

## **EVALUACIÓN DE MEZCLA DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE FERMENTADAS**

Claudio E. Sánchez-Jáuregui<sup>1\*</sup>; Aldo Hernández-Monzón<sup>2</sup> y René Tejedor-Arias<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, UDALAB, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay. Av. 24 de Mayo 7-77 y Hernán Malo, Cuenca, Ecuador.

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

E-mail: csanchez@uazuay.edu.ec

### **RESUMEN**

El trabajo tuvo como objetivo determinar la mejor combinación de las mezclas de las cepas ATCC de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*, para su aplicación en la elaboración de leches fermentadas con características probióticas. Para la formulación de las mezclas se aplicó un diseño Simplex lattice. Las 10 mezclas resultantes, fueron aplicadas en un sustrato de leche previamente hidrolizado con HA-Lactasa 5200. Se realizó, un análisis sensorial para determinar el nivel de agrado en las diferentes mezclas y el estudio de la capacidad probiótica de las bacterias a través de la resistencia al ácido clorhídrico (pH 3; 2,5 y 2), tolerancia a las sales biliares (0,3 y 1,0 %) y la actividad antipatógena frente a *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), a través de halos de inhibición. La mejor combinación de mezclas de las cepas ATCC estudiadas fue la compuesta por *Bifidobacterium breve* (66,66 %), *Lactobacillus acidophilus* (16,66 %), *Lactobacillus rhamnosus* (16,66 %), la cual mostró buenas cualidades organolépticas, mejor desarrollo y uniformidad ante las condiciones adversas de simulación.

**Palabras clave:** mezcla, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, probiótico, fermentación, sensorial.

### **ABSTRACT**

#### **Evaluation of mixture of probiotic lactic acid bacteria strains for the production of fermented milks**

This study aimed to determine the best combination of mixtures ATCC strains *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium breve*, for use in the production of fermented milk with probiotic characteristics. For mix formulation a simplex lattice design was applied. The resultant 10 mixtures were applied on a substrate of previously hydrolyzed milk with HA Lactase 5200. It was conducted a sensory analysis to determine the level of pleasure in the different mixtures and the study of the ability of probiotic bacteria through strength hydrochloric acid (pH 3, 2,5 and 2), tolerance to bile salts (0,3 and 1,0 %) and antipathogenic activity against *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), through inhibition halos. The best combination of mixtures of the ATCC strains tested was composed by *Bifidobacterium breve* (66,66%), *Lactobacillus acidophilus* (16,66 %), *Lactobacillus rhamnosus* (16,66 %) which showed good organoleptic qualities, better development and uniformity to the adverse conditions simulation.

**Keywords:** mix, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, probiotic, fermentation, sensory.

### **INTRODUCCIÓN**

Los probióticos son microorganismos vivos que se encuentran en algunos productos alimentarios o suplementos, y cuyo consumo en cantidades suficientes puede ser beneficioso para la salud. Los probióticos contribuyen al mantenimiento de un equilibrio saludable de bacterias dentro del tracto gastrointestinal (1). Los tipos más comunes de bacterias probióticas son las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que a veces se combinan con *Streptococcus thermophilus* (2).

\***Claudio Sánchez Jáuregui:** Ingeniería en Alimentos (Universidad del Azuay Cuenca, Ecuador). Profesor Titular y Master en Administración de Empresas (Universidad del Azuay Cuenca, Ecuador). Docente a tiempo completo y Director de Proyectos de UDALAB en la Carrera de Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Azuay. Posee experiencia docente en pregrado y postgrado en el campo de ciencia y tecnología de la leche, tecnología de bebidas, biotecnología y biomolecular aplicado al ADN recombinante en bacterias lácticas, bioestadística, nutrición, gerencia de plantas y diseño de equipos.

