

## **DISEÑO DE MEZCLA DE CEPAS PURAS PARA LA OBTENCIÓN DE LECHE DE CABRA DESLACTOSADA Y FERMENTADA CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS**

Carmen Llerena-Ramírez<sup>1\*</sup>, Raúl Díaz-Torres<sup>1</sup>, Aldo Hernández-Monzón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería Química. Universidad Estatal de Guayaquil, Ecuador.

<sup>2</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba.

E-mail: carmen.llerenar@ug.edu.ec

Recibido: 08-03-2019 / Revisado: 22-03-2019 / Aceptado: 08-04-2018 / Publicado: 29-04-2019

### **RESUMEN**

Este trabajo tuvo como objetivo diseñar una mezcla de cultivos con cepas puras para la obtención de leche de cabra deslactosada y fermentada con características probióticas. Para la preparación de las mezclas se emplearon: leche de cabra descremada pasteurizada a 85 °C por 30 min y deslactosada; las cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* y *Bifidobacterium bifidum* de la firma Chr Hansen. Se usó un diseño de superficie de respuesta con las restricciones siguientes: *L. acidophilus* y *L. paracasei* entre 10 a 60 % y *B. bifidum* entre 0 a 50 %. Las variables de respuesta fueron la viabilidad y aceptabilidad. La incubación se realizó a 40 ± 1 °C. Se obtuvo como mejor formulación la compuesta por 55 % *L. acidophilus*, 35 % de *L. paracasei* y 10 % *B. bifidum*, con aceptabilidad de me gusta y características probióticas.

**Palabras clave:** leche de cabra, mezcla de cultivos, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium bifidum*.

---

\***Carmen Llerena Ramírez:** Ingeniera en Alimentos (Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2010). Master en Ciencias de los Alimentos (Escuela Superior Politécnica del Ecuador). Master en Procesamiento de Alimentos (Universidad Agraria del Ecuador). Master en Docencia Superior (Universidad Agraria del Ecuador). Diplomado en Auditoría de Sistemas de Calidad (Universidad Técnica de Loja). Candidato a doctor en Ciencias en la Universidad de La Habana. Tiene 18 años de experiencia en la industria alimentaria en proceso de productos pesqueros. Su área de investigación está relacionada con procesamiento de productos pesqueros, técnicas de refrigeración, investigación de operaciones, seguridad industrial, procesos industriales, control de calidad, optimización de procesos, química de alimentos, microbiología y procesamiento de alimentos.

### **ABSTRACT**

**Design of mix starter culture to obtain lactose free and fermented goat milk with probiotics characteristics**

The objective of this work was to design a mixture of cultures with pure strains to obtain goat milk, which is lactose-free and fermented with probiotic characteristics. For the preparation of the mixtures: pasteurized goat milk pasteurized at 85 °C for 30 min and delaminated; the probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* and *Bifidobacterium bifidum* of the firm Chris Hansen. A response surface design was carried out with the following restrictions: *L. acidophilus* and *L. paracasei* between 10 to 60% and *B. bifidum* between 0 to 50%. The response variables were viability and acceptability. Incubation was carried out at 40 ± 1 °C. The best formulation was composed of 55% *L. acidophilus*, 35% de *L. paracasei* y 10% *B. bifidum*, with likable acceptability and probiotic characteristics.

**Keywords:** Goat milk, culture mix, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium bifidum*.

### **INTRODUCCIÓN**

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que ingeridos en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso para la salud del consumidor (1). Las características que debe cumplir un probiótico para ser suplementado a través de alimentos incluyen que la cepa debe ser preferentemente de origen humano, tener estabilidad ante ácidos y sales biliares para garantizar su supervivencia en el tracto gastrointestinal, ser

estable frente a enzimas proteolíticas, capaz de adherirse a las superficies epiteliales del intestino, colonizar el tracto gastrointestinal humano, producir componentes antimicrobianos, presentar antagonismo a bacterias patógenas, tener efecto benéfico en la salud clínicamente demostrado, permanecer vivo y estable durante el proceso y almacenamiento de los alimentos, cumplir con una seguridad demostrada en alimentos y en uso clínico, debe aportar propiedades organolépticas aceptables, o no modificar las del producto original (2).

