

EVALUACIÓN DE UNA FERMENTACIÓN LÁCTICA EN PRESENCIA DE UN SIROPE PREBIÓTICO

*Oxalis Rodríguez*¹, José A. Rodríguez², Enrique R. Pérez³, Beatriz Santos⁴, Arelys Cortada¹, Luis E. Trujillo⁵, Ismaray Padrón¹ y Margarita Núñez de Villavicencio¹*

¹Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Carretera al Guatao, km 3 1/2, La Habana, C.P. 19 200, Cuba.

²Dirección Nacional Logística del MININT, La Habana, Cuba.

³Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spiritus, Cuba.

⁴Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba.

⁵Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.

E-mail: oxalis@iia.edu.cu

RESUMEN

Se evaluó la cinética de la fermentación láctica desarrollada por el cultivo prebiótico Bioyogur cuando se incorpora un sirope con fructooligosacáridos a la leche antes de la inoculación. Se adicionaron proporciones de sirope de 0, 3 y 4 % y en ambos casos se inoculó con 2 % de cultivo Bioyogur (*L. acidophilus* + *S. thermophilus*). Se determinaron los valores de acidez y pH, tomándose muestras de la leche recién inoculada y cada 0,5 h hasta la coagulación. Se determinó el contenido de azúcares a las 0 y 3 h de fermentación y la viabilidad celular de *L. acidophilus* a las 24 h. La capacidad de acidificación fue favorable para todas las variantes. La incorporación del sirope con fructooligosacáridos a la leche no inhibió el crecimiento de los cultivos lácticos. No fue consumida la fracción del sirope que corresponde a los fructooligosacáridos. La viabilidad celular de *L. acidophilus* alcanzó conteos en el orden de 10¹⁰ ufc/mL en todos los casos.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, probióticos, prebióticos, fructooligosacáridos.

ABSTRACT

Evaluation of a lactic fermentation with prebiotic syrup

The kinetic of the lactic fermentation developed by the Bioyogur starters when syrup rich in fructooligosaccharides (FOS) was incorporated to the milk before the inoculation was evaluated. Syrup was used at 0, 3 and 4% and Bioyogur starters (*L. acidophilus* + *S. thermophilus*) was inoculated at 2% v/v. Lactic acid formation and pH values were determined for samples collected at the recently inoculated milk and every 0.5 h to the coagulation. The sugar contents at 0 and 3 h and cellular viability of *L. acidophilus* at 24 h were determined. Growth capacity of starters was not affected in any of the used syrup proportions. The acidification capacity was favorable for all variant. The syrup for growth meanwhile the FOS fraction was intact. In all case the viability of *L. acidophilus* reached counts in order of 10¹⁰ ufc/mL.

Key words: acid lactic bacteria, probiotic, prebiotic, fructooligosaccharides.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales han ganado gran importancia en la industria alimentaria pues estos proporcionan beneficios a la salud además de sus bondades nutricionales (1). Dentro de ellos han adquirido un papel relevante las leches fermentadas con probióticos y prebióticos, por los importantes efectos que tienen en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades (2).

**Oxalis Rodríguez Martínez: Licenciada en Microbiología (UH, 2002). Investigador Agregado. Máster en Ciencias Microbiológicas (UH, 2007). Labora actualmente en la calidad microbiológica de productos lácteos y sus derivados y el desarrollo de productos con probióticos y prebióticos.*

Los fructooligosacáridos (FOS) son los prebióticos que presentan mayor interés comercial pues son los componentes alimentarios que parecen ejercer el mejor efecto prebiótico (2). Sus cualidades vienen dadas por constituir el sustrato más conveniente para las bacterias beneficiosas del tracto gastrointestinal, contribuyendo a que el desarrollo de las mismas sea más rápido que el de algunos enteropatógenos (3). De hecho, fueron los primeros oligosacáridos no digeribles en los que se verificaron propiedades funcionales (4).

Las leches fermentadas son obtenidas a partir de la fermentación de bacterias lácticas entre las que se pueden encontrar probióticas. Las bacterias ácido lácticas son capaces de crecer en medios sencillos a partir de azúcares (hexosas y pentosas) produciendo ácido láctico con rendimientos superiores a 85 % en especies homolácticas (5).