Para considerar una especie de bacteria como probiótica, la misma debe reunir una serie de características, como son: no ser patógenas y no transmitir resistencia bacteriana, normalmente deben ser un habitante normal del intestino, lo cual le asegura resistencia a las condiciones del medio, como por ejemplo, tener capacidad de resistir los ácidos gástricos y la bilis, además, propiedad de adherirse al epitelio intestinal, lo que se asocia a su persistencia en el ambiente intestinal; cuando esto no es así, su consumo recurrente puede asegurar su permanencia por mantenerse en tránsito; lo ideal es que sean capaces de colonizar y establecerse en el tracto digestivo, capaces de crecer rápidamente y poder dominar por exclusión competitiva a otros microorganismos en el tracto intestinal. Por otra parte, deben producir sustancias con capacidad antimicrobiana, además, mantener viabilidad durante los cultivos, procesos, en el producto y durante su almacenamiento. Finalmente e importante, deben desarrollar efectos beneficiosos sobre el hospedero (3).

Es responsabilidad de la microflora intestinal, fundamentalmente las bifidobacterias y lactobacilos, la producción de ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles. Estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse (4). Por otra parte, se ha reportado que las bacterias beneficiosas como *Bifidobacterium* y algunos *Lactobacillus*, al crecer y fermentar en el intestino producen junto al chocolate negro compuestos antiinflamatorios para el corazón (5).

La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico, la cual beneficia al huésped mediante el aumento de la sobrevivencia e implantación de los microorganismos vivos de los suplementos dietéticos en el sistema gastrointestinal (6).

Normalmente en la industria se utilizan mezclas de bacterias lácticas que favorezcan la fermentación de la leche para la producción de yogur, con la gran diferencia que estos microorganismos no necesariamente tienen capacidad probiótica y por lo tanto no producen un beneficio a la salud del consumidor, además muchas de estas bacterias pueden morir durante el almacenamiento, si no hay un control adecuado en el proceso pos acidificación para extender la vida útil del producto final.

Las mezclas binarias y ternarias representan los mejores resultados de resistencia ante los patógenos, resistencia debido a las sustancias producidas en simbiosis y particularmente por la presencia del *L. acidophilus*, además por la taxonomía específica de cada cepa que interactúan en la leche fermentada (2).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la mejor combinación de las mezclas de las cepas ATCC de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*, para su aplicación en la elaboración de leches fermentadas con características probióticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La leche utilizada para el desarrollo de los experimentos del presente trabajo cumplió con las especificaciones técnicas de buena calidad. Para el desarrollo de los experimentos se aplicó un diseño Simplex - reticular (7) aumentado, las variables independientes tomadas fueron las tres cepas ATCC de bacterias lácticas: *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595) y *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700) (Tabla 1).

Las proporciones en las que participan los componentes de la mezcla deben satisfacer dos restricciones:

$$0 \leq x_i \leq 1, \text{ para cada componente } i;$$

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

La primera indica que las proporciones tienen que ser cantidades entre cero y uno, es decir cada componente debe estar sujeto a un límite inferior y superior, y la segunda condiciona a que las q proporciones sumen siempre la unidad o un valor fijo, lo cual causa que los niveles de los componentes  $x_i$  no sean independientes entre sí (7).

Las cepas fueron activadas en agar de Mann, Rogosa y Sharp (MRS) y mantenidas en agar nutriente (Merck, Darmstadt); posteriormente se suspendieron cada una de ellas por separado en una solución estéril de cloruro de sodio al 0,9 %, ajustando la concentración a través del estándar de MacFarland 5, que representó aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  ufc/g. Una vez obtenidas las concentraciones de cada bacteria, se procedió a sembrar

**Tabla 1. Diseño experimental de mezclas con las variables identificadas de las BAL**

Experimento No.	<i>Bifidobacterium breve</i> (%)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (%)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33,30	33,30	33,30
8	16,66	16,66	66,66
9	16,66	66,66	16,66
10	66,66	66,66	16,66

1 mL de cada una en 100 mL de leche con 9 % de sólidos totales, los lactobacilos se incubaron por 5 h a 37 °C y el *Bifidobacterium* a 40 °C, hasta alcanzar un pH entre 4 y 5.