Entre las cepas más utilizadas para la elaboración de alimentos se tienen: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium bifidum*. *L. acidophilus* es una bacteria típica del intestino, la caracteriza su resistencia a la acidez gástrica y sales biliares, su tasa de supervivencia en el tracto gastrointestinal se estima entre un 2 y 5 % y alcanza concentraciones suficientes en el colon de  $10^6$  a  $10^8$  ufc/mL, se ha reportado con temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 37 °C y como máxima, de 43 a 48 °C (3). Entre los beneficios que aporta esta bacteria a la salud se enumeran los siguientes: equilibrar la microbiota intestinal, efectos sobre el sistema inmunitario, reducción de la actividad enzimática pro cancerígenas, control de diarrea (4, 5).

*L. paracasei* es un lactobacilo heterofermentativo, fermenta hexosas como las contenidas en la lactosa y fructosa transformándolas en ácido láctico, también actúa sobre las pentosas para obtener como productos finales una mezcla de ácidos orgánicos entre ellos el ácido acético, metaboliza el citrato a compuestos tales como diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol, los cuales imparten aroma a los productos fermentados (4). Entre los beneficios que se reportan de este microorganismo se tienen los siguientes: previene la colonización por microorganismos patógenos mediante el mecanismo de boqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia de nutrientes, actividad antimicrobiana mediante la producción de sustancias como son peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácidos orgánicos (5).

*B. bifidum* son bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos, las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos, son anaerobios, algunas especies de bifidobacterias pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO<sub>2</sub>, se reporta como temperatura óptima para el crecimiento entre 35 a 39 °C, son

heterofermentativas. Constituye una de las especies predominantes del colon, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde  $10^8$  a  $10^{11}$  bacterias/g de material del colon (6).

Entre los beneficios a la salud informados se encuentra la disminución de la actividad de la β-glucoronidasa, pero no de las otras enzimas que se asocian con el cáncer de colon, efecto positivo sobre la función intestinal (5).

El género *Bifidum* durante su tránsito en el intestino produce ácidos orgánicos como el láctico y el acético, secreción de enzimas, bacteriocinas e incluso antibióticos. Estimula el sistema inmunológico y acumula metabolitos específicos que determinan su acción probiótica por su adhesión al epitelio intestinal, produce biopelículas las cuales tiene una función de defensa a las bacterias patógenas. Además, produce vitaminas como la B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub> y aminoácidos como alanina, valina, ácido aspártico, treonina.

Se ha reportado que el consumo de leche fermentada con *Bifidobacterium* ( $10^9$  ufc/g) tuvo efecto sobre la disminución del colesterol total en el suero sanguíneo, por la producción de hidroximetil glutaril – CoA reductasa, sustancia que se encuentra involucrada en la síntesis del colesterol (7).

En la actualidad se ha informado el diseño de mezclas de cepas de bacterias probióticas para la producción de leche hidrolizada con HA-Lactasa 5200 y fermentada, la mezcla estuvo compuesta por *Bifidobacterium breve* 66,66 %, *Lactobacillus acidophilus* 16,66 % y *Lactobacillus rhamnosus* 16,66 %, la misma presentó muy buenas características probióticas (8).

Este trabajo tuvo como objetivo diseñar una mezcla de cultivos con las cepas puras para la obtención de leche de cabra deslactosada y fermentada con características probióticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó leche de cabra del cruce Anglo-nubian con la criolla proveniente de la hacienda Young Living ubicada en Chongón – Guayaquil, Ecuador. La leche cruda de cabra cumplió con los indicadores establecidos por la norma ecuatoriana (9).

