



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Leches fermentadas probióticas: aspectos tecnológicos y efectos
en la salud.

Probiotic fermented milks: technological aspects and health effects.

Autora:

Lucía Pablo Gil

Directora:

M^a Lourdes Sánchez Paniagua

Facultad de Veterinaria

2020-2021

1. RESUMEN / ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVOS	8
4. METODOLOGÍA	8
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
5.1. Microorganismos utilizados en la elaboración de leches probióticas	10
5.2. Factores que influyen en la viabilidad de los microorganismos presentes en las leches probióticas	13
pH y acidez titulable	13
Oxígeno y peróxido de hidrógeno	14
Aditivos	14
Temperatura de incubación	15
Condiciones de inoculación	15
Temperatura y tiempo de almacenamiento	16
Factores de crecimiento y promotores	17
Factores de protección	17
Microencapsulación	17
5.3. Efectos en la salud de las leches fermentadas probióticas	19
5.3.1. Prevención y reducción de las diarreas causadas por rotavirus, antibióticos o por intolerancias a la lactosa.	19
5.3.2. Retraso o inhibición de la aparición de cáncer.	21
5.3.3. Prevención de contraer enfermedades intestinales y el alivio de dolores en el tracto intestinal en la población sana.	
5.3.4. Alivio de los síntomas de enfermedades inflamatorias y síndromes intestinales.	22
5.3.5. Alivio del estreñimiento.	22
5.3.6. Prevención o alivio de alergias y dermatitis atópica en lactantes.	23
5.3.7. Prevención de infecciones del tracto respiratorio (resfriado común, influenza) y otras	

enfermedades infecciosas, así como tratamiento de infecciones urogenitales.	23
5.4. Estudio para conocer la aceptación de las leches fermentadas por los consumidores.	24
5.5. Análisis de la legislación Española y Europea referente a las leches fermentadas probióticas.	29
6. CONCLUSIÓN / CONCLUSION	31
7. VALORACIÓN PERSONAL	32
8. BIBLIOGRAFÍA	32

1. RESUMEN

Las leches fermentadas son alimentos consumidos desde la antigüedad, seguramente se originaron por las fermentaciones espontáneas que la leche experimentaba al mantenerla a temperatura ambiente. Esta fermentación se produce por la acción de microorganismos adecuados teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación de las caseínas. Algunos de los microorganismos usados en la fermentación de la leche se consideran probióticos. Los probióticos han sido definidos por la FAO como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”. Principalmente, son bacterias ácido lácticas, en su mayoría, de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Actualmente, los yogures y otras leches fermentadas son el principal grupo de productos que aporta probióticos a la población, por la presencia de estos microorganismos en ellos y por la gran aceptación que tienen estos productos.

Para llevar a cabo este trabajo, se ha realizado una búsqueda bibliográfica a través de diferentes bases de datos y utilizando palabras clave relacionadas con el tema de las leches fermentadas con propiedades probióticas. Se ha realizado además un estudio mediante una encuesta lanzada a través de WhatsApp que ha permitido valorar el conocimiento y el consumo de la población de leches fermentadas con propiedades probióticas.

Los datos aportados por los estudios revisados han permitido profundizar en el conocimiento de las leches fermentadas probióticas, sus aspectos tecnológicos y los efectos en la salud, pudiendo responder así a los objetivos planteados. Se ha recopilado información sobre los principales microorganismos usados como probióticos, las formas en las que se pueden incorporar en las leches fermentadas, las características que deben de tener para ser incorporados y los diferentes mecanismos de acción una vez son ingeridos. Además, se ha realizado un análisis sobre algunos de los factores que influyen en la viabilidad de estos microorganismos en las leches fermentadas, entre los que cabe destacar, el pH y la acidez titulable, el oxígeno y peróxido de hidrógeno, los aditivos, la temperatura de incubación, las condiciones de inoculación, la temperatura y tiempo de almacenamiento, los factores y promotores de crecimiento, los factores de protección y las técnicas de microencapsulación. También han sido analizados los posibles efectos que tienen estas leches probióticas en la salud humana, revisando los estudios científicos publicados en los últimos años. Gracias a la encuesta se ha podido valorar el conocimiento y el consumo de la población de leches fermentadas con propiedades probióticas. Finalmente, se ha analizado la legislación en la que se hace referencia a estos productos.

ABSTRACT

Fermented milks have been consumed since ancient times, they surely originated from the spontaneous fermentations that milk undergoes when keeping it at room temperature. This fermentation is carried out by the action of suitable microorganisms, resulting in the reduction of pH, with or without casein coagulation. Some of the microorganisms that take part in milk fermentation are considered probiotics. Probiotics have been defined by the FAO as "Live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host." Mainly, they are lactic acid bacteria, mostly from *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera. Nowadays, yogurts and other fermented milks are the main groups of products that provide probiotic microorganisms to the population. This is mainly due to the presence of these bacteria in them and their great acceptance by consumers.

To carry out this dissertation, a bibliographic search was carried out through different databases by using keywords related to the topic of fermented milks with probiotic properties. A study has also been carried out through a survey launched via WhatsApp. Thanks to this survey, it has been possible to assess the knowledge and consumption level of fermented milk with probiotic properties by population.

The data provided by the reviewed studies have made it possible to deepen in the knowledge of probiotic fermented milks, their technological aspects and their effects on health, thus achieving the objectives set. In this project, aspects like research about the main microorganisms used as probiotics, how they can be incorporated into fermented milk, the characteristics that they must have to be incorporated and the different mechanisms of action once they are ingested have been studied. In addition, an analysis has been carried out on some of the factors that influence the viability of probiotic microorganisms while being used in fermented milk, among which it is worth highlighting: the pH and titratable acidity, oxygen and hydrogen peroxide, additives, incubation conditions, storage temperature and time, growth factors and promoters, protection factors and microencapsulation techniques. Possible beneficial effects on human health have also been analysed by reviewing scientific studies published in recent years. Thanks to the survey, it has been possible to assess the knowledge of probiotic fermented milk and consumption by the population. Lastly, legislation referring to these products has been analyzed.

2. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Las leches fermentadas son definidas en el Codex Alimentarius (CODEX STAN 243-2003) como un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin

coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables.

En la fermentación, el pH de la leche disminuye (hasta 4,6-4) por el aumento del número y de la actividad de las bacterias ácido lácticas en ella, haciendo que otros microorganismos, incluidos los patógenos, no puedan crecer (Sánchez y Pérez, 2005). Por tanto, esto aporta seguridad microbiológica al producto. Además, este proceso permite que los nutrientes duren más tiempo en el alimento. Con la fermentación, la vida útil se ve prolongada y sus características organolépticas también varían. Así, se obtienen productos con un sabor y textura característicos, diferentes a los de la leche cruda, que además aportan beneficios para la salud gastrointestinal.

Las leches fermentadas son alimentos consumidos desde la antigüedad, seguramente se originaron por las fermentaciones espontáneas que la leche sufría al mantenerla a temperatura ambiente. Actualmente, la fermentación se continúa utilizando como método de conservación en países en vías de desarrollo donde no tienen medios para mantener la leche en condiciones adecuadas de refrigeración y de esta manera aumentan su vida útil (Sánchez y Pérez, 2005).

Las características propias de cada leche fermentada se deben a la composición de la leche utilizada, la temperatura de incubación y la naturaleza de la flora microbiana. Se pueden clasificar de varias formas: según el contenido graso, según la concentración de leche o según el origen de la leche, aunque generalmente, se hace en función del microorganismo utilizado en su elaboración. Según este último criterio, se clasifican en cuatro tipos (Vedamuthu, 2006):

1. Fermentación láctica con bacterias lácticas mesófilas: La fermentación se realiza por debajo de 30°C e incluye las especies *Lactococcus lactis subs lactis*, *Lactococcus lactis subs cremoris*, *Lactococcus lactis diacetylactis*, *Leuconostoc subs cremoris*: utilizadas en la obtención del filmjolk, una leche escandinava.
2. Leches fermentadas por bacterias lácticas mesófilas (*Lc. lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *Leuc. mesenteroides subsp. cremoris*) y mohos (*Geotrichum candidum*): utilizadas para la obtención del viili (Finlandia)
3. Fermentación láctica por bacterias termófilas que se realiza entre 30-45°C, Los microorganismos responsables son cepas de *Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Gracias a ellas se obtiene el tipo de leche fermentada más popular, el yogur. Y también se encuentran en este grupo las leches acidófilas que se producen por la acción de *Lactobacillus acidophilus*.
4. Fermentación por bacterias lácticas y levaduras: Las bacterias (*L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*,

Lc. lactis subsp. lactis, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *Leuc. subsp. cremoris* *L. acidophilus*) producen fermentación láctica y las levaduras (*Saccharomyces spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Candida spp.*, *Mycotorula spp.*, *Torulaspota spp.*) fermentación alcohólica. Algunas de estas bacterias y levaduras se utilizan para la obtención del kéfir y el koumiss.

Algunos de los microorganismos usados en la fermentación de estas leches, tienen propiedades probióticas. Los probióticos fueron definidos por la FAO/OMS en el año 2006 como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”. Principalmente, son bacterias ácido lácticas, en su mayoría, de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los alimentos que consiguen aportar propiedades probióticas, se encuentran dentro de un grupo llamado “alimentos funcionales”. El sector lácteo es el que más variedad de productos funcionales ofrece (Collado, Sanz y Dalmau, 2003).

Aunque los probióticos están entre nosotros desde la antigüedad, la historia moderna de los probióticos comienza a principios de 1900, cuando Elie Metchnikoff, un científico búlgaro investigador del Instituto Pasteur de París, establece una relación entre la longevidad de los búlgaros y su alto consumo de yogur, atribuyéndola a los microorganismos presentes en él y la presencia de éstos en el colon de las personas. Metchnikoff fue galardonado con un premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908 por sus estudios sobre la fagocitosis y la inmunidad.

Las observaciones de Metchnikoff, desencadenaron diversos estudios, entre ellos el realizado por el pediatra Henri Tissier, el cual sugirió la posibilidad de administrar *Bifidobacterium* a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una microbiota intestinal sana (Tissier, 1906).

No fue hasta 1965 cuando Lilly y Stilwell dieron la primera definición de probióticos, refiriéndose a ellos como sustancias secretadas por los microorganismos que estimulan el crecimiento de otros. Varias definiciones han sucedido a esta, gracias a todas las investigaciones realizadas, y se ha llegado a la conclusión de que el término probiótico se atribuye a los productos que contienen microorganismos vivos y que la administración de probióticos requiere proporcionar una dosis apropiada para obtener los efectos deseados. Finalmente, se llegó a la definición que hoy en día proporciona la FAO/OMS, mencionada anteriormente.

Estos hallazgos relativamente recientes han hecho que el interés por los probióticos haya aumentado en los últimos tiempos. Tras realizar una búsqueda en ScienceDirect, sitio web que proporciona acceso a artículos científicos, y utilizando las palabras clave en inglés: fermented milk, probiotic fermented milk, probiotics y probiotic microorganism y seleccionando los datos entre los años 2000 y 2020, se obtiene una gráfica que permite representar la evolución del número de artículos científicos publicados conteniendo estos términos en los últimos 20 años (Figura 1).

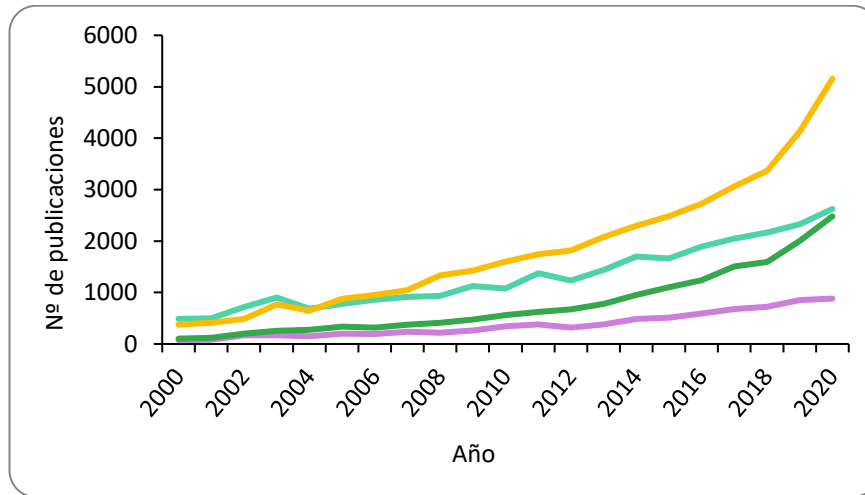


Figura 1: Evolución de las publicaciones científicas en relación a los probióticos entre los años 2000 y 2020. Fuente: elaboración propia a partir de datos obtenidos de ScienceDirect.