Luego se realizó un conteo en placa en agar MRS para comprobar el número de bacterias de la cual se partía de cada cepa, estos se denominaron cultivos iniciadores.

Luego se preparó leche con 9 % de sólidos totales, hidrolizada con HA-lactasa 5200 marca Hansen (Hørshom), en una dosis de 2 mL/L a 50 °C por 2 h, con un residual de lactosa 2,86 %, y también se le adicionó inulina al 0,15 %.

Cumpliendo la condición de  $0 \leq x_i \leq 1$ , el límite superior fue 24 mL y el límite inferior fue 4 mL que se tomó de cada cultivo iniciador obtenido y cuyo recuento ya fue identificado; para cumplir la segunda condición

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

la mezcla de bacterias antes de la inoculación en la leche siempre tuvo que sumar 24 mL, dichas cantidades se han decidido así, debido a que el porcentaje de fermento para una inoculación, no es una imposición y depende de la experimentación con dichos cultivos.

La cantidad de fermento líquido se inoculó en 300 mL de leche hidrolizada; la variable respuesta en todos los casos fue el recuento de unidad formadora de colonias en placa.

Las leches fermentadas se colocaron en una incubadora (marca Memmert) a  $38,5 \pm 1$  °C el tiempo fue determinado por el alcance de la acidez de 60 °D detectado en forma automática. Luego del proceso de fermentación se tomó una muestra de cada experimento y se realizó un conteo en placa (REP).

Para la evaluación sensorial se utilizó una prueba de satisfacción aplicando una escala hedónica de 4 a 1 (4 el mayor grado y 1 el más bajo), los atributos sensoriales evaluados fueron los siguientes: aspecto, olor, sabor y consistencia. El grupo evaluador estuvo formado por 30 jueces semientrenados.

De los experimentos seleccionados, se obtuvo una curva de crecimiento bacteriano mediante el recuento de microorganismos presentes cada 0,5 h durante la fermentación y posfermentación.

A la leche fermentada de las mezclas seleccionadas, se le analizaron los requisitos microbiológicos y las pruebas de capacidad probiótica: tolerancia a la barrera de pH (3; 2,5 y 2,0), resistencia a las sales biliares (0,3 y 1 %) y la actividad antipatógena frente a *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) (8).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 2 presenta los resultados de la viabilidad de las cepas puras y de las mezclas binarias y ternarias. Como puede apreciarse los cultivos puros fueron los que presentaron una excelente viabilidad; sin embargo, todas las mezclas presentaron viabilidad mucho más baja que los cultivos puros, este comportamiento puede estar dado por los diferentes metabolitos que producen cada uno de ellos que no dan un efecto sinérgico. Las mezclas que desarrollaron viabilidad por encima del mínimo terapéutico (107 ufc/g) fueron la binaria formada por lactobacilos (experimento 6) y las mezclas con las tres cepas de los experimentos 7, 8 y 10.

Los resultados de la evaluación sensorial (Tabla 3) permiten apreciar que los cultivos puros fueron los que presentaron una evaluación de no aceptable. Sin embargo, todas las mezclas recibieron calificación de aceptación. Se destacaron con la máxima calificación la mezcla binaria sin la presencia del *L. acidophilus* (experimento 5) y la mezcla ternaria con el mayor nivel de *B. breve* (experimento 10), donde se logró un balance en todos los atributos, mejorándose el atributo olor con respecto a todas las mezclas.

