

## **ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE CULTIVOS LÁCTICOS PROBIÓTICOS EN PRESENCIA DE PREBIÓTICOS**

*Oxalis Rodríguez-Martínez<sup>1\*</sup>, Miriam Rosales-Sánchez<sup>2</sup>, Margarita Sánchez-Gallardo<sup>2</sup>, Hillary Cuellar-Matos<sup>2</sup>, Enrique R. Pérez-Cruz<sup>4</sup> y Carmen Menéndez<sup>5</sup>*

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Pesqueras. Calle 246 entre 5ta Ave y Mar. Playa. La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao km 3 ½, La Habana, CP19200, Cuba.

<sup>3</sup>Facultad de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba.

<sup>4</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spíritus, Cuba.

<sup>5</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

E-mail: [oxalis@cip.alinet.cu](mailto:oxalis@cip.alinet.cu)

Recibido: 15-12-2020 / Revisado: 17-12-2020 / Aceptado: 28-12-2020 / Publicado: 06-01-2021

### **RESUMEN**

El objetivo del trabajo fue evaluar el comportamiento de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidus* cuando se incorporan prebióticos al medio de cultivo. Se adicionó una solución de fructooligosacáridos como única fuente de carbono en una proporción del 2 % al caldo Man, Rogosa and Sharpe. Los tubos con medio y prebiótico se inocularon con un 2 % de monocultivos de *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. bifidus*. Se incubaron las muestras en condiciones de microaerofilia a 37 °C. Se tomaron alícuotas a las 0 y 72 h de fermentación para determinar el cambio del pH y el contenido de azúcares. Se evaluó el desarrollo de acidez y pH de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* cuando se adiciona un sirope que contiene otros azúcares y prebióticos. Se obtuvo disminución de pH y de las concentraciones de los fructooligosacáridos en todas las variantes estudiadas a las 72 h de fermentación. Los resultados indican que los microorganismos estudiados son capaces de degradar los prebióticos presentes en el medio de cultivo. La presencia del sirope prebiótico cubano en el medio de cultivo no inhibe el desarrollo de la fermentación de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*.

**Palabras clave:** bacterias lácticas, probióticos, prebiótico, fructooligosacáridos.

---

\***Oxalis Rodríguez-Martínez:** Licenciada en Microbiología (U.H., 2002). Máster en Ciencias Microbiológicas (UH, 2007). Investigador Auxiliar (2014). Jefa de la Sección de Microbiología. Labora en el control de la calidad microbiológica de productos pesqueros y en el aprovechamiento de los descartes pesqueros para la obtención de productos de valor agregado.

### **ABSTRACT**

#### **Study of the behavior of probiotic lactic cultures in the presence of prebiotics**

The objective of this work was to evaluate the behavior of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidus* when prebiotics are incorporated into the culture medium. A fructooligosaccharide solution was added as unique carbon source in a proportion of 2% to the Man, Rogosa and Sharpe broth. The tubes with medium and prebiotic were inoculated with 2% monoculture of *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. bifidus*. Samples were incubated under microaerophilic conditions at 37 °C. Aliquots were taken at 0 and 72 h of fermentation to determinate the change in pH and the sugar content. A decrease in pH and the concentrations of the fructooligosaccharides were obtained in all the variants studied after 72 h of fermentation. The results indicate that the microorganisms studied can degrade the prebiotics present in the culture medium.

**Keywords:** lactic bacteria, probiotic, prebiotic, fructooligosaccharides.

### **INTRODUCCIÓN**

La definición de probióticos dada por la OMS se refiere a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (1).

Los alimentos fermentados que contienen organismos vivos en muchas ocasiones no cumplirían con el concepto de probióticos si no se han estudiado específicamente sus efectos o no se conoce la cantidad que contienen. Por el contrario, algunos alimentos fermentados como el yogur sí podrían considerarse, en algunas circunstancias, probióticos en función de algunos efectos específicos, por ejemplo, por la evidencia de que mejora la digestión de la lactosa en intolerantes; los beneficios no dependen solo de que el producto contenga menos lactosa, sino de que las bacterias probióticas podrían incrementar, además, la actividad de la lactasa en el intestino delgado del consumidor (2).

Por otro lado, en la literatura se pueden encontrar criterios referidos a que un microorganismo se cataloga como probiótico si no sólo ejerce un efecto beneficioso sobre el huésped sino también tiene otras cualidades entre las que se cita la capacidad de degradar los prebióticos.