— Fermented milk — Probiotic fermented milk — Probiotics — Probiotic microorganism

En la Figura 1 se puede observar que las publicaciones científicas relacionadas con los probióticos siguen una tendencia ascendente desde el año 2000. Vemos que los probióticos han despertado mucho interés científico y que cada vez se investiga más en este campo. En los últimos 20 años ha habido un elevado incremento en el número de publicaciones científicas. El tema más abordado en los artículos científicos es “probiotics”, seguido de “fermented milk”, “probiotic microorganism” y “probiotic fermented milk”.

Aunque todavía se desconocen muchos de los efectos de los microorganismos con propiedades probióticas, gracias a la gran cantidad de estudios realizados en las últimas décadas, se han llegado a conocer algunas de sus principales propiedades funcionales, tales como la prevención de la diarrea asociadas a antibióticos, la prevención de alergias y la prevención y el tratamiento de trastornos gastrointestinales (McFarland, 2015).

Actualmente, los yogures y otras leches fermentadas son el principal grupo de productos que aportan microorganismos probióticos a la población, por la presencia de estas bacterias en ellos y por la gran aceptación que tienen dichos probióticos (Collado, Sanz y Dalmau, 2003).

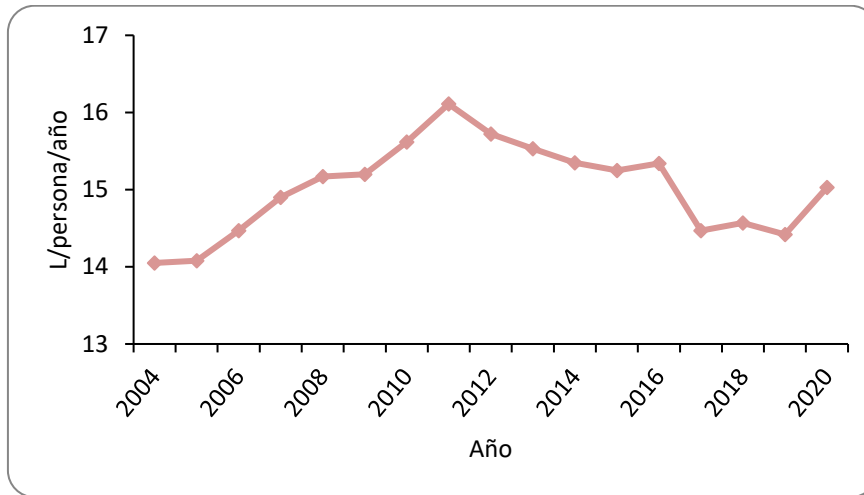


Figura 2: Evolución del consumo de leches fermentadas en litros por persona y año en España, entre 2004 y 2020. Fuente: elaboración propia a partir de datos del Panel de consumo alimentario, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

La Figura 2 nos permite analizar la evolución del consumo de leches fermentadas entre los años 2004 y 2020 por persona y por año. En esta gráfica se ve como el consumo de leches fermentadas sufrió un aumento importante entre los años 2004 y 2011. Tras este periodo, el consumo en litros por habitante y por año empezó a tomar una tendencia descendente. Por esta razón, aumentar el consumo de estos productos se ha convertido en uno de los principales retos del sector de la industria láctea en su conjunto a corto y medio plazo (FENIL, 2019). En el último año se ha observado un pequeño aumento en el consumo de leches fermentadas, siendo así el derivado lácteo más consumido (MAPA, 2020).

En 2019, año en el que se publica el último informe de MAPA disponible (Figura 3), las leches fermentadas más consumidas en España fueron: el yogur, representando un 61% del consumo total de leches fermentadas; seguido del yogur con bifidus, el cual supone un 19,1% del consumo total y el 12,9% restante está constituido por otras leches fermentadas, como pueden ser el kéfir y el koumiss.

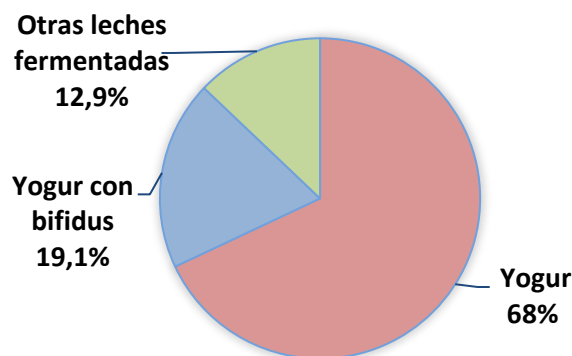


Figura 3: Consumo de diferentes tipos de leches fermentadas en España en el año 2019 en % de volumen. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

El yogur es una leche fermentada que se obtiene de la transformación de la lactosa en ácido láctico debido a la acción de dos microorganismos, *Lactobacillus bulgaricus* (responsable de la acidificación) y *Streptococcus thermophilus* (responsable de los sabores y aromas característicos), los cuales deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en una cantidad mínima de 10^7 unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro.

Las leches fermentadas con bifidobacterias, son leches fermentadas en las que se añaden bifidobacterias y lactobacilos a los fermentos lácticos habituales. Estas bacterias aportan unas características similares a las del yogur. A dichos microorganismos se les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud (Montero et al., 2003). Otras de las leches fermentadas más consumidas en el mundo son las que se muestran a continuación, en la Tabla 1.

Tabla 1: Leches fermentadas probióticas más consumidas en el mundo. Fuente: adaptada de Khorshidian, Yousefi y Mortazavian, 2020.

Producto	Microorganismos probióticos	Países en los que más se consume
Kéfir	<i>L. casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc.</i> subsp. <i>cremoris</i>	España, Irán, Rusia
Koumiss	<i>L. acidophilus</i> , <i>Saccharomyces</i>	Rusia, Mongolia
Leche acidófila	<i>L. acidophilus</i>	Muchos países
Leche con bifidus	<i>B. bifidum</i> y <i>B. longum</i>	Muchos países
Leche acidófila con bifidus	<i>L. acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> ssp.	Muchos países
Mil-Mil	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> y <i>L. acidophilus</i>	Japón
Yakult	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Shirota	Japón
Viili	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> .	Finlandia
Dahi	<i>L. paracasei</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>L. fermentum</i>	India, Nepal, Sri-Lanka, Pakistán, Bangladesh
Amasi	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (dominante), <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Leuconostoc</i> ssp.	Sudáfrica, Zimbawe
Somar	<i>L. paracasei</i> , <i>Lact. lactis</i>	India, Nepal

B. : Bifidus; **L.:** *Lactobacillus*; **Lc.:** *Lactococcus*; **Leuc.:** *Leuconostoc*; **P.:** *Pediococcus*

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de las leches fermentadas probióticas, sus aspectos tecnológicos y efectos en la salud. Para ello se ha planteado:

1. Estudio y conocimiento de las leches fermentadas probióticas mediante la identificación de los diferentes microorganismos utilizados en su elaboración, sus características y los diferentes factores que influyen en su viabilidad.
2. Análisis de los estudios científicos que se han realizado sobre los efectos de las leches fermentadas probióticas en la salud.
3. Elaboración de un estudio para conocer la aceptación que tienen las leches fermentadas probióticas por los consumidores y cómo se dirige la publicidad de estos productos.
4. Análisis de la legislación española y europea referente a las leches fermentadas probióticas.

4. METODOLOGÍA

Para conseguir los objetivos mencionados anteriormente, se ha obtenido información proveniente de bases de datos como ScienceDirect, PubMed y Google Scholar, realizando una búsqueda sistemática y creando los perfiles de búsqueda adecuados. Para ello, se han introducido en las diferentes bases palabras clave como: fermented milk, probiotic history, probiotic fermented milk, probiotics, viability of probiotic bacteria, probiotics positive effects, probiotics action in fermented milk, microorganism in probiotic fermented milks.

También se han consultado otras publicaciones contempladas en libros y enciclopedias, que han servido como base para el desarrollo del cuerpo de este trabajo. Además, se ha consultado la legislación existente en el Boletín Oficial del Estado (BOE), EUR-Lex y AECOSAN.

Consultada toda la literatura, se ha procedido a la selección de aquella que se consideró más importante para dar respuesta al objetivo del trabajo.

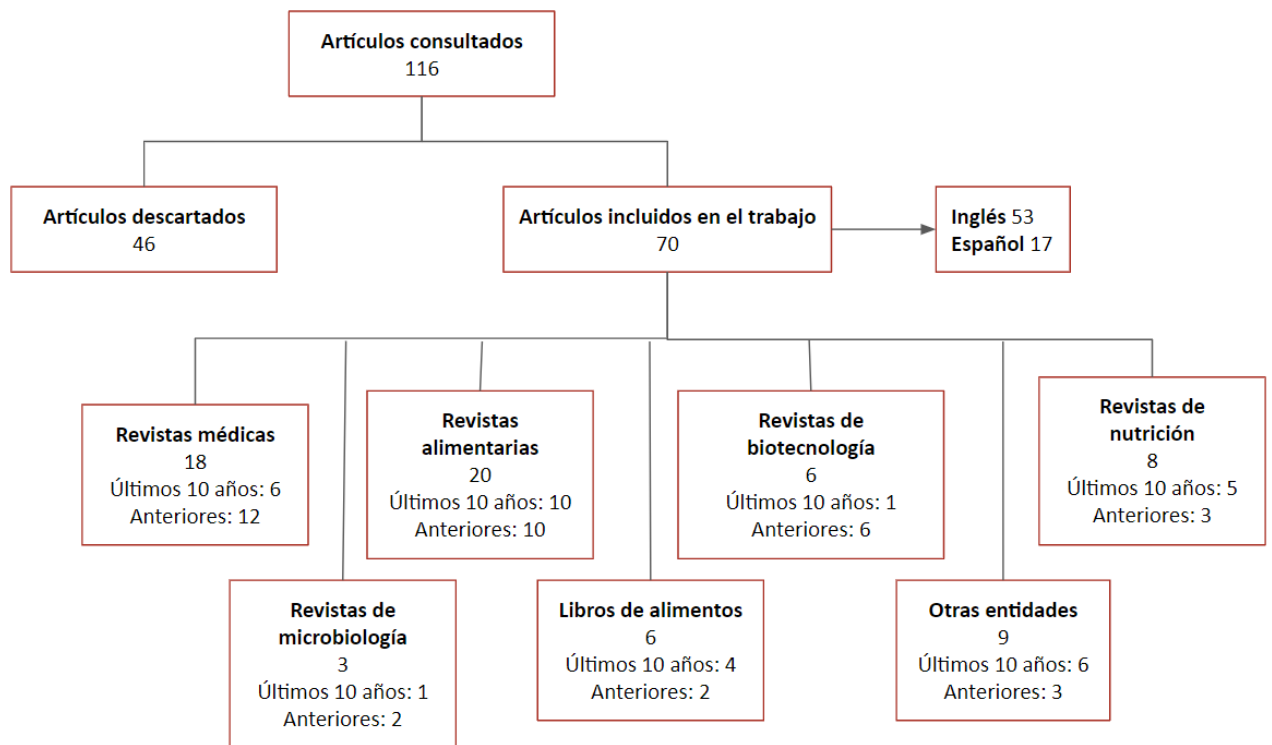


Figura 4: Resumen de la bibliografía consultada y clasificación de la bibliografía incluida.

Además, se ha realizado un estudio utilizando la herramienta “formularios de Google” enviando dicho formulario a través de un enlace vía WhatsApp. En dicha encuesta se lanzaron las siguientes preguntas, con el objetivo de valorar el conocimiento y el consumo de la población de leches fermentadas con propiedades probióticas:

1. **¿Has escuchado alguna vez el término probiótico?** Si/No
2. **En el caso de que la respuesta anterior sea afirmativa ¿dónde habías oído hablar de este término?** _____
3. **¿Asocias este término a un efecto positivo o negativo para la salud?** Positivo/ Negativo
4. **¿Cuál de estas opciones dirías que es la definición de probiótico?** Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped / Ingredientes no digeribles de los alimentos. Estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino.
5. **¿En qué producto piensas al escuchar el término leches fermentadas probióticas?**

6. **¿Has consumido alguna vez alguno de estos productos?** kéfir, yogur con bifidus, Actimel

y yogur.