En Cuba se obtiene un sirope con FOS denominado comercialmente ALIDUX que tiene probadas propiedades prebióticas (6). En la elaboración de cualquier producto fermentado probiótico con la adición de este sirope, sería un inconveniente que durante la fermentación y la conservación sea consumida la fracción del sirope con cualidades prebióticas por los cultivos probióticos presentes en el producto. Por ello resulta importante verificar la exposición de la fracción prebiótica al cultivo probiótico para así conocer si esta puede llegar intacta al tracto gastrointestinal y ejercer su función en los microorganismos presentes en ese nicho.

El cocultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*, conocido también en Cuba como cultivo Bioyogur, es el que se utiliza para la elaboración de la mayoría de las leches fermentadas probióticas que se comercializan en el territorio nacional. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de la fermentación desarrollada por el cultivo Bioyogur cuando se incorpora un sirope con fructooligosacáridos a la leche antes de la inoculación.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la leche de vaca encontramos alrededor de 4,7 % de azúcar (lactosa) algunos autores plantean que si se incorpora a esta otro tipo de azúcar en el proceso de

elaboración de leches fermentadas, puede ocurrir la inhibición del crecimiento de la bacteria ácido láctica que se emplee como inóculo (7).

Sobre la base de los resultados obtenidos en trabajos anteriores (8) resultó necesario evaluar el crecimiento del cultivo de Bioyogur con 3 % del sirope ALIDUX (sirope FOS-G). Se utilizó como referencia una variante con 4 % de sirope FOS-G, pues este valor se corresponde con 2 % de FOS recomendado por algunos autores para el consumo humano (9).

Diseño del experimento

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, donde las variables independientes seleccionadas fueron los porcentajes de sirope FOS-G (0, 3 y 4 %) y el tiempo de fermentación. Se realizaron cinco corridas experimentales de 5 kg cada una. Como variables respuesta en los diseños mencionados se seleccionó: acidez, pH y viabilidad. También se determinó de forma cualitativa el consumo de azúcares. Las variables de control seleccionadas fueron: la temperatura (45 °C) y los sólidos totales.

Para la preparación de la leche pasteurizada con sirope FOS-G, se disolvieron en la cantidad adecuada de agua la leche descremada en polvo (LDP) y la leche entera en polvo (LEP) con el propósito de lograr una leche recombinada de 2,5 % de grasa y 8,5 % de sólidos no grasos, cumpliendo con la composición normada para leches fermentadas cubanas (10). Se elaboraron tres variantes: una sin sirope (utilizada como control), y otras dos con 3 y 4 % de sirope FOS-G. Se utilizó un agitador a baja velocidad para lograr una rápida disolución. Posteriormente se pasteurizó a 90 °C durante 5 min y se refrescó hasta la temperatura de inoculación (45 °C).

Las diferentes variantes de leches pasteurizadas con sirope FOS-G se inocularon con 2 % de cultivo Bioyogur y se distribuyeron en tubos de 15 mL. La temperatura de incubación fue de 45 °C y se realizó la determinación de acidez y pH (11, 12), tomando muestras cada 30 min hasta la coagulación. Se contruyeron las curvas de pH y acidez en función del tiempo de fermentación. Para la determinación de la viabilidad celular (13) se tomaron muestras a las 24 h de fermentación.

Los métodos estadísticos utilizados para detectar las diferencias entre los valores de pH, acidez y viabilidad, fueron el análisis de varianza de clasificación simple y prueba de rangos múltiples de Duncan.