El término «prebiótico» se refiere a ingredientes alimenticios que son fermentados selectivamente por la biota beneficiosa intestinal y modifican su composición y actividad metabólica de manera que mejoran la salud del hospedero (3). El beneficio selectivo de los prebióticos sobre ciertos microorganismos también se puede encontrar en la literatura científica, como por ejemplo la ingestión de fructooligosacáridos y la inulina favorecen de forma selectiva a las bifidobacterias presentes en los consumidores (4).

La industria láctea cubana ha incorporado microorganismos probióticos, formando parte de las leches fermentadas que se comercializan por parte de las empresas de productos lácteos. El banco de cepas que suministra estos probióticos está ubicado en el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (IIIA). El Centro de Ingeniería Genética de La Habana diseñó un método para la discriminación de bacterias probióticas basado en el cambio de pH del medio y la degradación de las fracciones prebióticas. A las bacterias probióticas disponibles en el cepario del IIIA se le han realizado todas las pruebas disponibles que las avalan como probióticas, pero nunca se habían sometido a esta prueba. Por lo antes expuesto, se decidió llevar a cabo esta etapa de investigación persiguiendo el objetivo de evaluar el comportamiento de bacterias lácticas probióticas cuando se incorpora un jarabe con prebióticos al medio de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Santi Spiritus y el de La Habana. Los materiales y cultivos microbianos que se utilizaron durante los experimentos fueron medios de cultivo: Caldo Man, Rogosa and Sharpe (MRS) con 2 % de glucosa y el equivalente sin glucosa, ambos preparados por componentes; cultivos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidus*, procedentes del Banco de Cepas del IIIA; cultivos de LsdA de *G. diazotrophicus* (pALS5), cepa procedente del Cepario del CIGB; bromotimol azul como indicador (pH menor de 6: amarillo, de 6 a 7-verde y mayor de 7-azul) adquirido de Sigma Co., EE.UU. y producto prebiótico marca Mielogo procedente de China cuya composición fue de nistosa (0,52 %), kestosa (0,42 %), sacarosa (0,03 %) y glucosa (0,03 %). Las soluciones de trabajo fueron esterilizadas por filtración.

Se empleó el caldo de MRS con 2 % de glucosa como control positivo del medio para descartar la presencia de algún componente en el medio que afectara o beneficiara el crecimiento del microorganismo. Se adicionó al 2 % el producto prebiótico al caldo MRS sin glucosa para la realización de la evaluación del consumo del prebiótico por las bacterias lácticas empleadas. Se seleccionaron para el estudio los cultivos *L. acidophilus*, *L. casei*, y *B. bifidus* por formar parte de la gama de bacterias lácticas del banco de cepas del IIIA que tienen características probióticas. La cepa LsdA de *G. diazotrophicus* (pALS5) fue empleada en el estudio como control pues la misma es incapaz de degradar los FOS y si no hay suficientes azúcares simples libres en el medio pues no debe desarrollar cambio de coloración con indicador de pH.

Los medios de cultivo fueron inoculados con 1 % de cultivos de bacterias lácticas y de LsdA e incubados a 37 °C durante 72 h. Se recolectaron las variantes estudiadas a las 0 y 72 h y se verificaron los azúcares no consumidos por cromatografía líquida de alta resolución. Las determinaciones se efectuaron a partir de 20 µL de muestra en una columna Aminex HPX 42-C (BioRad, Richmond) a una temperatura de trabajo de 81,7 °C. Como fase móvil se utilizó agua destilada con pureza para HPLC, con una velocidad de 0,6 mL/min y una

presión de  $5,2 \times 10^6$  Pa. Se empleó un detector de índice de refracción Knauer Differential Refractometer modelo IPICNOU02.

A las 72 h se les adicionó el bromotimol azul a los tubos cultivados para verificar mediante el cambio de coloración la presencia de ácido producto de la fermentación. Se consideraron positivos los tubos con cambios de coloración de verde a amarillo.

Se realizó evaluación del crecimiento de *L. acidophilus* y *L. casei* en presencia de un sirope prebiótico cubano en el medio de cultivo. Para esta evaluación, se empleó el sirope prebiótico obtenido en la planta de sorbitol de Camagüey. El sirope contenía fructosa 2,6 % m/m, glucosa 18,8 % m/m, sacarosa 20,4 % m/m, fracción prebiótica (kestosa 54,4 % m/m y nistosa 3,8 % m/m). El sirope se adicionó al 4 % al medio MRS sin glucosa y se utilizó como patrón el mismo medio con glucosa al 2 %. Las dos variantes de medios fueron inoculadas con 1 % de monocultivos de *L. acidophilus* y *L. casei*. Se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se determinó la acidez (5) y el pH (6) a las 0, 3, 6 y 24 h de incubación.

Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple. Se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Duncan para comparar los valores medios de pH y de acidez obtenidos a las 0, 3, 6 y 24 h de incubación.

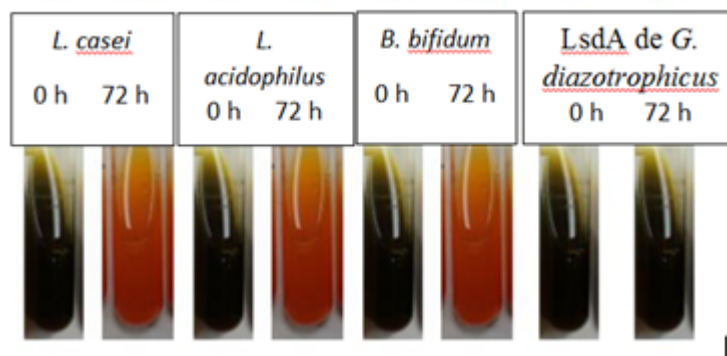
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 muestra que el crecimiento de las bacterias ácido lácticas promovió un cambio de color del medio desde un color verde inicial (pH 6,5) a amarillo (pH por debajo de 6) en el caldo MRS con el producto prebiótico.

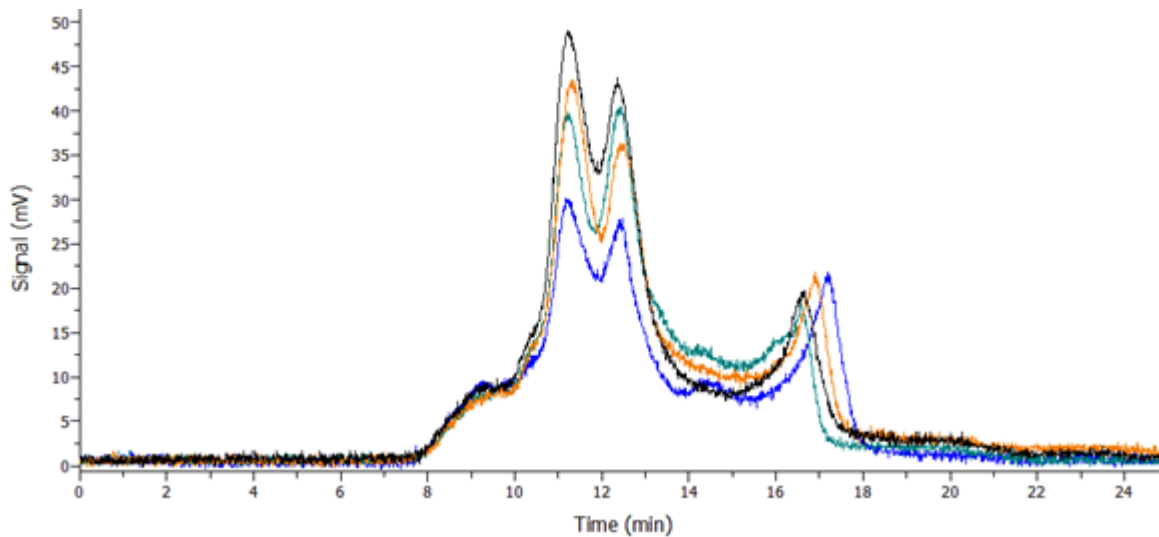
Debido al metabolismo fermentativo de estas bacterias se excretan ácidos al medio de cultivo promoviendo la acidificación del mismo. Ésta es la razón por la que el medio con la adición de bromotimol desarrolló el cambio de coloración. Este resultado sugiere que las bacterias ácido lácticas estudiadas fueron capaces de degradar los prebióticos presentes en el medio de cultivo.

El microorganismo empleado como control (cepa LsdA) mostró el comportamiento esperado. Creció en el medio con el producto prebiótico a expensas de los azúcares más simples sin producir una biomasa que lograra sintetizar ácidos que promovieran un cambio de coloración en el medio al adicionarle el bromotimol. Este resultado sirvió como indicador de que durante las condiciones del estudio las fracciones de FOS no se descompusieron en azúcares simples y sólo sufrieron modificación por la acción microbiana.