7. ¿Con qué frecuencia sueles consumir este tipo de productos? Diariamente/
Semanalmente/ Mensualmente/ Anualmente.

8. ¿Estás dispuesto/a pagar más por una leche fermentada con probióticos? Si/No.

9. ¿Cuáles de estos beneficios crees que se puede atribuir al consumo de leches fermentadas probióticas para tu salud? Prevención de problemas gastrointestinales/
Prevención o alivio de alergias y dermatitis atópica en niños/ Reducen la intolerancia a la lactosa/ Todas las opciones son correctas

10. Sexo: Mujer/ Hombre

11. Edad: Menos de 16 años/ 16 a 30 años/ 30 a 45 años/ 45 a 60 años/ Más de 60 años

12. Ocupación: Estudiante / Trabajador/a / Amo/a de casa / Parado/a / Jubilado/a / Otro

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Microorganismos utilizados en la elaboración de leches probióticas

Los probióticos son definidos como microorganismos no patógenos, que al ser ingeridos tienen efectos positivos sobre la salud (Schrezenmeir y De Vrese, 2008). Muchas de las leches fermentadas incorporan microorganismos probióticos, los más usados para la elaboración de estos productos son los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* pero también se utilizan muchos otros, como se muestra en la Tabla 2. Esto se debe a que son probablemente los únicos, dentro de los que colonizan nuestras mucosas, que son inocuos. Por ello, han sido reconocidos como organismos GRAS (Generally Regarded As Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety) por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos y la European Food Safety Authority (Suárez, 2013).

Los microorganismos probióticos pueden ser incorporados en la leche de diferentes formas:

1. Añadiendo el microorganismo junto con el starter (cultivo iniciador).
2. Añadiendo un número alto de microorganismos viables tras la fermentación.
3. Incorporando los probióticos como cultivo iniciador.

Estos microorganismos son principalmente de origen animal y humano, formando parte de la microbiota intestinal de éstos (Khorshidian, Yousefi y Mortazavian, 2020).

Dichos microorganismos, una vez ingeridos, pueden actuar mediante diferentes mecanismos como se ilustra en la Figura 5:

1. Acidificación del lumen intestinal mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta que dan lugar a la inhibición del crecimiento de bacterias coliformes y otras similares. Los ácidos grasos mantienen el trofismo de la mucosa intestinal particularmente en el colon.
2. Producción *in vitro* de sustancias antibacterianas: bacteriocinas.
3. Acción competitiva con determinados nutrientes intraluminales.

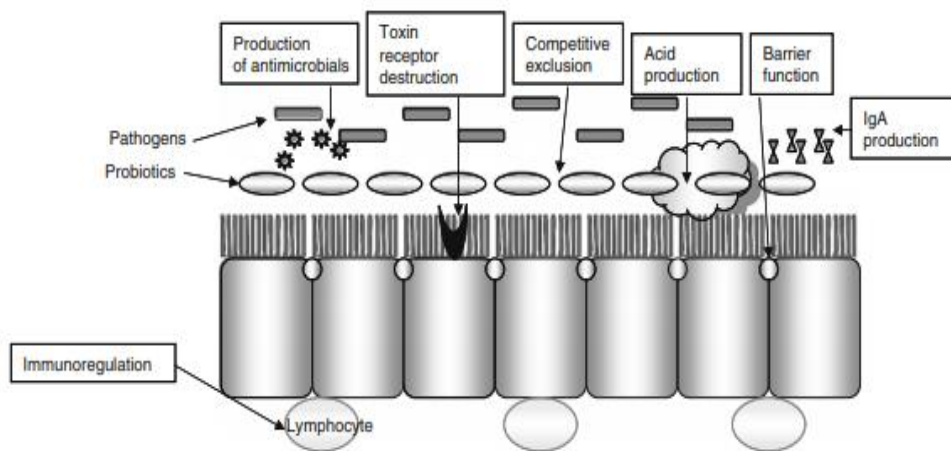


Figura 5: Mecanismos de acción de los probióticos (Oliveira y González-Molero, 2016).

Durante la fermentación, los hidratos de carbono fermentables se descomponen dando lugar a ácidos orgánicos, dióxido de carbono y alcohol. Además, generan metabolitos antimicrobianos como bacteriocinas, mejoran las características sensoriales de los alimentos en los que actúan y también mejoran sus características nutricionales (Parra, 2010).

Los productos lácteos son un medio ideal para la proliferación de estos microorganismos, pues aportan una rica fuente de carbono que es la lactosa, sobre la que actúan mediante hidrólisis, y obtienen aminoácidos esenciales a partir de la caseína utilizando sus sistemas proteolíticos. Además, la grasa que contiene la leche proporciona protección a los probióticos para tolerar de mejor manera las condiciones del tracto gastrointestinal (Khorshidian, Yousefi y Mortazavian, 2020).

Tabla 2: Microorganismos usados como probióticos y sus efectos beneficiosos para la salud documentados en ensayos clínicos en humanos. Fuente: adaptada de Ouwehand, Salminen y Isolauri, 2002.

Género	Especie	Beneficio para la salud
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	Reduce la diarrea asociada a antibióticos.
	<i>casei</i>	Acorta la diarrea causada por rotavirus.
	<i>paracasei</i> <i>plantarum</i>	Alivia el síndrome de colon irritable.
	<i>rhamnosus</i>	Acorta la diarrea causada por rotavirus. Alivia el síndrome de colon irritable. Tratamiento y prevención de alergia.
	<i>salivarius</i>	Reduce los síntomas del síndrome de colon irritable.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	Reduce los síntomas del síndrome del colon irritable.
	<i>longum</i> <i>lactis</i>	Tratamiento de alergia. Acorta la diarrea causada por rotavirus. Reduce los síntomas del síndrome del colon irritable.
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	-----
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Menor recaída en la enfermedad del colon irritable.
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Menor recaída en la enfermedad del colon irritable.

Todos los microorganismos probióticos deben de tener una serie de características comunes (Martínez y Muñoz, 2013):

- No ser nocivos para los seres humanos al consumirlos.
- Ser preferiblemente de procedencia intestinal ya que deben de ser tolerados por el sistema inmunitario del organismo huésped.
- Tener una alta resistencia a la acción de los ácidos grasos y de las sales biliares para que un elevado porcentaje mantenga su viabilidad en el intestino.
- Ser capaces de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal.

- Establecer una sinergia con la microbiota endógena normal.
- Ejercer un efecto barrera y producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal.
- Ser capaces de potenciar las defensas inmunitarias del huésped.
- No ser capaces de transmitir resistencias a antibióticos.

5.2. Factores que influyen en la viabilidad de los microorganismos presentes en las leches probióticas

La viabilidad de los microorganismos probióticos en las leches fermentadas se ve afectada por varios factores, como se muestra en la Figura 6.

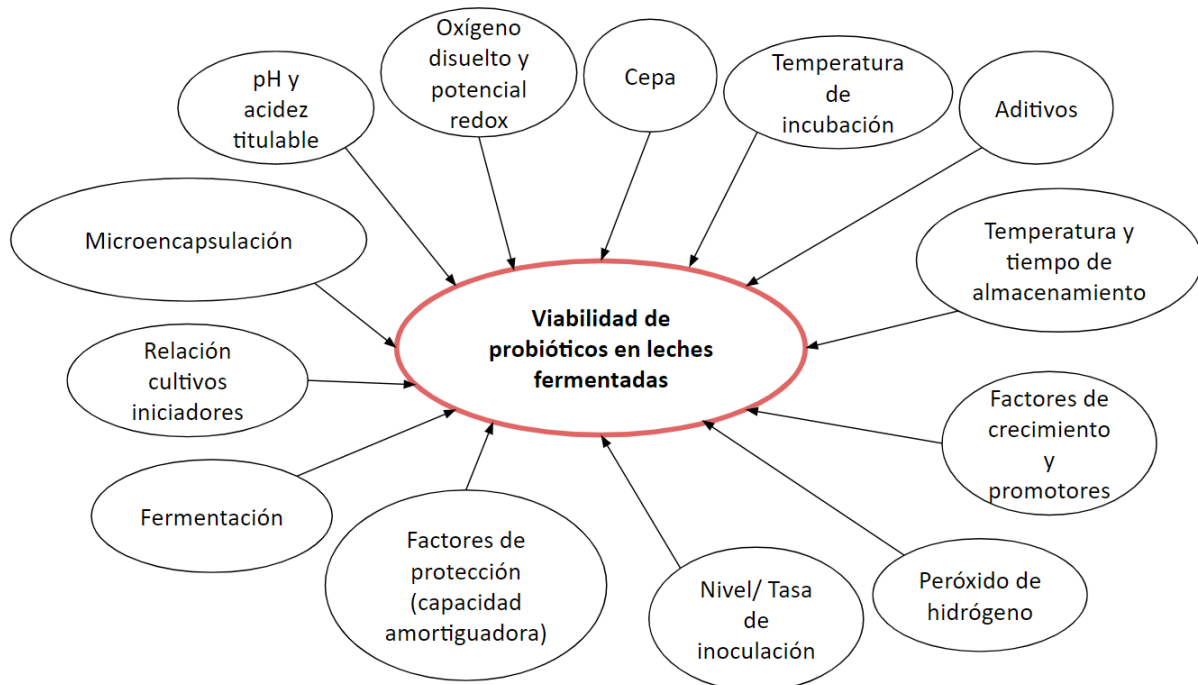


Figura 6: Factores que afectan a la viabilidad de los microorganismos probióticos en las leches fermentadas. Fuente: adaptado de Mohammadi et al., 2012.

Algunos de los factores más importantes para determinar la viabilidad de los microorganismos probióticos en las leches fermentadas son el pH de la leche, el oxígeno, la temperatura de incubación y la temperatura y el tiempo de almacenamiento, entre otros, como se exponen a continuación.

pH y acidez titulable

El pH bajo y la acidez titulable alta son los factores más importantes que restringen el crecimiento y la estabilidad de las bacterias en los productos fermentados. El pH óptimo de crecimiento puede variar

entre los diferentes microorganismos. Para *L. acidophilus*, el pH óptimo es 5,5-6,0. Sin embargo, en las bifidobacterias, este rango está entre 6,0-7,0 (De Vuyst, 2000).

Los valores de pH muy bajos en las leches fermentadas pueden provocar un aumento en la concentración de ácidos orgánicos no disociados y como resultado, se potencia el efecto bactericida de estos ácidos (Mohammadi et al., 2012).

El contenido de ácido en las leches fermentadas se ha visto relacionado de manera directa con el valor del potencial redox, a mayores valores de este, la población viable de bifidobacterias se ve afectada (Oliveira, Remeuf y Corrieu, 2001). Además, los probióticos se ven más afectados por los cambios de pH que por la acidez titulable, produciendo en ellos estrés. La acidez titulable parece afectar a la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento más que durante la fermentación (Shafiee et al., 2010).

Oxígeno y peróxido de hidrógeno

El oxígeno molecular es determinante para el crecimiento y supervivencia de las bacterias. La sensibilidad a los niveles de oxígeno varía entre especies y cepas. En general, las bacterias del género *Lactobacillus* son aerotolerantes o anaerobias y estrictamente fermentativas, mientras que las del género *Bifidobacterium* son estrictamente anaerobias y toleran menos el oxígeno (De Vuyst, 2000).

Para algunos microorganismos el oxígeno es tóxico. Así, en presencia de oxígeno algunas bacterias como *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* producen peróxido de hidrógeno, el cual es tóxico para otras bacterias probióticas, sobre todo para *L. acidophilus* (Shafiee et al., 2010). Por último, con la oxidación de algunos componentes, como la grasa, se producen radicales libres que también pueden resultar tóxicos. Para disminuir esto, se están desarrollando algunos métodos como la fermentación en vacío, usando materiales de envasado con una baja permeabilidad al oxígeno, añadiendo antioxidantes y controlando el proceso de producción para minimizar el oxígeno disuelto (Talwalkar et al., 2004).

Aditivos

La viabilidad de los cultivos iniciadores y de las bacterias probióticas también puede verse afectada por los aditivos empleados en la elaboración de las leches fermentadas. Los más usados son las sales (NaCl y KCl), azúcares (sacarosa y lactosa), edulcorantes (aspartamo), componentes aromáticos (diacetilo, acetaldehído), colorantes naturales, agentes aromatizantes (fresa, melocotón...), nisina (un antibiótico sintetizado de forma natural por *L. lactis* el cual actúa contra la formación de esporas y puede ser usado como un conservante natural en presencia de ácido láctico) y dióxido de carbono como agente gasificante. Estos aditivos son mejor tolerados por las bacterias probióticas que por los microorganismos utilizados como iniciadores (Vinderola et al., 2002).