Al tener en cuenta los resultados de la evaluación sensorial y los de viabilidad se decidió seleccionar los experimentos 5 y 10 para la construcción de la curva de

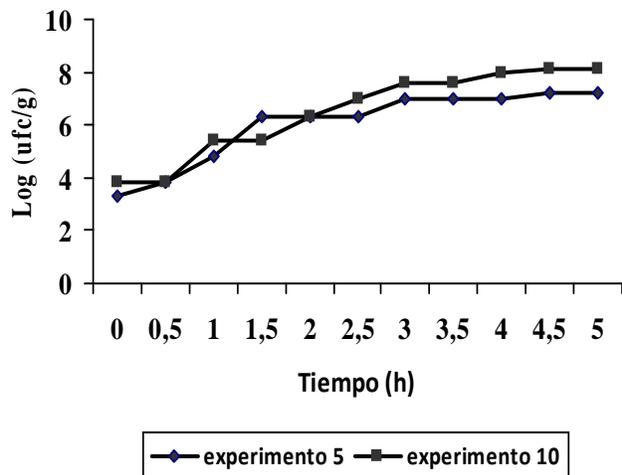
**Tabla 2. Recuento en placa de las bacterias lácticas**

Experimento No.	<i>Bifidobacterium breve</i> (mL)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (mL)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (mL)	Viabilidad (log ufc/g)
	24	0	0	9,8
2	0	24	0	8,3
3	0	0	24	8,5
4	12	12	0	7,0
5	12	0	12	7,0
6	0	12	12	7,6
7	8	8	8	7,5
8	4	4	16	7,3
9	4	16	4	7,0
10	16	4	4	7,3

**Tabla 3. Resultados de la prueba de evaluación sensorial**

Experimento No.	Aspecto	Puntuación de los atributos sensoriales			
		Olor	Sabor	Consistencia	Aceptación
1	3	2	2	2	2
2	3	2	2	2	2
3	2	2	2	2	2
4	3	3	3	2	3
5	4	3	4	4	4
6	3	3	3	3	3
7	3	3	3	3	3
8	3	3	3	3	3
9	3	3	3	3	3
10	4	4	4	4	4

crecimiento bacteriano (Fig. 1). En la misma puede apreciarse que durante las dos primeras horas de fermentación ambas mezclas presentaron el mismo comportamiento, sin embargo ya a las 2,5 h la mezcla del experimento 10 alcanzó una viabilidad con valor logarítmico de 7 y mantuvo su crecimiento hasta las 4 h con valores de 8,1. La mezcla del experimento 5 mantuvo su viabilidad desde las 3 hasta las 5 h con el valor logarítmico de 7.



**Fig. 1. Curvas de crecimiento de las bacterias lácticas de los experimentos seleccionados.**

Estos resultados muestran claramente que la mezcla del experimento 10 presentó las mejores cualidades desde el punto de vista industrial para ser utilizada en la elaboración de leches fermentadas superando la cantidad de bacterias que exige la norma INEN (8). Las leches fermentadas fueron analizadas y las mismas cumplieron con los requisitos establecidos por la norma INEN (8).

Las Tablas 4 a 6 presentan los resultados de capacidad probiótica de las mezclas analizadas, los tres primeros experimentos pertenecen a las cepas puras de las BAL y los experimentos 5 y 10 son las mezclas seleccionadas de acuerdo a las características organolépticas de las mismas.

Como se observa en la Tabla 4, a pH 3 las bacterias se mantienen viables por encima de valores logarítmicos de siete, pero a pH 2,5 *Lactobacillus rhamnosus* no logra sobrevivir y las otras cepas puras no alcanzan el mínimo terapéutico, sin embargo las mezclas si logran sobrevivir a este pH y mantener la viabilidad requerida.

A pH 2 no se encontraron bacterias viables para ninguno de los casos estudiados. Este resultado muestra como las mezclas presentaron mejor comportamiento que los cultivos puros a la resistencia ante este proceso in vitro de simulación a los ácidos gástricos.