Para la hidrólisis de la lactosa se utilizó la enzima Safera Pure 6500 L de la marca Novozymes. Para la preparación de las mezclas de cultivos se emplearon las cepas puras *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei* spp. *paracasei* y *Bifidobacterium bifidum* ABY-3, de la marca CHR Hansen.

A la leche pasteurizada se le realizaron los controles microbiológicos siguientes: microorganismos aerobios mesófilos (10), coliformes (11), detección de *Listeria monocytogenes*/25 g (12), detección de *Salmonella*/25 g (13) y *Escherichia coli* (14).

Para el control de la hidrólisis de la lactosa se midió el punto de congelación con el crioscopio Funcce Gerber Cryostar I (15) y se calculó el grado de hidrólisis mediante las ecuaciones siguientes:

$$H (\%) = \frac{Y - 537}{2,74}$$

$$Y = H^\circ * 1000$$

$$H^\circ = \frac{-^\circ C}{f}$$

$$f = 0,9658$$

Donde: H (%) - grado de hidrólisis; H° - grado Horvet; f - factor de conversión.

El conteo de microorganismos probióticos se realizó en agar MRS para el género *Lactobacillus* y agar BL para *B. bifidum*. Las placas fueron incubadas en condiciones anaeróbicas a  $37 \pm 1$  °C durante 48 h (16).

Para la simulación de barrera gástrica *in vitro* se realizó la barrera de acidez a diferentes valores de pH (3 y 2) con una exposición de 2 h; el ajuste del pH se hizo con HCl 6 M y se realizaron dos repeticiones, en la primera prueba se construyeron los estándares de McFarland 9 y 10 con un equivalente entre  $10^8$  a  $10^9$  ufc/g. Para el análisis de la resistencia a las sales biliares la concentración de bilis utilizada fue de 3 % con una exposición de 2 h, posteriormente se hizo el conteo de los microorganismos (16).

Para la aceptabilidad de las formulaciones se utilizaron 30 personas conocedores del producto (17) con el uso de una escala hedónica que fue de uno a siete puntos (me disgusta extremadamente a me gusta extremadamente) para evaluar la intensidad de agrado (18).

Para obtener la matriz del diseño de mezcla se aplicó el programa Design Expert ver. 8.01 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN) con las restricciones de *L. acidophilus* y *L. paracasei* entre 10 a 60 % y *B. bifidum* entre 0 a 50 %, este diseño arrojó 14 experimentos. Como variables de respuesta se tomaron la viabilidad de los microorganismos probióticos y la aceptabilidad.

Para la preparación de los cultivos madre se emplearon las cepas puras probióticas de *L. acidophilus*, *L. paracasei* y *B. bifidum*, para la activación de cada cepa se empleó leche de cabra descremada y pasteurizada a 85 °C por 30 min, después de enfriada se inoculó con la cepa pura y se incubó a  $40 \pm 1$  °C, se mantuvo la fermentación hasta alcanzar pH óptimo entre 4,5 a 4,8 (acidez superior a 60 °D), seguidamente se refrescaron y se pasaron a refrigeración a temperatura de  $4 \pm 1$  °C para su posterior uso.

Cada unidad experimental fue de 2 L de leche de cabra descremada pasteurizada a 85 °C durante 30 min y deslactosada a 35 °C y concentración 0,06 g/L con un grado de hidrólisis mayor del 99 %. La leche fue inoculada con un 3 % de la mezcla del cultivo madre según el experimento correspondiente. La incubación se realizó a  $40 \pm 1$  °C y la fermentación se dio por terminada cuando se alcanzó la acidez de 60 °D de ácido láctico. El producto fermentado se sometió a refrescamiento para posteriormente ser refrigerado a  $4 \pm 1$  °C. Los análisis se realizaron después de las 24 h de la fermentación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 presenta los indicadores microbiológicos controlados a la leche pasteurizada para ser utilizada en la preparación de los cultivos, los mismos cumplieron con lo establecido en la norma ecuatoriana vigente (19).