Temperatura de incubación

El tiempo y la temperatura de fermentación van a ser también muy determinantes en la viabilidad de los microorganismos. El crecimiento de *L. acidophilus* puede darse hasta temperaturas de 45°C pero, el rango de temperaturas para su crecimiento óptimo es 40–42°C. En las bifidobacterias, su crecimiento óptimo se da a 37–41°C. Para las bacterias usadas en la elaboración de yogur, se usa un rango de 42–45°C (Güler-Akin, 2005). Es muy importante seleccionar adecuadamente el rango de temperatura de incubación. En el estudio realizado por Mortazavian et al. (2006a) en el que se usaron temperaturas mayores (45°C), comparando con 40°C y 37°C, concluyeron que había una reducción significativa de la viabilidad de los microorganismos probióticos a 45°C dado que, a esta temperatura, predominan las bacterias no probióticas.

Condiciones de inoculación

Los cultivos iniciadores son inoculados durante la producción de las leches fermentadas para aumentar la velocidad del proceso fermentativo y en el caso del yogur, para proporcionar el sabor y la textura típicos. La adición de iniciadores y probióticos al mismo tiempo, hace que haya una pérdida de viabilidad de los segundos, ya que los iniciadores crecen más rápido durante la fermentación y producen sustancias inhibitoras que restringen la actividad de las bacterias probióticas. Para evitar esto, pueden añadirse los probióticos tras la fermentación. En este caso, se hacen proliferar las células en un sustrato hasta que se obtiene el recuento deseado, tras lo cual, se inoculan en el yogur que ya ha sido fermentado por los iniciadores. Este método hace que el tiempo de incubación sea menor (Mohammadi et al., 2012).

Existe alguna evidencia de que al inocular las bacterias probióticas tras la fermentación, estas pueden sufrir estrés por el bajo pH, la alta acidez titulable y el peróxido de hidrógeno, esto también puede causar una pérdida de viabilidad (Shafiee et al., 2010) y hay que evaluarlo en cada tipo de producto.

El nivel de inóculo tiene efectos sobre la viabilidad de las bacterias probióticas, los tiempos de fermentación y las propiedades sensoriales del producto final. Generalmente, el número de microorganismos viables aumenta con el número de microorganismos inoculados cuando se usan como cultivo iniciador sin bacterias de yogur. La relación entre el inóculo de probióticos y el de los iniciadores utilizados también es otro factor clave. Una relación baja entre el cultivo iniciador y el cultivo de los probióticos hace que la fermentación sea más larga y que las propiedades sensoriales del producto no sean las adecuadas (Mohammadi et al., 2012).

La viabilidad de los microorganismos también puede verse afectada por la competición por los nutrientes y relaciones antagonistas entre dichos microorganismos (Mortazavian et al., 2011).

Temperatura y tiempo de almacenamiento

Las leches fermentadas deben mantenerse a temperaturas de refrigeración, preferiblemente entre 4-5°C. La temperatura de almacenamiento influye en la viabilidad de los microorganismos presentes en estos productos, así como en la cantidad y tipo de bacterias que sobreviven. En el estudio realizado por Mortazavian et al. (2006b), se comparó la viabilidad de *L. acidophilus* y bifidobacterias (*Bifidobacterium lactis* BB-12) a diferentes temperaturas de refrigeración. Estos microorganismos probióticos se encontraban en un cultivo utilizado para la elaboración de yogur junto a otras bacterias lácticas: *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Se llegó a la conclusión de que estos microorganismos probióticos tienen viabilidades diferentes según la temperatura a la que habían sido refrigeradas (Tabla 3). En dicho estudio, tras mantener en refrigeración un yogur durante 20 días a 2°C la bacteria que más viabilidad tuvo fue *L. acidophilus* mientras que, cuando la refrigeración fue a 8°C se vio más viabilidad en las bifidobacterias. Se ha visto que las bifidobacterias tienen una menor resistencia a temperaturas bajas de refrigeración.

En el caso de *L. acidophilus*, su bajada de viabilidad cuando la temperatura de almacenamiento es de 5°C a 8°C, puede explicarse por los efectos antagonistas de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* frente a *L. acidophilus*. A dichas temperaturas de almacenamiento más elevadas (5 y 8°C), *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* crece rápidamente, hace que aumenten los niveles de ácido láctico y peróxido de hidrógeno y dificulta la viabilidad de *L. acidophilus*. En cambio, para las bifidobacterias las diferencias de crecimiento entre temperaturas no son tan notables, su resistencia a las condiciones adversas que aparecen en el medio es parecida a las diferentes temperaturas. Aunque a 8°C el aumento de la viabilidad podría deberse a las relaciones de sinergia establecidas con el resto de bacterias.

Tabla 3: Variación en la viabilidad de células probióticas (log ufc/mL) durante el almacenamiento en refrigeración (Mortazavian et al., 2006b).

Probiotics	Storage temperature (°C)	Storage period (days)				
		0**	5	10	15	20
<i>L. acidophilus</i>	2	7.41	7.28 ^a	7.04 ^a	6.60 ^a	6.47 ^a
	5	7.41	7.14 ^b	7.03 ^a	6.27 ^b	5.44 ^c
	8	7.41	7.13 ^b	6.77 ^b	6.23 ^b	5.77 ^b
Bifidobacteria	2	7.53	7.41 ^a	6.87 ^b	6.38 ^b	5.80 ^b
	5	7.53	7.42 ^a	6.97 ^b	6.15 ^c	5.65 ^b
	8	7.53	7.44 ^a	7.17 ^a	6.62 ^a	6.15 ^a

* The means shown with different letters are significantly different (p<0.05).
 ** 0 days = immediately after fermentation.

El tiempo de almacenamiento es inversamente proporcional a la viabilidad de los probióticos, debido al aumento de los efectos adversos para las células probióticas. Aunque, la resistencia de las células probióticas a condiciones ambientales adversas es específica de la cepa, la viabilidad en todos los casos va a disminuir con el tiempo (Mohammadi et al., 2012).

Factores de crecimiento y promotores

Las bacterias del género *Bifidobacterium* experimentan dificultades para crecer en la leche por la falta de nitrógeno no proteico, de algunas vitaminas, la baja actividad de β -galactosidasa y la falta de actividad proteolítica (Mohammadi et al., 2012; Roy, 2005).

Una forma de disminuir estas dificultades de crecimiento es añadiendo factores de crecimiento a la leche, estos son consumidos por los probióticos como nutrientes o añadiendo promotores de crecimiento, los cuales se usan para mejorar el crecimiento o la actividad de las células probióticas pero no son utilizados directamente como nutrientes. Algunos de los factores o promotores de crecimiento más utilizados son: la caseína, glucosa, vitaminas, minerales, antioxidantes, etc. (Mohammadi et al., 2011).

El uso de prebióticos para mejorar el crecimiento de los probióticos está aumentando. Se utilizan algunos como la inulina, los β -glucanos y los fructooligosacáridos (Khorshidian, Yousefi y Mortazavian, 2020).

Los resultados obtenidos por El-Kholy , Aamer y Ali (2020), demostraron que el uso de un 1% de inulina extraída de raíces de achicoria en un yogur simbiótico bajo en grasa, mejoró la viabilidad de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *B. bifidum* durante el almacenamiento.

Factores de protección

La capacidad amortiguadora del producto, puede influir considerablemente en la viabilidad de las células probióticas. La adición de extractos de trigo, cebada y malta a la leche puede aumentar la capacidad amortiguadora de esta (Charalampopoulos, Pandiea y Webb, 2003). Aumentando la capacidad amortiguadora de la leche se conseguiría mejorar el crecimiento y la actividad de los probióticos presentes en las leches fermentadas. Haciendo esto, los probióticos tendrían una mayor viabilidad tanto en las leches fermentadas como en el tracto intestinal una vez ingeridos, gracias a la amortiguación del pH. En los productos con mayor capacidad amortiguadora, el pH disminuye más lentamente durante la fermentación y el almacenamiento, lo que hace que queden un mayor porcentaje de probióticos viables (Karimi, Mortazavian y Da Cruz, 2011).

Microencapsulación

La microencapsulación es el proceso por el cual las bacterias probióticas son atrapadas por sustancias que les sirven de recubrimiento (mayoritariamente hidrocoloides) y les aportan protección sobre las condiciones perjudiciales del medio por el que circulan; de esta forma, la liberación de los probióticos intactos se realizará en el lugar apropiado del intestino (Mohammadi et al., 2012).

La microencapsulación protege a las células probióticas de factores ambientales perjudiciales como el bajo pH y alta acidez, las sales biliares y los choques de frío inducidos por las condiciones del proceso de

producción (ultracongelación y liofilización) . La microencapsulación protege también de otros factores como el oxígeno molecular en el caso de los microorganismos anaerobios estrictos, los choques térmicos debidos a operaciones como el secado, los bacteriófagos y los agentes antimicrobianos químicos. Otra ventaja que aporta la microencapsulación es la mejora de los atributos sensoriales (Mohammadi et al., 2011).

El material más usado para la encapsulación es el alginato de calcio (Khosrokhavar y Mortazavian, 2010). Algunas células probióticas encapsuladas, como *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Bifidobacterium lactis* BB-12, han demostrado un aumento de la viabilidad manteniendo niveles $>10^5$ ufc/g en postres fermentados congelados, en comparación con niveles $<10^3$ ufc/g cuando los microorganismos empleados no estaban encapsulados (Mohammadi et al., 2012).

Todos estos factores que afectan a la viabilidad de los probióticos los podemos clasificar dependiendo de si son intrínsecos del producto, dependen de los parámetros de procesado o de los microorganismos que estamos inoculando como se ilustra en el diagrama de la Figura 7.

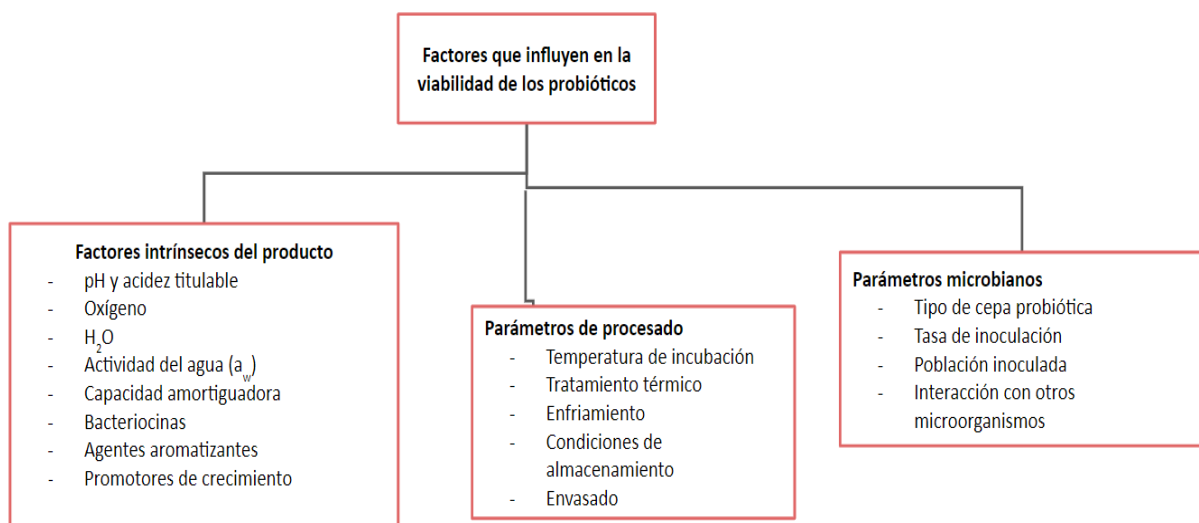


Figura 7: Factores que influyen en la viabilidad de los probióticos en leches fermentadas. Fuente: adaptado de Khorshidian, Yousefi y Mortazavian, 2020.

5.3. Efectos en la salud de las leches fermentadas probióticas

Algunos de los efectos beneficiosos de los probióticos más conocidos son los siguientes:

5.3.1. Prevención y reducción de las diarreas causadas por rotavirus, antibióticos o por intolerancia a la lactosa.

La gastroenteritis aguda puede tener origen bacteriano o vírico. Los rotavirus son una de las causas más comunes de diarrea aguda en niños, sobre todo en los países desarrollados. Los rotavirus invaden y se replican en las células absortivas diferenciadas del epitelio del intestino delgado. Esto genera una alteración parcial de la mucosa intestinal con pérdida de microvellosidades, una disminución de la proporción de vellosidades/criptas y un aumento de la permeabilidad intestinal (Ouwehand, Salminen y Isolauri, 2002).