La Fig. 2 muestra las fracciones de los prebióticos (nistosa y kestosa) que se detectaron en el caldo MRS después de las 72 h de incubación. Se puede visualizar la disminución de las concentraciones de los FOS debido al desarrollo de los microorganismos probióticos a expensas de los mismos. De los tres microorganismos estudiados el que consumió mayor cantidad de prebióticos fue *B. bifidum*. La fermentación de estos prebióticos por parte de los microorganismos en estudio confirma el resultado obtenido del cambio de coloración en el medio cuando se le adicionó el indicador de pH. El comportamiento de las bacterias estudiadas resultó similar al publicado (7), donde proponen estos experimentos como un método para discriminar cepas probióticas. Los resultados de esta parte del estudio permiten confirmar una de las cualidades que deben tener las bacterias ácido



**Fig. 1. Caldo MRS con FOS y los microorganismos estudiados a las 0 h y después de 72 h de incubación con la adición del bromotimol azul.**

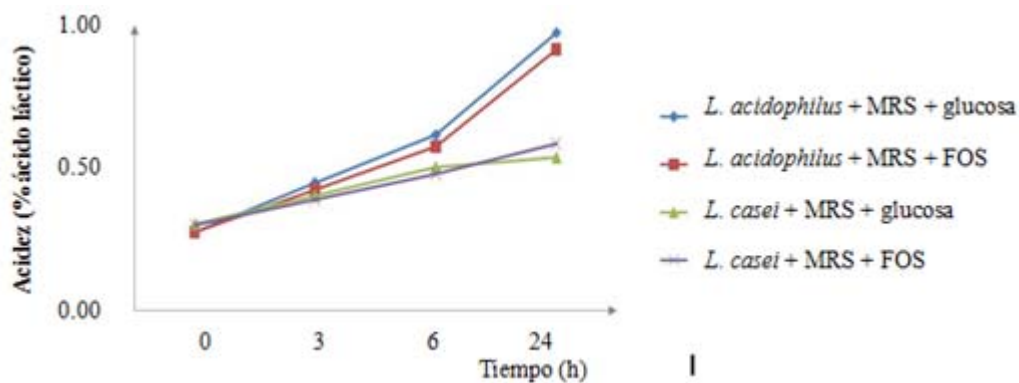


**Fig. 2. Cromatograma de las fracciones de los azúcares presentes en el caldo MRS con FOS después de 72 h de incubación. Medio MRS control (negro), *B. bifidum* (azul) *L. acidophilus* (verde), *L. casei* (naranja).**

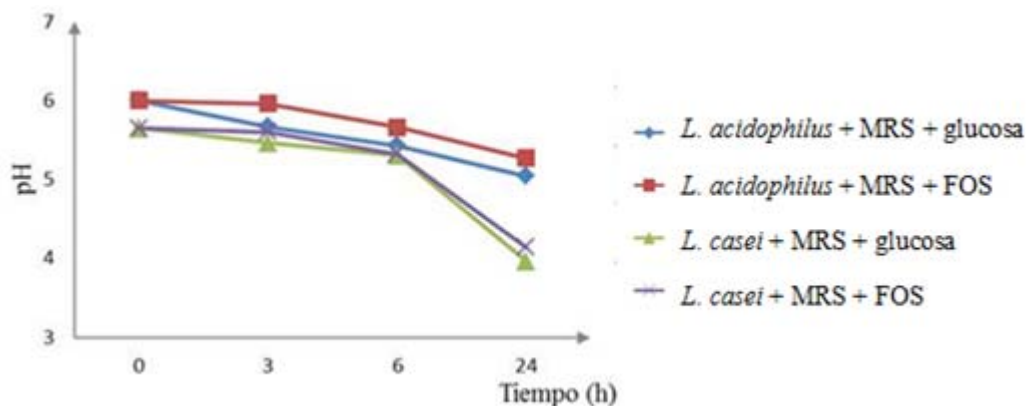
lácicas para ser consideradas probióticas. Por estas razones sirven como complemento para las otras pruebas que se le han realizado a estas bacterias del banco de cepas del IIIA que las avalan como probióticas.