La Tabla 2 refleja los resultados del diseño de las mezclas de cultivo. La aceptabilidad de la mayoría de las formulaciones fue calificada de me gusta con excepción de la formulación cinco que fue de ni me gusta ni me

**Tabla 1. Indicadores microbiológicos de leche estandarizada pasteurizada**

Indicador controlado	Valor medio
Recuento de microorganismos mesófilos (ufc/mL)	Menor a 1
Recuento de coliformes (ufc/mL)	Menor a 1
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> (ausencia/25 g)	Ausencia
Detección de <i>Salmonella</i> (ausencia/25 g)	Ausencia
Recuento de <i>E. coli</i> (ufc/mL)	Menor a 1

**Tabla 2. Resultados de la aceptabilidad y viabilidad de las formulaciones**

Formulación	<i>L. paracasei</i> (%)	<i>L. acidophilus</i> (%)	<i>B. bifidum</i> (%)	Aceptabilidad	Viabilidad [log (ufc/mL)]
1	60,0	25,0	15,0	5,1	10,3
2	25,0	25,0	50,0	4,7	9,7
3	36,6	36,6	26,6	4,9	10,3
4	10,0	60,0	30,0	5,0	11,2
5	60,0	40,0	0,0	4,5	11,0
6	40,0	10,0	50,0	5,3	9,5
7	36,6	36,6	26,7	4,7	9,9
8	60,0	10,0	30,0	4,9	10,1
9	40,0	60,0	0,0	4,8	11,9
10	60,0	10,0	30,0	5,3	9,9
11	10,0	40,0	50,0	5,2	10,1
12	40,0	60,0	0,00	5,0	11,6
13	10,0	60,0	30,0	5,0	11,1
14	25,0	60,0	15,0	4,8	11,2

disgusta. La aceptabilidad entre las 14 formulaciones no presentó diferencias significativas, por lo que no resultó una variable para la selección.

Todas las formulaciones presentaron viabilidad [log (ufc/mL)] por encima de nueve lo que se puede calificar de muy buenos valores.

Al procesar los resultados mediante diseño de superficie de respuesta se obtuvo un modelo lineal con un  $R^2$  de 0,79, donde resultaron significativas solo las variables lineales. Para la búsqueda de la mejor formulación se aplicó la solución numérica con las restricciones de viabilidad log (ufc/mL) entre 10 y 11,6.

Como resultado se seleccionaron tres soluciones equivalentes con la mayor viabilidad estimada por estar compuestas por los tres microorganismos probióticos. La Tabla 3 expone los resultados de las mezclas de cultivo propuestas que fueron preparadas y evaluadas.

La aceptabilidad de las tres mezclas resultó ser la misma que la obtenida en el diseño de experimentos (me gusta). Sin embargo, la viabilidad presentó diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), al aplicar el análisis de rangos múltiples de Duncan indicó diferencias significativas entre las tres mezclas. Teniendo en cuenta estos resultados fue considerada como la mejor mezcla la de mayor viabilidad, compuesta por 55 % de *L. acidophilus*, 35 % de *L. paracasei* y 10 % de *B. bifidum*.

Esta formulación presentó diferencias notables con la reportada (8), donde la mayor proporción de la mezcla estaba representada por *B. breve* (66,66 %) y los lactobacilos en minoría; debe destacarse que este trabajo se realizó con leche de cabra y las cepas probióticas empleadas no fueron las mismas.

Los microorganismos del cultivo de la mezcla seleccionada soportaron la barrera gástrica simulada de pH igual 3 y concentración de bilis 3 % manteniendo una alta supervivencia con una viabilidad cercana al mínimo terapéutico de  $10^7$  ufc/mL, lo que demuestra sus características probióticas.

La tabla 4 presenta los resultados de la prueba de barrera gástrica *in vitro* para la mezcla de cultivos seleccionada.