La diarrea producida por antibióticos es una complicación muy habitual en el ámbito hospitalario, representa un porcentaje del 13-60%. Los antibióticos alteran la microbiota intestinal y permiten la proliferación de patógenos oportunistas y la instauración de la diarrea, produciendo síntomas clínicos de mayor o menor gravedad. *Clostridium difficile* es, muchas veces, causante de la diarrea y la colitis nosocomial que hace que la estancia en el hospital se prolongue hasta 7 días y que aparezcan nuevas infecciones durante la estancia hospitalaria (Oliveira y González-Molero, 2016). Frecuentemente, se plantea el uso probióticos para tratar a estos pacientes (Maftai, 2019) con el objetivo de que los probióticos:

- Restauren la microbiota intestinal.
- Incrementen la respuesta inmune.
- Compitan con las bacterias patógenas.
- Retiren las toxinas producidas por las bacterias patógenas.

Varios estudios han demostrado que algunos probióticos como *L. rhamnosus GG*, *L. reuteri*, *L. casei Shirota* and *B. lactis Bb12*, pueden disminuir la duración de las diarreas causadas por los rotavirus a aproximadamente un día (Ouwehand, Salminen y Isolauri, 2002).

Se han realizado numerosos estudios sobre los efectos de *Saccharomyces boulardii* en la reducción del riesgo de diarreas producidas por antibióticos. En un meta-análisis de 21 estudios realizado por Szajewska y Kołodziej en 2015, se concluyó que la administración de *S. boulardii* reducía el riesgo de diarrea en pacientes tratados con antibióticos del 18,7% al 8,5%: en niños, *S. boulardii* redujo el riesgo de un 20,9% a un 8,8%; en adultos, del 17,4% al 8,2%. *S. boulardii* también demostró reducir el riesgo de diarrea asociada a *C. difficile*, aunque esta reducción sólo resultó ser significativa en niños (Szajewska y Kołodziej, 2015).

En un estudio aleatorio controlado, en el que se administraba dos veces al día, durante una semana más que la duración del antibiótico, una bebida fermentada probiótica con *L. casei*, *L. bulgaricus*, y *S. thermophilus*, se demostró una prevención en la diarrea asociada a los antibióticos y la causada por *C. difficile*, en comparación con un grupo control, como se muestra en la Tabla 4 (Hickson et al., 2007).

Tabla 4: Número total de casos de diarrea asociada a antibióticos (incluyendo los positivos en *C. difficile*) y número de casos positivos y negativos en *C. difficile* Fuente: adaptado de Hickson et al., 2007.

	Probiótico	Control
Diarrea		
Si	7	19
No	50	37
Nº de pacientes	57	56
<i>C. difficile</i>		
Positivo	0	9
Negativo	56	44
Nº de pacientes	56	53

La causa de la intolerancia a la lactosa es una reducción en la producción de la β -galactosidasa, la enzima responsable de hidrolizar la lactosa, esto es una condición normal en todos los mamíferos adultos (Ouwehand, Salminen y Isolauri, 2002). En la mayoría de los seres humanos, esta actividad disminuye a mitad de la infancia (sobre los 5 años) y continúa disminuyendo con los años (Daliri y Lee, 2015). Dicha intolerancia desencadena síntomas adversos como dolor abdominal, gases y diarrea. En comparación con la leche, los productos fermentados han resultado ser bien tolerados por las personas intolerantes a la lactosa. Esto puede explicarse por la presencia de β -galactosidasa en las bacterias que fermentan la leche. Este efecto beneficioso se suele asociar a los productos fermentados con *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *S. thermophilus*; mientras que algunos probióticos como *L. rhamnosus GG*, no son capaces de fermentar la lactosa (Ouwehand, Salminen y Isolauri, 2002). Otros microorganismos probióticos, sin embargo, como *B. longum*, *B. animalis*, *L. reuteri*, y *S. thermophilus* han demostrado tener efectos beneficiosos contra los síntomas de la intolerancia a la lactosa según la revisión realizada por Oak y Jha en 2019. No obstante, todavía se necesitan más estudios para determinar la eficacia de estos probióticos frente a este problema de intolerancia a la lactosa y cuáles son sus mecanismos de acción.

5.3.2. Retraso o inhibición de la aparición de cáncer.

El desarrollo del cáncer de colon es un proceso de múltiples etapas, ocurre cuando se da la acumulación de mutaciones en ciertos genes supresores de tumores. Esto conduce al inicio del cáncer, produciendo un daño en el ADN de estos genes que podría conducir a nuevas mutaciones (Wollowski, Rechkemmer y Pool-Zobel, 2001). Al conocerse el efecto antimutagénico de algunas cepas de microorganismos probióticos empleados en la elaboración de leches fermentadas, principalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, y *Bifidobacterium*, se ha investigado ampliamente su capacidad para prevenir este tipo de mutaciones (Badgeley et al., 2021). Algunos estudios han demostrado un efecto inhibitorio por parte de los probióticos en el desarrollo de tumores y lesiones precancerosas. La evidencia no es muy consistente y todavía queda mucha investigación por realizar en este campo (Brady, Gallaher y Busta, 2000).

En un estudio realizado en 2005 por Ishikawa et al., se evaluó la recurrencia de tumor colorrectal en 398 hombres y mujeres a los que previamente se les habían extirpado al menos dos tumores colorrectales. Se dividieron en grupos que recibieron un suplemento de fibra dietética, *L. casei*, ambos o ninguno. No se obtuvieron diferencias significativas en el desarrollo de nuevos tumores colorrectales entre los grupos, pero la tasa de aparición de tumores con anomalías de grado moderado o alto fue menor en el grupo que recibió *L. casei*. En otro estudio realizado por Pala et al. en 2011 se concluyó que la ingesta de yogur (con *S. thermophilus* y *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*) estaba relacionada inversamente con el riesgo de aparición de cáncer de colon, concluyendo que el yogur debería ser parte de una dieta destinada a prevenir estas enfermedades. Estos estudios no demuestran una evidencia clínica del papel de los probióticos en la prevención de cáncer de colon, pero con la realización de más estudios podrían llegar a demostrarse.

5.3.3. Prevención de contraer enfermedades intestinales y alivio de dolores en el tracto intestinal en la población sana.

A lo largo de la vida, los individuos sanos padecen periodos de malestar. Esto puede ocurrir a causa de infecciones respiratorias o intestinales o por otros estímulos externos que desafían el sistema inmunitario. A menudo también alteran la microbiota y debilitan la función de barrera de la mucosa intestinal. Este malestar, también puede aparecer como consecuencia de estrés crónico, infecciones crónicas, cansancio, estrés psicológico y otros problemas que dan como resultado una bajada en las defensas naturales del organismo (Jankovic et al., 2010).

Los probióticos pueden ser administrados para mantener un buen estado de salud, lo que implica, prevenir enfermedades (Taibi, 2014). Es por esto que las leches fermentadas con propiedades

probióticas son alimentos funcionales y tienen como objetivo proporcionar beneficios para la salud humana (Ferguson, 2009).

La microbiota beneficiosa normal del intestino, inhibe de forma competitiva la colonización de la mucosa por bacterias patógenas y reduce la sobreestimulación del sistema inmunológico. Un colon sano con una producción adecuada de moco y la colonización bacteriana adecuada, previene la adherencia de bacterias patógenas, modula los procesos de enfermedades, y previene los trastornos inflamatorios generalizados (Drisko, Giles y Bischoff, 2003). Los probióticos, ayudan a mantener el equilibrio intestinal, manteniendo de esta forma la microbiota beneficiosa. Así lo demostraron Pregliasco, et al., en un estudio realizado en el año 2008, en el que se administró un simbiótico que contenía *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. lactis* y fructooligosacáridos a 237 adultos sanos. Una de las mejoras descrita por los pacientes es la reducción de la hinchazón abdominal.

En cuanto a los niños sanos, en un estudio realizado por Indrio et al. en 2008, se obtuvieron unos resultados satisfactorios en el tratamiento de los síntomas de los cólicos, sobre todo en recién nacidos, a los que se les administró *L. reuteri*.

5.3.4. Alivio de los síntomas de enfermedades inflamatorias y síndromes intestinales.

Las enfermedades inflamatorias intestinales como el síndrome de colon irritable, pueden ser causadas por alteraciones en la microbiota intestinal normal (Shanahan, 2000). Los probióticos han sido usados desde hace muchos años para tratar enfermedades relacionadas con el tracto intestinal. De hecho, se ha observado que algunos probióticos seleccionados reducen el número de recaídas del colon irritable y prolongan el período de remisión, periodo en el que hay una ausencia de síntomas. No solo algunas bacterias ácido lácticas como *L. salivarius* y *L. rhamnosus* GG, sino también *S. cerevisiae (boulardii)* y una cepa de *E. coli (Nissle)* son eficaces para aliviar los síntomas de la enfermedad del colon irritable (Ouweland, Salminen y Isolauri, 2002). *L. plantarum* ha sido también administrado a personas con este síndrome obteniendo buenos resultados, puesto que reduce significativamente las flatulencias y el dolor abdominal, dos de los síntomas de esta enfermedad (Sebastián, 2017).

5.3.5. Alivio del estreñimiento.

El estreñimiento es un problema digestivo importante entre los ancianos, en particular los hospitalizados. Aunque también se da en adultos sanos y otras personas hospitalizadas. Se ha observado que los sujetos estreñidos tienen una microbiota fecal modificada, con niveles reducidos de bifidobacterias, bacteroides y, en particular, niveles reducidos de clostridios (Botelho et al., 2020). En un estudio realizado por De Paula, Carmuega y Weill en 2008, se administró a 378 mujeres con estreñimiento una leche fermentada simbiótica (Activia) que contenía *B. animalis* DN-173010 y fructooligosacáridos. En dicho estudio, se consiguió asociar el consumo de simbióticos con un aumento

en la frecuencia de deposición de dichos sujetos, una mejora en la calidad de las heces según la escala de Bristol, una percepción reducida del esfuerzo y una reducción en la percepción del dolor asociado con la defecación (Tabla 5)

Tabla 5: Efecto del consumo de Activia (con *B. animalis* DN-173010 y fructooligosacáridos) y un postre control, en las variables relacionadas con la función de evacuación del intestino en 378 mujeres con estreñimiento. Fuente: adaptada de De Paula, Carmuega y Weill, 2008 .

	Control (Media ± SD)	Activia (Media ± SD)
Frecuencia de evacuación (Deposiciones/ semana)	4,96 ± 2,62	6,09 ± 2,69
Mejoría en la calidad de las heces según la escala de Bristol.	3,44 ± 1,02	3,61 ± 0,97
Esfuerzo de evacuación (Escala del 1 al 5)	2,19 ± 0,85	1,94 ± 0,91
Dolor durante la evacuación (Escala del 0 al 1)	0,17 ± 0,30	0,08 ± 0,21

5.3.6. Prevención o alivio de alergias y dermatitis atópica en lactantes.

Evidencias recientes parecen apuntar a una diferente composición de la microbiota del intestino de los niños con alergias en comparación con la de los niños sin alergias. La administración de probióticos durante los primeros años de la infancia, podría proteger a estos niños de la aparición de alergias pero hacen falta más estudios en este campo para poder tener certeza de este efecto (Del Giudice et al., 2012). En los estudios realizados por Majamaa e Isolauri (1996) e Isolauri et al. (2000), en los que se administraron cepas probióticas de *L. rhamnosus GG* y *B. lactis BB-12* a lactantes alérgicos a la leche de vaca, se consiguió un alivio de la dermatitis atópica que padecían.

5.3.7. Prevención de infecciones del tracto respiratorio (resfriado común, influenza) y otras enfermedades infecciosas, así como tratamiento de infecciones urogenitales.

