión

Este trabajo es sólo una primera exposición de una tendencia que se viene gestando a nivel mundial, pero escasamente en el país, pero que, muy prontamente veremos llegar a Argentina en su máximo auge.

Los probióticos han sido estudiados a lo largo de varios años, y sus implicancias a nivel intestinal, neuronal, dermatológico, hormonal son ampliamente conocidas. El eje intestino-cerebro cobra cada vez más relevancia.

Es nuestro deber como profesionales de la industria aportar a la salud de la población. Tanto los avances de investigación, como los avances de tecnologías de aplicación de probióticos en alimentos facilitan esta tarea. Métodos como la encapsulación, desarrollos de probióticos estables a cambios de temperatura, dejan el camino allanado para lograr productos que sean funcionales a las necesidades de una población que es muy variada en sus elecciones.

El desarrollo de productos con probióticos puede ser una oportunidad para brindar servicio a grupos de la población, que no cuenta con esta información, y que padezcan de alguna carencia nutricional.

El abanico de posibilidades es muy amplio, desde la implicancia nutricional, los beneficios en la salud, el impacto ambiental debido a las mejoras en la productividad en la avicultura y ganadería, y el gran aporte social que se podría lograr. Los probióticos son tendencia y el futuro de la alimentación.

7. Bibliografía

1. ANMAT (2014). Código Alimentario Argentino. Secretaria de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo Nacional. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>
2. BELTRÁN DE HEREDIA, María Rosario. Alimentos funcionales. Farmacia Profesional Vol. 30, Núm. 3, Mayo-Junio 2016
3. BIBI, FEHMEEDA & ALI, ZULFIQAR. (2013). Measurement of diversity indices of avian communities at Taunsa Barrage Wildlife Sanctuary, Pakistan. Journal of Animal and Plant Sciences. 23. 469-474.
4. CAPELA P, HAY TKC, SHAH NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International 39 (2006) 203–211. DOI:10.1016/j.foodres.2005.07.007
5. CASTILLO-ESCADÓN V., FERNÁNDEZ-MICHEL S.G., CUETO-WONG M.C. Y RAMOS-CLAMONT MONTFORT G. Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. DOI: 10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173
6. CORZO N., ALONSO J. L., AZPIROZ F., CALVO M. A., CIRICI M., LEIS R., LOMBÓ F., MATEOS-APARICIO I., PLOU F. J., RUAS-MADIEDO P., RÚPEREZ P., REDONDO-CUENCA A., SANZ M. L. Y CLEMENTE A. Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. Nutr Hosp 2015;31(Supl.1):99-118. DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715
7. CUEVAS-GONZÁLEZ, P.F., LICEAGA, A.M., AGUILAR-TOALÁ, J.E., Postbiotics and Paraprobiotics: From concepts to applications, Food Research International (2020), DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109502
8. DIMIDI E., ROSE COX S., ROSSI M., WHELAN K. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease, 2019. DOI:10.3390/nu11081806
9. ESPINOSA CI. Medidas de Alpha Diversidad., 2019

-
10. FARAG M.A, JOMAA S.A, EL-WAHED A.A, EL-SEEDI H.R. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients* 2020, 12, 346; DOI:10.3390/nu12020346
 11. FARIAS M. M Y KOLBACH M. Probióticos y prebióticos: ¿beneficio real en dermatología? *Piel* (Barc., Ed. impr.) 2011;26(5):227–230. DOI:10.1016/j.piel.2010.12.010
 12. FMCG Gurus: Probiotics trends in Europe 2022 –recuperado de <https://fmcggurus.com/>
 13. FRONTELA, CARMEN, ROS, GASPARD, & MARTÍNEZ, CARMEN. (2008). Empleo de fitasas como ingrediente funcional en alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(3), 215-220.
 14. GABRIEL, I., LESSIRE, M., MALLET, S., GUILLOT, JF. Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 62, September 2006. DOI: 10.1079/WPS2006111
 15. HOLSCHER Hannah D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2017 Mar 4;8(2):172-184. DOI: 10.1080/19490976.2017.1290756.
 16. JÄGER, RALF & PURPURA, MARTIN & FARMER, SEAN & CASH, HOWARD & KELLER, DAVID. (2018). Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Improves Protein Absorption and Utilization. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 10.1007/s12602-017-9354-y.
 17. JESICA E. BLAJMAN, MARÍA V. ZBRUNA, DIEGO M. ASTESANA, AYELÉN P. BERISVIL, ANALÍA ROMERO SCHARPEN, MARCIA L. FUSARI, LORENA P. SOTO, MARCELO L. SIGNORINI, MARCELO R. ROSMINI Y LAUREANO S. FRIZZO. Probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista Argentina de Microbiología*. 2015;47 (360-367). DOI: 10.1016/j.ram.2015.08.002
 18. JUNGENSEN M, WIND A, JOHANSEN E, CHRISTENSEN JE, STUER-LAURIDSEN B, ESKESEN D. (2014) The Science behind the Probiotic Strain