La Tabla 5 muestra la viabilidad de las BAL ante la concentración de sales biliares, ya que estas bacterias deben poder resistir la presencia de bilis durante su paso por el tracto digestivo, esta prueba mostró que a una concentración de 1 % no se mantienen viables las cepas puras, aunque a esta misma concentración las mezclas de los experimentos seleccionados tuvieron una sobrevivencia de 4 a 6 log aproximadamente inferior al mínimo terapéutico. A una concentración de 0,3 % de sales biliares los microorganismos resistieron adecuadamente en un orden cercano a los 7 log, demostrando su condición y manteniéndose como probióticas.

**Tabla 4. Viabilidad de las BAL ((log (ufc/g)) a diferentes pH**

Experimento No.	Valor de pH		
	3,0	2,5	2,0
X <sub>1</sub>	7,5	6	0
X <sub>2</sub>	7,3	6,5	0
X <sub>3</sub>	7,3	0	0
5	7,6	7,3	0
10	7,3	7	0

**Tabla 5. Viabilidad de las BAL ((log) (ufc/g)) a diferentes concentraciones de sales biliares**

Experimento No.	Sales biliares (%)	
	0,3	1,0
x1	6,9	0
x2	6,6	0
x3	7,0	0
5	6,7	4,3
10	6,9	5,6

De la prueba de actividad antipatógena de las BAL (Tabla 6), se observa como las diferentes cepas puras y las mezclas seleccionadas presentaron buena propiedad de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas utilizadas para este estudio.

**Tabla 6. Diámetro de halos de inhibición de las BAL sobre las bacterias patógenas**

Experimento No.	Halos de inhibición (mm)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>
1	8	10	15
2	10	11	13
3	11	10	14
5	10	14	16
10	14	11	18

Los halos presentaron diámetros mayores a 12 mm mostrando así la sensibilidad que tienen las bacterias patógenas frente a estos cultivos, la mayor inhibición se observó para el *Staphylococcus aureus*, debido probablemente a la formación de bacteriocinas por las BAL

y que son efectivas contra bacterias Gram positivas. Con estos resultados se concluye que de las mezclas diseñadas, la que mejor comportamiento presentó para su utilización en la elaboración de leches fermentadas fue la compuesta por *Bifidobacterium breve* (66,66 %), *Lactobacillus acidophilus* (16,66 %) y *Lactobacillus rhamnosus* (16,66 %).

### CONCLUSIONES

Para su aplicación en la elaboración de leches fermentadas con características probióticas la mejor combinación de las mezclas de las cepas ATCC estudiadas fue la compuesta por *Bifidobacterium breve* (66,66 %), *Lactobacillus acidophilus* (16,66 %) y *Lactobacillus rhamnosus* (16,66 %) la cual mostró buenas cualidades organolépticas, mejor desarrollo y uniformidad ante las condiciones adversas de simulación.

### REFERENCIAS

1. Betsi, G.I.; Papadavid, E. y Falagas, M.E. Am. J. Clin. Dermat. 19: 93-103, 2008.
2. Howlett, J. Functional Foods - From Science to Health and Claims. ILSI Europe. Brussels, 2008, pp. 21-23.
3. Naidu, A.S.; Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 39: 13-126, 1999.
4. Cagigas, A. y Blanco, J. Rev. Cub. Aliment. Nutr. 16 (1): 63-8, 2002.
5. ACS. *The precise reason for the health benefits of dark chocolate: mystery solved*. 2014. <http://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/newsreleases/2014/march/the-precise-reason-for-the-health-benefits-of-dark-chocolate-mystery-solved.html>
6. ILSI. British J. Nutr. 81: S1-S27, 1999.
7. Gutiérrez, H y De la Vara, R. *Análisis y Diseño de Experimentos*. México D.F. Editorial McGraw-Hill, 2012, pp.115-141.
8. Norma Técnica Ecuatoriana NTE 2395:2011. Leches Fermentadas. Instituto Ecuatoriano de Normalización. INEN, Quito, 2011.