El efecto positivo de los microorganismos probióticos se está demostrando más allá del intestino (Jankovic et al., 2010), como ocurre en las infecciones urogenitales que mayoritariamente están causadas por microorganismos que tiene su origen en el intestino. La microbiota predominante en la vagina humana sana está compuesta por una variedad de especies de *Lactobacillus*, los cuales tienen un papel esencial en la protección frente a las infecciones genitales. Una alteración en la población de *Lactobacillus* puede dar como resultado un desajuste microbiano en la vagina, causando un cambio de

lactobacilos a una microbiota mixta dominada por bacterias anaerobias como las especies *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Mobiluncus*, alteración que se denomina vaginosis bacteriana (Daliri y Lee, 2015). Actualmente, las únicas cepas que han demostrado clínicamente un efecto son *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri*. Cuando estas cepas son administradas por vía intravaginal (supositorio) una vez a la semana o dos veces al día por vía oral, se produce una reducción en la incidencia de las infecciones urinarias y además, ayudan a restaurar una microbiota vaginal normal dominada por los lactobacilos en las pacientes afectadas, es decir, promueven la colonización de la microbiota beneficiosa y de esta forma, pueden ayudar a mantener la salud vaginal. Cuando los probióticos eran ingeridos por vía oral, colonizaban el intestino, y las cepas eran transferidas de forma pasiva del recto a la vagina. (Reid y Bruce, 2006).

También se ha estudiado el efecto de los probióticos en la prevención de infecciones del tracto respiratorio. Se cree que el factor protector de los probióticos en el tracto intestinal puede estar relacionado con un aumento de las IgA, con la regulación positiva de las células asesinas naturales y los macrófagos en la mucosa de las vías respiratorias (Del Giudice et al., 2012). En 2009 Rautava, Salminen y Isolauri realizaron un estudio en el que se administró diariamente a un grupo de niños de menos de 2 meses una fórmula infantil suplementada con *L. rhamnosus* GG y *B. lactis* Bb-12 y se estableció otro grupo placebo, manteniendo el estudio hasta los 12 meses de edad. Durante el primer año de vida solo el 28% de los niños que recibieron dicha fórmula presentaron infecciones respiratorias recurrentes. Mientras que, en el grupo que recibía el placebo el 55% presentó infecciones respiratorias durante el primer año. Por tanto, se concluyó que los probióticos pueden ser una forma segura de reducir las infecciones respiratorias durante el primer año de edad.

Otro estudio realizado por Sazawal et al. (2010) en niños de 1-4 años, demostró los efectos beneficiosos de añadir *B. lactis* HN019 a la leche, permitiendo prevenir y controlar infecciones respiratorias.

Muchos de estos efectos beneficiosos han sido asociados, tras realizar diversos estudios, con bacterias con propiedades probióticas, como se muestra en la Tabla 2. Para producir estos beneficios y ser considerados como alimentos funcionales, los microorganismos presentes tienen que permanecer viables y ser capaces de colonizar el lugar/órgano donde se pretende que sean activos.

5.4. Estudio para conocer la aceptación de las leches fermentadas por los consumidores.

Para poder llevar a cabo un estudio para conocer la aceptación de las leches fermentadas probióticas por parte de los consumidores, se ha realizado una encuesta con la herramienta "formularios google" en la que se han planteado las preguntas mencionadas en el apartado de metodología y se han obtenido un total de 307 respuestas.

La mayoría de las respuestas procedían de mujeres (75,2%) entre 16 y 30 años, seguidos del grupo de 45 a 60 años, cuya ocupación era, en su mayoría, estudiante (47,9%) o trabajador/a (39,4%).

Solo el 13,4% de las personas que realizaron la encuesta no habían escuchado el término probiótico, frente a un 86,6% que sí lo había hecho. En su mayoría, fue en los medios de comunicación el lugar donde habían escuchado este término (televisión, revistas, periódicos, etc.), seguido de internet, en clase, en el supermercado, en las etiquetas de productos lácteos y en el médico. En cuanto a la atribución de un efecto positivo o negativo a este término, el 98,4% de las respuestas corresponden al efecto positivo. Además, la mayoría de los encuestados conocía la definición de probiótico, pues se propuso una elección entre dicha definición y la definición de prebióticos, y en esta pregunta el 81,4% de las personas marcó la opción que contenía la respuesta correcta. Por tanto, con el resultado de las respuestas de estas primeras preguntas podemos concluir que actualmente el término probiótico está bastante extendido y que la mayoría de las personas tiene cierto conocimiento acerca de él. Quizás, si esta encuesta se hubiese realizado hace 15 años, los resultados serían diferentes, ya que este término no estaba tan extendido, como se ha puesto de manifiesto en el análisis realizado de las publicaciones en los últimos veinte años (Figura 1).

Se preguntó a los encuestados qué alimento les venía a la cabeza al escuchar el término leches fermentadas probióticas, a lo que se obtuvieron respuestas como yogur, kéfir y Actimel. También se preguntó sobre el consumo de estos productos, de las 4 opciones dadas, el más consumido por los encuestados fue el yogur (Figura 8).

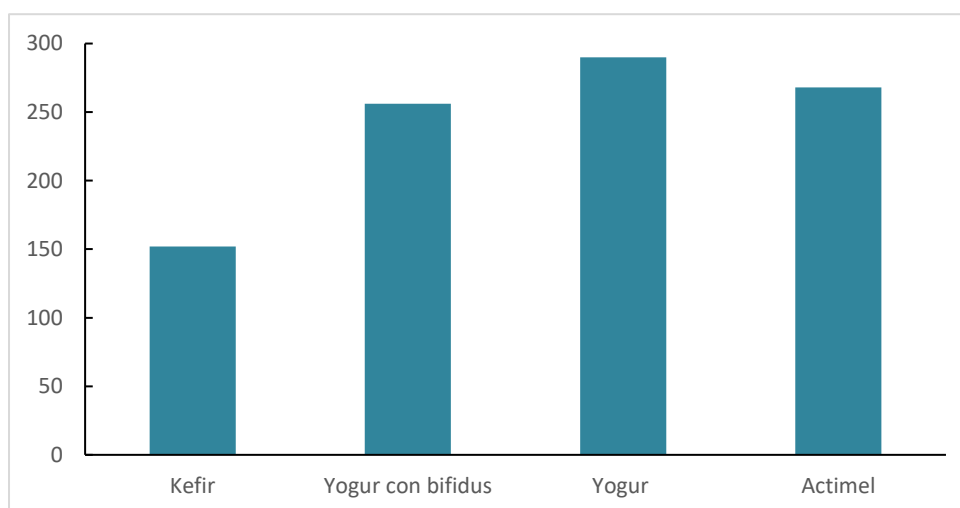


Figura 8: Resultados obtenidos sobre el consumo de leches fermentadas probióticas en la encuesta lanzada.

Las respuestas obtenidas sobre la frecuencia de consumo indican que estos alimentos, en su mayoría, se consumen con una frecuencia semanal (44,6%) o diaria (32,2%), mientras que el resto del porcentaje se atribuye a un consumo mensual o anual (Figura 9).

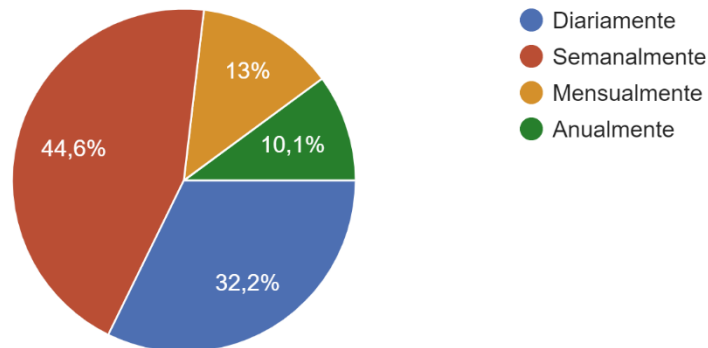


Figura 9: Frecuencia de consumo de leches fermentadas según los resultados obtenidos en la encuesta.

Según un estudio realizado por la comunidad de Madrid en el año 2003 sobre el diagnóstico de la situación del mercado y del etiquetado de las leches fermentadas, se analizaron los precios de las leches fermentadas en los supermercados de dicha comunidad. Aunque se trata de un estudio antiguo, la información proporcionada es de gran interés. Se llevó a cabo una comparación entre los precios de los yogures naturales tradicionales y las nuevas variedades de leches fermentadas, observándose que estas últimas eran más caras que el yogur tradicional (precio medio 0,13-0,14 €/100 g), encontrándose las menores diferencias en las leches fermentadas pasteurizadas y las fermentadas con bifidobacterias, cuyo precio se eleva un 31% respecto al de los yogures. Los productos más caros eran los ecológicos y el kéfir. Las leches fermentadas con diferentes especies de *Lactobacillus* o con propiedades saludables, los griegos y las mousses representaban un aumento del 60% sobre el valor del yogur natural (Figura 10).

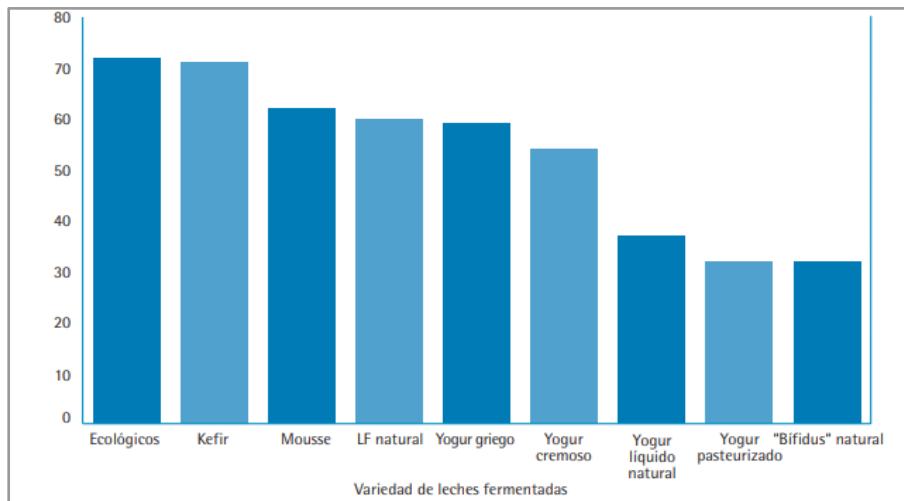


Figura 10: Aumento del precio (en porcentaje) de las nuevas variedades de leches fermentadas con respecto al yogur natural tradicional (Montero Marín et al., 2003). LF: otras leches fermentadas con distintas especies de *Lactobacillus*. "Bífidus": leches fermentadas con Bifidobacterias.

Estas diferencias de precio entre los yogures tradicionales y las nuevas leches fermentadas, suelen venir justificadas por la aportación de propiedades saludables gracias a la presencia de determinados microorganismos probióticos, ácidos grasos vegetales, o enriquecimientos respecto al yogur tradicional, así como por propiedades organolépticas diferentes, como ocurre con el yogur griego o el cremoso (Montero et al., 2003).

Por tanto, en la encuesta realizada, se planteó la pregunta de si los encuestados estarían dispuestos a pagar más por una leche fermentada. El resultado de dicha pregunta permite concluir que más de la mitad de los encuestados (54,7%), pagaría más por este tipo de productos, mientras que la otra mitad (45,3%) no lo haría.

Por último, como se indica en el apartado 5.3, a las leches fermentadas probióticas se le atribuyen varios efectos beneficiosos sobre la salud, por lo que se planteó a los encuestados una pregunta en la que debían seleccionar cuales de las opciones dadas (prevención de problemas gastrointestinales, prevención o alivio de alergias y dermatitis atópica en niños, reducción de la intolerancia a la lactosa) son efectos beneficiosos atribuidos a las leches fermentadas probióticas. En este caso se planteó también la opción de marcar todas las respuestas, siendo esta la elección correcta (Figura 11).

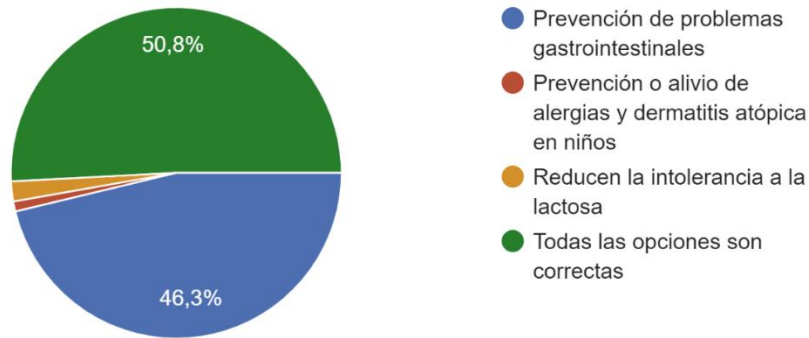


Figura 11: Porcentaje de respuestas a la pregunta ¿Cuáles de estos beneficios crees que se pueden atribuir al consumo de leches fermentadas probióticas para tu salud?