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* BB-12(®). *Microorganisms*. 2014 Mar 28;2(2):92-110. DOI: 10.3390/microorganisms2020092

19. KIM SK, GUEVARRA RB, KIM YT, KWON J, KIM H, CHO JH, KIM HB AND LEE JH. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2019), 29(9), 1335–1340. DOI: 10.4014/jmb.1906.06064

20. LARREA-ÁLVAREZ, Marco; LARREA-ÁLVAREZ, César; ORTEGA-PAREDES, David; VINUEZA BURGOS, Christian; ŠEFKOVA, Miroslava. Uso de probióticos para estimulación del sistema inmune en pollos de engorde. *Revista Científica Ecuatoriana*, 2020. DOI:10.36331/revista.v7i1.85.

21. MADRIGAL, LORENA, & SANGRONIS, ELBA. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4), 387-396.

22. MARCIAL-COBA MS, KNOCHEL S, SANDRIS NIELSEN D. Low-moisture food matrices as probiotic carriers. *FEMS Microbiology Letters*, 366, 2019 DOI: 10.1093/femsle/fnz006

23. MARCO Maria L, HEENEY Dustin, BINDA Sylvie, CIFELLI Christopher J, COTTER Paul D, FOLIGNÉ Benoit, GÄNZLE Michael, KORT Remco, PASIN Gonca, PIHLANTO Anne, SMID Eddy J and HUTKIN Robert. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology* 2017, 44:94–102. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.11.010

24. MILLER C.W., NGUYEN M.H., ROONEY M and KAILASAPATHY K. The Control of Dissolved Oxygen Content in Probiotic Yoghurts by Alternative Packaging Materials. *Packag. Technol. Sci.* 2003; 16: 61–67; DOI:10.1002/pts.612

25. MOREIRA GUIMARÃES, Gabriele; SOARES, Letícia Aparecida; LOPES SILVA Tuânia Natacha; QUINTINO DE CARVALHO, Iracema Luisa, VALADARES, Helder Magno Silva; SODRÉ, George Andrade; GONÇALVES, Daniel Bonoto; NEUMANN, Elisabeth; GUIMARÃES DA FONSECA, Flávio; VINDEROLA, Gabriel; GRANJEIRO, Paulo Afonso; and TEIXEIRA DE MAGALHÃES, Juliana. Cocoa Pulp as Alternative Food Matrix for Probiotic Delivery. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2019, Vol. 10. DOI: 10.2174/2212798410666190408151826

-
26. MOSTAFA H. Lyophilized Probiotic Lactic Acid Bacteria Viability in Potato Chips and Its Impact on Oil Oxidation. *Foods* 2020, 9, 586; DOI:10.3390/foods9050586
27. NAN FU, SONG HUANG, JIE XIAO, XIAO DONG CHEN (2018) Producing Powders Containing Active Dry Probiotics With the Aid of Spray Drying. *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, Volume 85. DOI.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.003
28. NATARAJ, B.H., ALI, S.A., BEHARE, P.V. *et al.* Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microb Cell Fact* 19, 168 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
29. ORE B., YERALD, PICHILINGUE L., E. Renzo, & VALDERRAMA NEGRÓN, Ana C.. (2020). Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga *Macrocystis pyrifera*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(3), 276-287. DOI: doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.300
30. OTLES Semih and CAGINDI Ozlem. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition* · February 2003. DOI: 10.3923/pjn.2003.54.59
31. O'TOOLE PW, MARCHESI JR, HILL C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol.* 2017 Apr 25;2:17057. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.57
32. PETERSEN, C., & ROUND, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 16(7), 1024-1033.
33. Revista Uno LLYC. Informe “Tendencias del consumidor 2022”,
34. ROBLES-ALONSO, VIRGINIA, & GUARNER, FRANCISCO. (2013). Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana. *Nutrición Hospitalaria*, 28(3), 553-557. DOI:10.3305/nh.2013.28.3.6601
35. RODRÍGUEZ YA, ROJAS AF, RODRÍGUEZ-BARONA S. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud* 2016; 15(2): 106-115 DOI: 10.17151/biosa.2016.15.2.10