**Tabla 3. Resultados de la viabilidad y aceptabilidad de las mezclas de cultivo propuestas**

Mezcla de cultivos			Viabilidad [log (ufc/mL)]	Aceptabilidad (puntos)
<i>L. casei</i> (%)	<i>B. bifidum</i> (%)	<i>L. acidophilus</i> (%)		
35	10	55	9,10 (0,05)	4,3
10	30	60	8,63 (0,18)	4,0
25	15	60	7,90 (0,15)	4,1

(Desviación estándar)

**Tabla 4. Comportamiento de la viabilidad de la mezcla seleccionada sometida condiciones de la barrera gástrica *in vitro***

Condiciones para el conteo	Viabilidad [log (ufc/mL)]	Supervivencia de los microorganismos (%)
Inicial	9,1	-
Valor de pH = 2	5,8	54,6
Valor de pH = 3	6,9	66,7
Bilis (3 %)	7,9	77,7

## CONCLUSIONES

La mejor mezcla de cultivo para la fermentación de leche de cabra deslactosada fue la compuesta por 55 % de *L. acidophilus*, 35 % de *L. paracasei* y 10 % de *B. bifidum*, con una viabilidad log (ufc/mL) de 9,1; la misma soportó la barrera gástrica simulada a pH igual 3 y concentración de bilis 3 % manteniendo una alta supervivencia con una viabilidad cercana al mínimo terapéutico de  $10^7$  ufc/mL y una aceptabilidad de me gusta.

## REFERENCIAS

1. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada: Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization; 2002. pp. 4-8.
2. Senaka C, Evans C, Adams M, Baines S. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chem* 2012; 3: 1411-8.
- 3 Tamime A, Robinson R. *Yoghurt Science and technology*, Second edition. Boston, USA: CRC Press LLC; 2000. pp. 410-2.
- 4 Bourgeois C, Larpent J. *Microbiología Alimentaria*, Vol. 2. Zaragoza: Acribia; 2005.
5. Carminati D, Giraffa G, Quiberoni A, Binetti A, Suárez V, Reinheimer J. Advances and Trends in starter cultures for dairy fermentations. En: Mozzi F, Raya R, Vignolo G, *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, Vol. 1. Singapore: Wiley Black Well; 2010. pp. 177-88.
6. Collado M. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Disponible en: <http://www.u.upv.es>.
7. Ballongue J. Bifidobacteria and Probiotic Action. En: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, Ed. *Lactic acid bacteria Microbiological and Functional aspects*, Third edition, Vol. 1. New York: Marcel Dekker Inc; 2004. pp. 86 -130.
8. Sánchez-Jaurégui C, Hernández-Monzón A, Tejedor-Arias R. Evaluación de mezclas de cepas de bacterias lácticas probióticas para la producción de leches fermentadas. *Cienc Tecnol Alim* 2015; 25(2): 10-5.
9. NTE-INEN-2624. Leche cruda de cabra. Método de referencia. Ecuador; 2012.
10. NTE-INEN-1529-5. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismo aerobios mesófilos REP. Método de referencia. Ecuador; 2006.
11. NTE-INEN-1529-7. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias. Método de referencia. Ecuador; 1990.
12. ISO-11290-1. Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Método de referencia. Ecuador; 2008.
13. NTE-INEN-1529-15. Detección de Salmonella. Método de referencia. Ecuador; 2006.
14. NTE-INEN-1529-8. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes Fecales y E. coli. Método de referencia. Ecuador; 1990.
15. NTE-INEN-15. Determinación de punto de congelación en leche. Método de referencia. Ecuador; 1973.
16. Guimarães D, Brugnera D, Abreu L. Quantification of lactic acid bacteria and bifidobacteria in goat milk based yoghurts with added water-soluble soy extract. *Afr J Food Sci* 2013; 7(10): 392-8.
17. Witting de Penna. Una metodología actual para tecnología de alimentos. Santiago de Chile, Chile: Biblioteca digital de la Universidad de Chile; 2001. pp. 76-9.
18. Espinosa J. *Análisis Sensorial*. La Habana: Félix Varela; 2014.
19. NTE-INEN-2623. Leche pasteurizada de cabra. Método de referencia. Ecuador; 2012.