Las Fig. 3 y 4 presentan los resultados del seguimiento de la acidez y el pH desarrollados por *L. casei* y *L. acidophilus* en los caldos con prebióticos y sin prebióticos (control con glucosa) durante las 24 h de incubación. No se pudo hacer la evaluación de la acidez y el pH de *B. bifidum* pues esta cepa presentó problemas en el proceso de reactivación y el banco de cepas del IIIA no pudo garantizar nuevos cultivos liofilizados. Se observa que para todas las variantes

hay un aumento de la acidez y una disminución del pH en el medio de cultivo en la medida en que se incrementa el tiempo de incubación. Este comportamiento está acorde al metabolismo fermentativo de las bacterias estudiadas. El análisis estadístico realizado arrojó que entre los valores de acidez y pH desarrollados por cada variante en los puntos de estudio (3, 6 y 24 h) no se encontraron diferencias significativas para  $p \leq 0,05$ . Sin embargo, es válido señalar que durante todo el proceso de incubación los mayores valores de acidez encontrados corresponden a la variante que contenía *L. acidophilus* en la mayoría de los puntos analizados. A las 24 h se alcanzaron valores de ácido láctico que fueron significativamente diferente entre los



**Fig. 3. Variación de la acidez con respecto al tiempo de incubación de los cultivos probióticos en los caldos de MRS con prebióticos (FOS) y con glucosa (control).**



**Fig. 4. Variación del pH con respecto al tiempo de incubación de los cultivos probióticos en los caldos de MRS con prebióticos (FOS) y con glucosa (control).**

microorganismos. Este resultado puede ser debido a que *L. casei* es un heterofermentativo y produce una menor cantidad de ácido láctico por mol de glucosa consumido que *L. acidophilus*.

Por otra parte, en el comportamiento del pH (Fig. 4) se puede observar que los menores valores correspondieron al medio fermentado por *L. casei*. Los valores de pH alcanzados a las 24 h por las leches fermentadas fueron significativamente diferentes entre los microorganismos. Este resultado puede ser debido a la cualidad proteolítica de *L. casei* y a los otros productos de su metabolismo (8) que pueden proveer un mayor número de iones H libres en el medio de cultivo.

Estos resultados indican que cuando se incorpora el sirope FOS en el medio de cultivo no ocurre una inhibición del crecimiento de las bacterias, el sirope prebiótico cubano no afecta el crecimiento de éstas probióticos por lo que pueden ser empleados para la elaboración

de productos simbióticos. Similar a este comportamiento fue el obtenido en un estudio anterior (9) cuando realizaron una comparación del crecimiento del cultivo de Bioyogur frente a diferentes niveles de sirope con FOS obtenido por el CIGB de Santi Spíritus.

## CONCLUSIONES

A las 72 h de fermentación se obtuvo cambio de pH y disminución de las concentraciones de los fructooligosacáridos en todas las variantes estudiadas. Los microorganismos estudiados son capaces de degradar los prebióticos presentes en el medio de cultivo. La incorporación del sirope prebiótico cubano en el medio de cultivo no inhibe el desarrollo de la fermentación de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*.

## REFERENCIAS

1. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Compendium of Food Additive Specifications. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1992.
2. Rodríguez O, Cortada A, Rodríguez JA, Santos B. Fructooligosacáridos y probióticos en leches fermentadas, una alternativa nutricional y saludable. *Cienc Tecnol Alim* 2012; 22(3): 53-9.
3. Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. Probiotic effects of inulin and oligofructose. *Brit J Nutr* 2002; 87(2):193-19.
4. Vernazza CL, Rabiú BA, Gibson GR. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: introduction to prebiotics. *Prebiotics: Development and Application* 2006. Cap.1:1-28. Disponible en: <http://doi.org/10.1002/9780470023150.ch1>.
5. NC-ISO-11869:2006. Yogur. Determinación de acidez titulable. Método potenciométrico; 2006.
6. NC-78-11-03:1983. Leche. Método de ensayo. Determinación del pH. Cuba; 1983.

7. Pérez ER, Trujillo LE, Arrieta JG, Pérez H, Brizuela MA, Trujillo G, Hernández L. A pH shift-based procedure to screen fructoligosaccharides fermenting yeast or bacterial strains. *Biotecnología Aplicada* 2010; 27:216-20.
8. Leveau JY, Bouix M. Los microorganismos de interés industrial. *Microbiología Industrial*. Zaragoza: Editorial Acribia; 2000. pp. 177-83.
9. Rodríguez O, Rodríguez JA, Pérez E, Santos B, Cortada A, Trujillo L, Padrón I, Núñez de Villavicencio M. Influencia de un sirope con prebióticos en el crecimiento de cultivos lácticos. *Cienc Tecnol Alim* 2012; 22(2):48-53.