La mitad de los encuestados (50,8%) respondieron correctamente, seleccionando que todas las respuestas eran correctas, por tanto, pensando que todos los efectos dados como opción podían atribuirse al consumo de leches fermentadas probióticas. Sin embargo, prácticamente la otra mitad de las respuestas obtenidas (46,3%) se dirigieron exclusivamente a la opción de prevención de problemas intestinales. Esto puede deberse a que hay un cierto desconocimiento sobre los efectos beneficiosos que se pueden atribuir a los probióticos siendo el más conocido el de la prevención de problemas intestinales. Dicho conocimiento podría estar determinado por la publicidad que se hace de este tipo de alimentos a través de los medios de comunicación, donde encontramos slogans como “Sonríe desde dentro, Activia”, “¿Quieres hacer feliz a tu barriga?, Activia”, “Activia mejora tu salud intestinal”, ‘Sentirse bien comienza por dentro’ o “Activia ayuda a tu digestión”. Todo esto ha podido influir en la opinión de los encuestados sobre los efectos de estos alimentos, ya que en la mayoría de los slogans se utilizan términos como “barriga”, “intestinal”, “digestión”.



Figura 12: Slogans publicitarios de los yogures Activia (Danone, 2019).

5.5. Análisis de la legislación española y europea referente a las leches fermentadas probióticas.

El uso de los probióticos en alimentación humana no se encuentra regulado por ninguna legislación específica, por tanto, no existen requisitos específicos para los mismos, ni una lista de probióticos autorizados, esto no quiere decir que no se puedan emplear en alimentación. Para algunos alimentos, como las leches fermentadas probióticas, estos microorganismos son fundamentales para su fabricación (AESAN, 2020).

El uso de probióticos en alimentación está sujeto a los requisitos generales establecidos en el Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la Seguridad Alimentaria. Para el empleo de estos probióticos debe tenerse en cuenta que el artículo 14 del Reglamento establece, entre otras cosas, que no se comercializarán los alimentos que no sean seguros.

Dado que no existe una lista de microorganismos autorizados a nivel de la Unión Europea, se toma como referencia para su uso seguro en alimentos la lista de QPS de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que se basa en pruebas razonables. Si una evaluación concluye que un grupo de microorganismos no plantea problemas de seguridad, se asigna al grupo el estatus de “QPS: qualified presumption of safety (presunción cualificada de seguridad)” (EFSA, 2019).

La norma Codex para leches fermentadas (CODEX STAN 243-2003), se aplica a nivel internacional para todas las leches fermentadas, incluyendo las leches fermentadas tratadas térmicamente, las leches fermentadas concentradas y los productos lácteos compuestos basados en estos productos.

Ciertas leches fermentadas se caracterizan por un cultivo específico (o cultivos específicos) utilizado para su fermentación como se refleja en la Tabla 6.

Tabla 6: Leches fermentadas que se caracterizan por un cultivo específico utilizado para la fermentación según la norma CODEX STAN 243-2003.

Yogur:	Cultivos simbióticos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> .
Yogur en base a cultivos alternativos:	Cultivos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y toda especie <i>Lactobacillus</i> .
Leche acidófila:	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .
Kefir:	Cultivo preparado a partir de gránulos de kefir, <i>Lactobacillus kefir</i> , especies del género <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Acetobacter</i> que crecen en una estrecha relación específica. Los gránulos de kefir constituyen tanto levaduras fermentadoras de lactosa (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) como levaduras fermentadoras sin lactosa (<i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces exiguus</i>).
Kumys:	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i> .

Según esta norma, podrán agregarse otros microorganismos aparte de los que constituyen el cultivo específico (o los cultivos específicos) especificados anteriormente.

En esta norma también se determinan las materias primas, ingredientes y aditivos permitidos, así como, la composición de estas leches fermentadas probióticas (Tabla 7).

Tabla 7: Composición que deben de tener las leches fermentadas según la norma CODEX STAN 243-2003.

	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativos y leche acidófila	Kefir	Kumys
Proteína láctea ^(a) (% w/w)	mín. 2,7%	mín. 2,7%	mín. 2,7%	
Grasa láctea (% w/w)	menos del 10%	menos del 15%	menos del 10%	menos del 10%
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (% w/w)	mín. 0,3%	mín. 0,6%	mín. 0,6%	mín. 0,7%
Etanol (% vol./w)				mín. 0,5%
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido en la sección 2.1 (ufc/g, en total)	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷
Microorganismos etiquetados ^(b) (ufc/g, en total)	mín. 10 ⁶	mín. 10 ⁶		
Levaduras (ufc/g)			mín. 10 ⁴	mín. 10 ⁴
(a) El contenido en proteínas es 6,38 multiplicado por el nitrógeno Kjeldahl total determinado. (b) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico (aparte de aquellos especificados en la sección 2.1 para el producto en cuestión) que ha sido agregado como complemento del cultivo específico.				

En cuanto al etiquetado en los alimentos que incluyen microorganismos probióticos, el Reglamento (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos establece que: "en el etiquetado, presentación o publicidad de un alimento solamente están permitidas las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables que se encuentren autorizadas de acuerdo con los procedimientos del Reglamento y siempre que cumplan con las condiciones de uso establecidas para cada una de ellas".

El panel sobre productos dietéticos, nutrición y alergias (NDA) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) evaluó las solicitudes de microorganismos presentadas bajo el artículo 13 sobre las declaraciones de propiedades saludables distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y salud de los niños y publicó los correspondientes dictámenes, todos ellos desfavorables, excepto la relativa a los microorganismos vivos *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* del yogur o la leche fermentada que contengan un mínimo de 10⁸ unidades formadoras de colonias por gramo, de manera que, para estos dos tipos de microorganismos, se puede hacer la siguiente declaración: "los cultivos vivos del yogur o de la leche fermentada mejoran la digestión de la lactosa del producto en las personas con problemas para digerir la lactosa" (AESAN, 2020).

Para una gran variedad de especies bacterianas y sus posibles efectos en la salud, existen una serie de

dictámenes de la EFSA no favorables, ya sea por falta de ensayos de intervención que permitieran fundamentar científicamente las declaraciones, porque se tratan de declaraciones demasiado generales y no específicas o por haberse realizado los estudios en personas enfermas (AESAN, 2020).

6. CONCLUSIÓN

Las leches fermentadas son el principal grupo de productos que aporta microorganismos probióticos a la población. Aunque estos han sido consumidos desde la antigüedad, en las últimas décadas ha aumentado su popularidad. Esto ha hecho que se haya despertado mayor interés sobre este grupo de alimentos y hayan aumentado los estudios y la bibliografía que se refiere a ellos.

Son varios los microorganismos que se pueden emplear para proporcionar propiedades probióticas y a la mayoría de ellos se les atribuyen propiedades beneficiosas. Gracias a la cantidad de estudios que se han realizado en los últimos años se han podido analizar muchos de estos efectos beneficiosos. Sin embargo, todavía hace falta realizar muchos más estudios para poder certificar estos efectos en los seres humanos.

La encuesta realizada permite concluir que la mayoría de personas que la han realizado conoce y consume este tipo de alimentos, pero en la mayoría de ellos hay una falta de conocimiento, sobre todos los efectos beneficiosos que se puede atribuir a los probióticos.

Por último, cabe concluir que la legislación que hace referencia a las probióticos es muy escasa, sería necesaria una mejor regulación de estos, desarrollando una normativa que incluya una definición legal, las características que han de tener los probióticos y una lista de los productos aprobados.

CONCLUSION

Fermented milks are the main group of products that provide probiotic microorganisms to population. Even if this type of food has been eaten since ancient times, its popularity has increased in the last decades. This popularity reflected an increment of interest in this group of foods by experts, which resulted in an increase in the number of references related to them.

Several microorganisms can be employed to provide probiotic properties, most of these microorganisms are related to beneficial properties. Thanks to the huge number of references available nowadays, most of these beneficial effects have been analysed. However, further studies are needed to certify these effects in humans.

By analysing the results of the survey, and evidence of knowledge and consumption of this type of products it can be concluded from the majority of responses. Nevertheless, for most of the surveyed, a lack of knowledge about all the beneficial effects related to these products has been detected.

Lastly, in my opinion, there are only a few pieces of legislation that refers to probiotics. Therefore, better regulation for those ones is needed. This can be solved by developing new laws, including a legal definition for probiotics, their characteristics and a list of approved products.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este trabajo me ha servido para ampliar y reforzar los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, sobre todo los de la asignatura de Tecnología de la Leche y Ovoproductos. Además me ha ayudado a conocer más a fondo el panorama científico actual en lo referente a las leches fermentadas probióticas. A través de la encuesta lanzada, he aprendido manejar la herramienta "formularios Google" y a interpretar los resultados obtenidos, pudiendo concluir así cual es el conocimiento y el consumo de la población de este tipo de alimentos.

También, me ha servido para aprender a trabajar de forma más autónoma, desarrollando a su vez mi capacidad para gestionar la información, búsqueda de fuentes, recogida y análisis de informaciones etc. y dado que, la mayoría de artículos consultados son en inglés, me ha servido para seguir reforzando mis conocimientos en este idioma, aprender una gran cantidad de vocabulario en lo referente al tema y transmitir información, tanto en castellano como en inglés.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, (AESAN) (2020). *Probióticos en los alimentos*. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/probioticos.htm [Consultado: 5/06/2021].
- Badgeley, A., Anwar, H., Modi, K., Murphy, P. y Lakshmikuttyamma, A. (2021). "Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1875(1), pp. 188494. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188494.
- Brady, L.J., Gallaher, D.D. y Busta, F.F. (2000). "The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer". *The Journal of Nutrition*, 130(2S), pp. 410S-414S. DOI: 10.1093/jn/130.2.410S.
- Botelho, P.B., Ferreira, M.V.R., Araújo, A.D.M., Mendes, M.M. y Nakano, E.Y. (2020). "Effect of multispecies probiotic on gut microbiota composition in individuals with intestinal constipation: A double-blind, placebo-controlled randomized trial". *Nutrition*, 78, pp. 110890. DOI: 10.1016/j.nut.2020.110890.
- Cakebread, J.A. (2020). "Fermented Milks: Health Effects of Fermented Milk". En: *Reference Module in*

- Food Science*. Amsterdam, Países Bajos: Elsevier . DOI: 10.1016/B978-0-12-818766-1.00203-8.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. y Webb, C. (2003). "Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions". *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), pp. 133-141. DOI: 10.1016/S0168-1605(02)00248-9.
- CODEX STAN 243-2003. Norma del codex para leches fermentadas. Leche y productos lácteos. 2da edición. Disponible en: <http://www.fao.org/3/i2085s/i2085s.pdf> [Consultado 16/02/2021].
- Collado, M.C., Sanz, Y. y Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61, pp. 476-482.
- Collantes, F. (2012). *El consumo de productos lácteos en España, 1950-2010*. Sociedad Española de Historia Agraria. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10234/41581> [Consultado 23/04/2021].
- Daliri, E.B. y Lee, B.H. (2015). "New perspectives on probiotics in health and disease". *Food Science and Human Wellness*, 4(2), pp. 56-65. DOI: 10.1016/j.fshw.2015.06.002.
- Danone. (2019). Activia. Disponible en: <https://www.activia.es/> [Consultado 30/05/2021].
- De Paula, J.A., Carmuega, E. y Weill, R. (2008). "Effect of the ingestion of a symbiotic yogurt on the bowel habits of women with functional constipation". *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 38(1), pp. 16-25.
- De Vuyst, L. (2000). "Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures". *Food Technology Biotechnology*, 38, pp. 105-112.
- Del Giudice, M.M., Leonardi, S., Ciprandi, G., Galdo, F., Gubitosi, A., La Rosa, M., Salpietro, C., Marseglia, G. y Perrone, L. (2012). "Probiotics in Childhood: Allergic Illness and Respiratory Infections". *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46 Suppl, pp. 69-72. DOI: 10.1097/MCG.0b013e318266fea7.
- Drisko, J.A., Giles, C.K. y Bischoff, B.J. (2003). "Probiotics in health maintenance and disease prevention". *Alternative Medicine Review*, 8(2), pp. 143-155.
- EFSA. (2019). *Presunción cualificada de seguridad (QPS)*. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps> [Consultado: 7/06/2021].
- El-Kholy, W.M., Aamer, R.A. y Ali, A.N.A. (2020). "Utilization of inulin extracted from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots to improve the properties of low-fat synbiotic yoghurt". *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1), pp. 59-67. DOI: 10.1016/j.aoas.2020.02.002.
- FAO/ OMS. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a0512s/a0512s.pdf> [Consultado 16/02/2021].
- FENIL- Federación Nacional de Industrias Lácteas. (2019). Consumo nacional de productos lácteos. Disponible en: <http://fenil.org/consumo-nacional-de-productos-lacteos/> [Consultado 22/02/2021].