-
36. RODRÍGUEZ YA, ROJAS AF, RODRÍGUEZ-BARONA S. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud* 2016; 15(2): 106-115 DOI: 10.17151/biosa.2016.15.2.10
37. RODRÍGUEZ-BARONA S., GIRALDO G.I, MONTES L.M. Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información tecnológica* Vol. 27(6), 135-144 (2016). DOI: 10.4067/S0718-0764201600060001
38. RODRÍGUEZ-BARONA S., GIRALDO G.I, MONTES L.M. Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información tecnológica* Vol. 27(6), 135-144 (2016). DOI: 10.4067/S0718-0764201600060001
39. SATOKARI R. Modulation of Gut Microbiota for Health by Current and Next-Generation Probiotics. *Nutrients*. 2019 Aug 15;11(8):1921. DOI: 10.3390/nu11081921
40. SHORI, AMAL BAKR. (2015). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*. 13. 10.1016/j.fbio.2015.11.001.
41. SIVAMARUTHI BS, FERN LA, RASHIDAH PG HJ ISMAIL, DSN; CHAIYASUT, C. The influence of probiotics on bile acids in diseases and aging *Biomedicine & Pharmacotherapy* 128. Doi: 10.1016/j.biopha.2020.110310
42. TAN H, ZHAI Q, CHEN W. Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Res Int*. 2019 Feb;116:637-644. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.088
43. TEJEIRO M., PEREZ P.F., DE ANTONI G.L., GOLOWCZYC M.A. Suitability of kefir powder production using spray drying. *Frin* (2017). DOI:10.1016/j.foodres.2018.06.023
44. TERPOU, Antonia; PAPADAKI, Aikaterini; LAPPA, Iliada K.; KACHRIMANIDOU, Vasiliki; BOSNEA, Loulouda A. and KOPSAHELIS, Nikolaos. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved
-

Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients* 2019, 11, 1591;
DOI:10.3390/nu11071591

45. VALENZUELA B. Alfonso, VALENZUELA Rodrigo, SANHUEZA Julio, MORALES I Gladys. Alimentos funcionales, nutraceúticos y FOSHU: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Rev Chil Nutr* Vol. 41, N°2, Junio 2014

46. VÁZQUEZ-CHÁVEZ L Y VIZCARRA-MENDOZA M. Secado por lecho fluidizado del trigo y su calidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 7, No. 2 (2008) 131-137

47. VINDEROLA CG, MOCCHIUTTI P, REINHEIMER JA. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *J Dairy Sci.* 2002 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74129-5.

48. ZAPATA M.E, ROVIROSA A., CARMUEGA E. La mesa Argentina en las últimas dos décadas: cambios en el patrón de consumo de alimentos y nutrientes 1996-2013. *Centro de Estudios sobre Nutrición Infantil - CESNI*, 2016.

49. ŻÓŁKIEWICZ JAKUB, MARZEC ALEKSANDRA, RUSZCZYŃSKI MAREK AND FELESZKO WOJCIECH. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. *Nutrients* 2020, 12, 2189; DOI:10.3390/nu12082189

Anexo

1. Ficha técnica del producto GanedenBC30.

	Code: 30732156	Issue date: 12/18/2019
 TECHNICAL INFORMATION Kerry Inc. 3400 Millington Road Beloit, WI 53511 USA Tel: 608.299.5100 www.kerry.com		
 PRODUCT SPECIFICATION		
 PRODUCT DETAILS		
Part Number	30732156	
SAP Code		
Product Name	GanedenBC30 15B CFU AF	
Product Description	Cell mass and spores are recovered from a controlled fermentation of a pure culture of Bacillus coagulans GBI-30, 6086. The product is a dried powder also containing Organic Inulin. This product does not contain allergens from the eight major United States allergenic food groups.	
 INGREDIENT DECLARATION		
Organic Inulin, Bacillus Coagulans GBI 30 6086		



Code: 30732156
 Issue date: 12/18/2019

TECHNICAL INFORMATION

Kerry Inc.
 3400 Millington Road Beloit, WI 53511 USA
 Tel: 608.299.5100
 www.kerry.com

KEY PERFORMANCE PARAMETERS

	Min	Max	Units	Method
Arsenic		1	PPM	EPA 3050/6020 USP 730
Cadmium		0.5	PPM	EPA 3050/6020 USP 730
Lead		3	PPM	EPA 3050/6020 USP 730
Mercury		0.1	PPM	EPA 3050/6020 USP 730
Water Content		9	%	AOAC #925.40
Enumeration	Minimum of 1.5 X 10 ¹⁰ (15 Billion/ gram CFU)		Ganeden TM-58	

PARTICLE SIZE DISTRIBUTION

100% through 40 mesh
 80% through 80 mesh

PHYSICAL DESCRIPTION

Color: Beige to light tan powder
 Form: Powder

MICROBIOLOGICAL DATA

Coliforms	< 10 cfu/g	BAM CH. 4
E. Coli	NOT DETECTED	BAM CH. 4
Listeria	NOT DETECTED	AOAC #996.14
Pseudomonas Aeruginosa	NOT DETECTED	Internal Method
Staphylococcus aureus	NOT DETECTED	AOAC #975.55
Salmonella	NOT DETECTED	AOAC #999.08
Yeasts & Moulds	< 100 cfu/g	BAM CH. 18

SHELF-LIFE & STORAGE

1095 days unopened Cool, dry storage conditions at @ 72 F or less.