- Ferguson, L. R. (2009). "Nutrigenomics approaches to functional foods". *Journal of the American Dietetic Association*, 109(3), pp. 452–458. DOI: 10.1016/j.jada.2008.11.024.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F. y Gramenzi, A. (2016). "Probiotics History". *Journal of Clinical Gastroenterology*, 50, pp. S116-S119. DOI: 10.1097/mcg.0000000000000697.
- Güler-Akin, M.,B. (2005). "The effects of different incubation temperatures on the acetaldehyde content and viable bacteria counts of bio-yogurt made from ewe's milk". *International Journal of Dairy Technology*, 58(3), pp. 174-179. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2005.00209.x.
- Hendler, R., y Zhang, Y. (2018). "Probiotics in the Treatment of Colorectal Cancer". *Medicines*, 5(3), pp. 101-115. DOI: 10.3390/medicines5030101.
- Hickson, M., D'Souza, A.L., Muthu, N., Rogers, T.R., Want, S., Rajkumar, C. y Bulpitt, C.J. (2007). "Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial". *The British Medical Journal*, 335(7610), pp. 80-85. DOI: 10.1136/bmj.39231.599815.55.
- Indrio, F., Riezzo, G., Raimondi, F., Bisceglia, M., Cavallo, L. y Francavilla, R. (2008). "The Effects of Probiotics on Feeding Tolerance, Bowel Habits, and Gastrointestinal Motility in Preterm Newborns". *The Journal of Pediatrics*, 152(6), pp. 801-806. DOI: 10.1016/j.jpeds.2007.11.005.
- Ishikawa, H., Akedo, I., Otani, T., Suzuki, T., Nakamura, T., Takeyama, I., Ishiguro, S., Miyaoka, E., Sobue, T. y Kakizoe, T. (2005). "Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors". *International Journal of Cancer*, 116(5), pp. 762-767. DOI: 10.1002/ijc.21115.
- Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E. y Salminen, S. (2000). "Probiotics in the management of atopic eczema". *Clinical & Experimental Allergy*, 30(11), pp. 1605-1610. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2000.00943.x.
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirath, P., Ananta, E. y Mercenier, A. (2010). "Application of probiotics in food products—challenges and new approaches". *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), pp. 175-181 DOI: 10.1016/j.copbio.2010.03.009.
- Karimi, R., Mortazavian, A. y Da Cruz, A. (2011). "Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review". *Dairy Science & Technology*, 91(3), pp. 283-308. DOI: 10.1007/s13594-011-0005-x.
- Khorshidian, N., Yousefi, M. y Mortazavian A.M. (2020). "Fermented milk: The most popular probiotic food carrier". En: Gomes da Cruz, A., Prudencio, E., Esmerino, E., Da Silva, M.C. (Eds.). *Probiotic and Prebiotics in Foods: Challenges, Innovations and Advances*, 94 (1). Oxford, Reino Unido: Elsevier, pp. 91-107.
- Khosrokhavar, R. y Mortazavian, A.M. (2010). "Effects probiotic-containing microcapsules on viscosity, phase separation and sensory attributes of drink based on fermented milk ". *Michwissenschaft*,

65(2), pp. 177-179.

- McFarland, L.V. (2015). "From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics". *Clinical Infectious Diseases*, 60 (suppl 2), pp. S85-S90. DOI: 10.1093/cid/civ054.
- Maftai, N.M. (2019). "Probiotic, Prebiotic and Synbiotic Products in Human Health" En: Solís-Oviedo, R.L. (Ed.). *Frontiers and new trends in the science of fermented food and beverages*. Chihuahua, México: IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.81553.
- Majamaa, H. y Isolauri, E. (1996). "Evaluation of the gut mucosal barrier: Evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema". *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97(4), pp. 985-990. DOI: 10.1016/S0091-6749(96)80074-1.
- Martínez Gómez, M.J. y Muñoz Codoceo, R.A. (2013) *El probiótico: Probioticoterapia en gastroenterología*. Madrid, España: Pharma and Health Consulting. Disponible en: <https://www.elprobiotico.com/continguts/manualProbioticoterapia.pdf> [Consultado 8/03/2021]
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/eu/alimentacion/temas/consumo-tendencias/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/default.aspx> [Consultado: 23/03/2021].
- Montero Marín, A., Limia Sánchez, A., Pérez Landeras, P., Quintana de Arcos, C., Franco Vargas, E., Moreno Alcalde, S., y Belmonte Cortés, S. (2003). "Leches Fermentadas en la Comunidad de Madrid. Diagnóstico de situación del mercado y del etiquetado". *Documentos Técnicos de Salud Pública nº 106*. Disponible en: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009021.pdf> [Consultado: 3/06/2021].
- Mohammadi, R., Mortazavian, A.M., Khosrokhavar, R. y da Cruz, A.G. (2011). "Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties". *Annals of Microbiology*, 61(3), pp. 411-424. DOI: 10.1007/s13213-010-0188-z.
- Mohammadi, R., Sohrabvandi, S. y Mohammad Mortazavian, A. (2012). "The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks". *Engineering in Life Sciences*, 12(4), pp. 399-409. DOI:10.1002/elsc.201100125.
- Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Reinheimer, J.A., Emamdjomeh, Z., Sohrabvandi, S. y Rezaei, K. (2006). "Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic microorganisms in freshly made yogurt". *International Journal of Dairy Technology*, 59(1), pp. 8-11. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2006.00216.x
- Mortazavian, A.M., Ghorbanipour, S., Mohammadifar, M.A. y Mohammadi, M. (2011). "Biochemical properties and viable probiotic population of yoghurt at different bacterial inoculation rates and incubation temperatures". *Philippine Agricultural Scientist*, 94(2), pp. 155-160. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH2012000033> [Consultado: 03/04/2021].
- Mortazavian, A.M., Sohrabvandi, S., Mousavi, S.M. y Reinheimer, J.A. (2006). "Combined effects of temperature-related variables on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt". *Australian*

- Journal of Dairy Technology*, 61(3), pp. 248-252.
- Oak, S.J. y Jha, R. (2019). "The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(11), pp. 1675-1683. DOI: 10.1080/10408398.2018.1425977.
- Oliveira, M., Remeuf, F. y Corrieu, G. (2001). "Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria". *International Dairy Journal*, 11, pp. 935-942. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00142-X.
- Olveira, G. y González-Molero, I. (2007). "Probióticos y prebióticos en la práctica clínica". *Nutrición Hospitalaria*, 22, pp. 26-34. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000500005 [Consultado 20/02/2021].
- Olveira, G. y González-Molero, I. (2016). "An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition". *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 63(9), pp. 482-494. DOI: 10.1016/j.endoen.2016.10.011.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S. y Isolauri, E. (2002). "Probiotics: an overview of beneficial effects". *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1), pp. 279-289. DOI: 10.1023/A:1020620607611.
- Pala, V., Sieri, S., Berrino, F., Vineis, P., Sacerdote, C., Palli, D., Masala, G., Panico, S., Mattiello, A., Tumino, R., Giurdanella, M. C., Agnoli, C., Grioni, S., y Krogh, V. (2011). "Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort". *International Journal of Cancer*, 129(11), pp. 2712–2719. DOI: 10.1002/ijc.26193.
- Parra Huertas, R.A. (2010). "Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos". *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1), pp. 94-105. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf> [Consultado: 14/06/2021].
- Pregliasco, F., Anselmi, G., Fonte, L., Giussani, F., Schieppati, S., & Soletti, L. (2008). "A new chance of preventing winter diseases by the administration of synbiotic formulations". *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42 (3), pp. S224–S233. DOI:10.1097/MCG.0b013e31817e1c91
- Rautava, S., Salminen, S., e Isolauri, E. (2009). "Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy-a randomised, double-blind, placebo-controlled study". *The British Journal of Nutrition*, 101(11), pp. 1722–1726. DOI: 10.1017/S0007114508116282,
- Reid, G. y Bruce, A.W. (2006). "Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence". *World Journal of Urology*, 24(1), pp. 28-32. DOI: 10.1007/s00345-005-0043-1.
- Requena, T., Janer, C. y Peláez, C. (2005) Leches fermentadas probióticas. Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos. Instituto del Frío (CSIC). Madrid. Disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5774/1/Leches_probioticas_AGROCSIC.pdf [Consultado

23/02/2021].

- Robinson, R. y Tamime, A.Y. (2007). "Types of Fermented Milks". En: Tamime, A.Y. (Ed.). *Fermented Milks*. Ayr, Reino Unido: Blackwell Science, pp. 1-10.
- Roy, D. (2005). "Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products". *Le Lait*, 85(1-2), pp. 39-56. DOI: 10.1051/lait:2004026.
- Sánchez Paniagua, L. y Pérez Cabrejas, D. (2005). "Leches fermentadas: Aspectos nutritivos, tecnológicos y probióticos más relevantes". *Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria*. Disponible en: https://www.aragon.es/documents/20127/674325/LECHES_FERMENTADAS.pdf/62a7dc81-fd9d-a459-c789-b312b658f459 [Consultado 19/02/2021].
- Sazawal, S., Dhingra, U., Hiremath, G., Sarkar, A., Dhingra, P., Dutta, A., Verma, P., Menon, V.P. y Black, R.E. (2010). "Prebiotic and Probiotic Fortified Milk in Prevention of Morbidities among Children: Community-Based, Randomized, Double-Blind, Controlled Trial". *PLoS ONE*, 5(8), pp. e12164. DOI: 10.1371/journal.pone.0012164.
- Schrezenmeir, J. y De Vrese, M. (2008). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. En: Stahl, U., Donalies, U.E.B., Nevoigt, E. (Eds.). *Food Biotechnology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.*, Berlín, Alemania: Springer, 111, pp. 1-66. DOI: 10.1007/10_2008_097.
- Sebastián Domingo, J.J. (2017). "Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults". *Gastroenterología y Hepatología*, 40(6), pp. 417-429. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2016.12.003.
- Shafiee, G., Mortazavian, A.M., Amin Mohammadifar, M., Koushki, M. y Mohammadi, A. (2010) "Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk". *African Journal of Microbiology Research*, 4(12) pp. 1265-1274. DOI: 10.5897/AJMR.9000176.
- Shanahan, F. (2000). "Probiotics and Inflammatory Bowel Disease: Is There a Scientific Rationale?". *Inflammatory Bowel Diseases*, 6(2), pp. 107-115. DOI: 10.1097/00054725-200005000-00007.
- Suárez, J.E. (2013). "Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos". *Nutrición Hospitalaria*, 28(1) pp. 38-41. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-16112013000700009&script=sci_arttext&tIng=en [Consultado 2/03/2021].
- Szajewska, H. y Kołodziej, M. (2015). "Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea". *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 42(7), pp. 793-801. DOI: 10.1111/apt.13344.
- Tabasco Rentero, R. (2009). *Bacterias probióticas en leche fermentada. Viabilidad, capacidad competitiva y efecto en la evolución de patologías intestinales*. Tesis doctoral. CSIC - Instituto del Frío, Universidad Autónoma de Madrid.
- Taibi, A., y Comelli, E. M. (2014). "Practical approaches to probiotics use". *Applied Physiology*,

- Nutrition, and Metabolism*, 39(8), pp. 980–986. DOI: 10.1139/apnm-2013-0490.
- Talwalkar, A., Miller, C.W., Kailasapathy, K. y Nguyen, M.H. (2004). "Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt". *International Journal of Food Science and Technology*, 39, pp. 605-611. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2004.00820.x.
- Tissier, H. (1906). "Treatment of intestinal infections using bacterial flora of the intestine". *Critical Reviews of the Society for Biology*, 60, pp. 359-361.
- Vedamuthu, R.C. (2013). "Starter Cultures for Yogurt and Fermented Milks". En: Chandan, R.C., Kilara, K. (Eds.). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Oregon, EEUU: Blackwell Publishing, pp. 89-116.
- Vinderola, C.G., Costa, G.A., Regenhardt, S. y Reinheimer, J.A. (2002). "Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria". *International Dairy Journal*, 12(7), pp. 579-589. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00046-8.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G. y Pool-Zobel, B. (2001). "Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), pp. 451s-455s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.451s.