Posteriormente se analizó de forma cualitativa por cromatografía de capa fina (CCF) el consumo de azúcares en las muestras con sirope de FOS-G en el momento de la inoculación (tiempo=0 h) y después de coagulada la leche. Las determinaciones realizadas por CCF se efectuaron tomando muestras de las cinco corridas y se puntuaron en placas de gel de sílice. Se utilizó como marcador el sirope FOS-G para indicar los puntos correspondientes a cada azúcar en los cromatogramas. La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetona-agua (9:1, v/v). Los azúcares con fructosa en su estructura se detectaron asperjando la placa con una solución de urea 3 % (m/v), ácido fosfórico 1 mol/L en butanol saturado con agua y calentada a 80 °C por 20 min para el desarrollo del color.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 1 y 2 muestran la capacidad de producción de ácido láctico y la disminución del pH del cultivo Bioyogur en leche suplementada con sirope FOS-G, respectivamente. Se puede observar que las variantes con 3 y 4 % de Sirope FOS-G desarrollaron durante toda la fermentación valores de acidez y pH similares a los de la variante sin sirope FOS-G. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas para $p \leq 0,05$ entre los valores obtenidos para las tres variantes en ninguno de los tiempos de fermentación que se analizaron. Este hecho se explica debido a que las bacterias utilizadas tienen activo el sistema enzimático para la degradación de la lactosa y por otra parte presentan constitutivamente el sistema enzimático para la degradación de la glucosa.

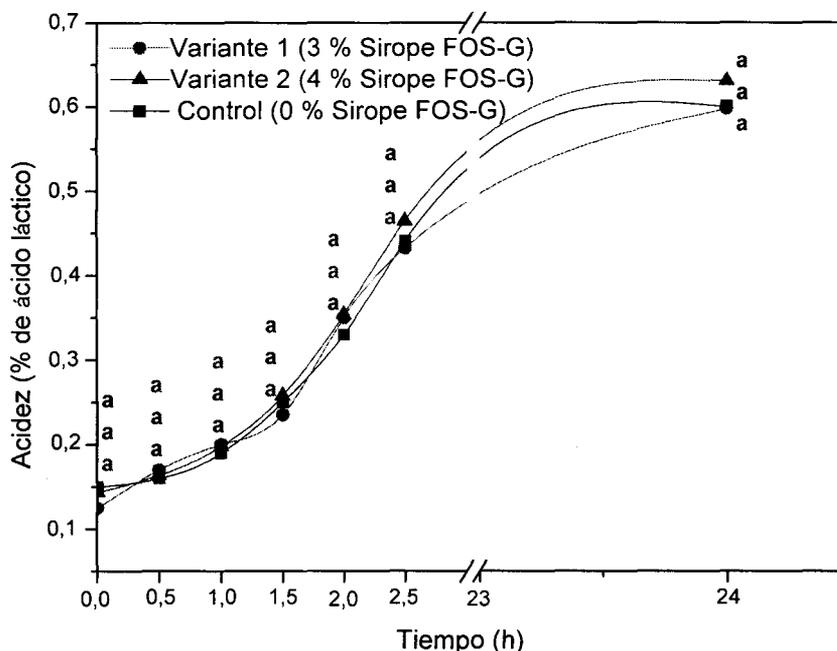


Fig. 1. Variación de la acidez con relación al tiempo de la leche suplementada con diferentes porcentajes de sirope FOS-G.

Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

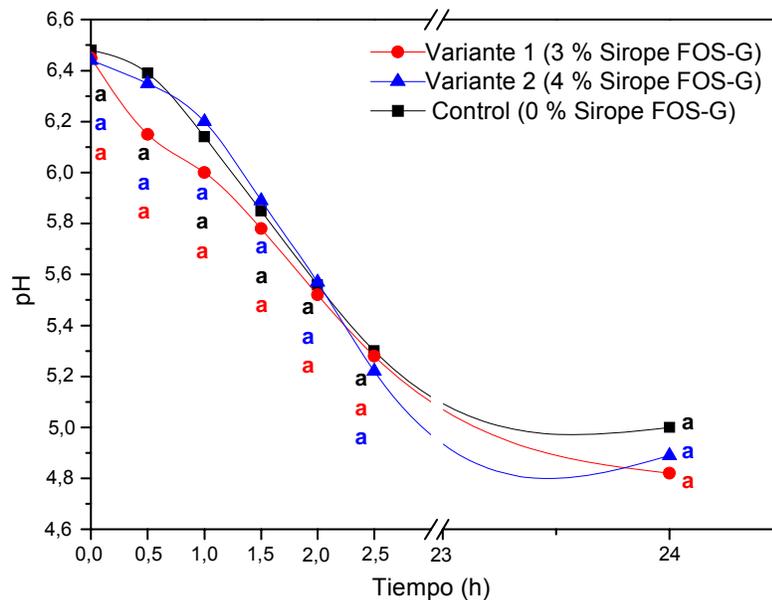


Fig. 2. Variación del pH con relación al tiempo de la leche suplementada con diferentes porcentajes de sirope FOS-G.

Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

En todas las variantes a medida que transcurría el tiempo aumentaba la acidez y disminuía el pH del medio. Al ocurrir la coagulación, aproximadamente a las 2,5 h de fermentación, se alcanzaron valores de acidez en el rango de 0,43 a 0,46 % de ácido láctico y valores de pH entre 5,30 y 5,22. Con el transcurso de la fermentación láctica, ya a las 24 h se alcanzaron valores de acidez en el rango de 0,60 a 0,63 % de ácido láctico y el pH alcanzó un valor promedio entre 4,82 y 5,00. Los resultados obtenidos se corresponden con los reportados por otros investigadores (14) cuando estudiaron el comportamiento de la acidez y el pH desarrollado por el cultivo Bioyogur para la elaboración de leches fermentadas dietéticas.

La adición del sirope FOS-G en las dos variantes estudiadas no tienen un efecto marcado sobre el pH y la acidez de la leche con respecto a la variante sin sirope FOS-G. Este hecho se explica debido a que las bacterias utilizadas tienen activo el sistema enzimático para la degradación de la lactosa y por otra parte presentan constitutivamente el sistema enzimático para la degradación de la glucosa.

Este resultado es indicativo de que los microorganismos utilizados en el estudio son capaces de realizar la fermentación de igual forma en la leche con sirope FOS-G que en la leche sin sirope (control), ya que en ambos casos se evidencia la producción del ácido láctico en igual medida aunque desde el punto de vista molecular pudiera considerarse que en el caso de la leche con sirope FOS-G este comportamiento es debido a que el operón lactosa pudiera estar reprimido por la presencia de glucosa en el medio.

Viabilidad celular de *L. acidophilus* contenido en Bioyogur después de 24 h de fermentación en leche con diferentes porcentajes de sirope FOS-G

La Tabla 1 muestra los conteos celulares de *L. acidophilus* presente en el cultivo de Bioyogur obtenida después de las 24 h de fermentación de la leche con diferentes porcentajes de Sirope FOS-G. En todos los casos la viabilidad se mantuvo por encima de 10^{10} ufc/mL. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas para $p \leq 0,05$ entre las variantes de 4 y 3 % de sirope FOS-G, no siendo así con respecto al control.

Tabla 1. Viabilidad de *L. acidophilus* en el cultivo de Bioyogur después de transcurridas las 24 h de fermentación en leche con diferentes porcentajes de sirope FOS-G

Variantes	Viabilidad de <i>L. acidophilus</i> (ufc/mL)
Variante 1 (Sirope FOS-G, 3 %)	6,2 x 10 ¹⁰ a
Variante 2 (Sirope FOS-G, 4 %)	6,8 x 10 ¹⁰ a
Control (Sirope FOS-G, 0 %)	3,5 x 10 ¹⁰ b

Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$

Los valores de viabilidad obtenidos indican que hay una estimulación de la producción de células cuando hay presencia de Sirope FOS-G en el medio. Este resultado pudiera estar dado por la disponibilidad de glucosa en el sirope FOS-G que permite su entrada directa a la célula y consumo para la obtención de energía metabólica. Esto no ocurre así en la leche sin sirope ya que debe ocurrir primero la degradación de la lactosa para dejar libre la glucosa y después es que la bacteria realiza la fermentación a partir de este monosacárido. Resultados similares fueron obtenidos por otros investigadores (14) cuando compararon la viabilidad celular de *Bifidobacterium bifidus* en dos leches fermentadas: una que se le adicionó inulina antes de la fermentación y una sin inulina. A las 24 h de fermentación obtuvieron mayor conteo de *B. bifidus* en la leche fermentada con inulina. Los resultados obtenidos sugieren que 3 % de sirope FOS-G continúa siendo el más recomendable a utilizar para el desarrollo de una leche fermentada simbiótica, ya que las variaciones tanto de acidificación de la leche como de la viabilidad celular del probiótico no son significativamente diferentes con respecto a cuando se emplea 4 % de sirope FOS-G. Se decidió continuar el estudio de consumo de azúcares con la variante de 3 % que es la más económica y se encuentra también propuesta en la literatura consultada (9). La Fig. 3 muestra una imagen de la CCF donde se separan los principales componentes del sirope FOS-G presentes en la leche en el momento de inoculación y después de la coagulación. Por la intensidad de las manchas no hay consumo apreciable de los componentes del sirope durante la fermentación. Este resultado cualitativo coincide con los encontrados durante el curso temporal de consumo de azúcares en caldo MRS (8). En ese estudio también se observa que en las primeras 3 h de fermentación no existen diferencias significativas en las concentraciones de los azúcares presentes en el caldo MRS.

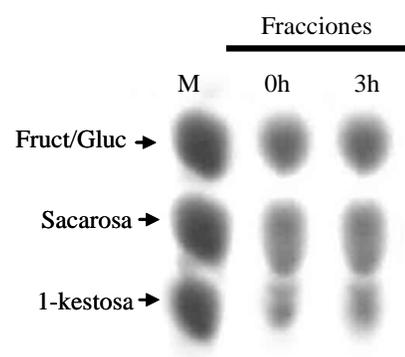


Fig. 3. Separación por cromatografía de capa fina de los azúcares presentes en la leche con 3 % de sirope FOS-G: antes (0 h) y después de la coagulación (3 h).

M es un marcador que indica la migración de los diferentes azúcares.

Es importante destacar que la fracción de FOS-G no se consume, al menos apreciablemente, durante la fermentación hasta la coagulación. Esto sugiere que la fracción prebiótica puede llegar al tracto gastrointestinal de forma intacta para ejercer su acción beneficiosa en el organismo del consumidor.

CONCLUSIONES

Con el desarrollo de la acidez y el pH se pudo comprobar que la capacidad de acidificación fue favorable para todas las variantes. La incorporación del sirope con fructooligosacáridos a la leche no inhibió el crecimiento de los cultivos lácticos lográndose conteos celulares de *L. acidophilus* hasta el orden de 10¹⁰ ufc/mL en todos los casos. Mediante la determinación cualitativa del consumo de los azúcares se comprobó que no fue consumida la fracción del sirope que corresponde a los fructooligosacáridos.

REFERENCIAS

1. Cagigas, A. y Blanco, J. Rev. Cub. Alim. Nutr. 16(1): 63-68, 2007.
2. Tojo, R. y Leis, R. Bol. Ped. 43: 376-395, 2003.
3. Banguela, A. y Hernández, L. Biotec. Apl. 23: 202-210, 2006.
4. Hirayama, M. Pure App. Chem. 74(7): 1271-1279, 2002.
5. Tortora, G.J.; Funke, B.R. y Case, C.L. Microbiology: An Introduction. Industrial Microbiology. Pearson-Benjamin Cummings Publishing, London, 2001, 530 p.
6. Pérez, E. R.; Trujillo, L. E.; Arrieta, J.G.; Brizuela, M.A.; Trujillo, G. y Hernández, L. Biotecnología Aplicada. 27: 216-220, 2010.
7. Leveau, J. Y. y Bouix, M. Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia, Zaragoza, 2000, pp. 167-323.
8. Rodríguez, O.; Rodríguez, J. A.; Pérez, E. R.; Santos, B.; Cortada, A.; Trujillo, L. E.; Padrón, I. y Núñez, M. Cienc. Tecnol. Alim. 22 (2): 48-53, 2012.
9. Pérez, E. Obtención de un biocatalizador para la producción industrial de FOS a partir de la sacarosa, utilizando una frutossiltransferasa vegetal expresada en *Pichia pastoris*, (tesis de Maestría, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara) 2010.
10. NC: TS457: 2006. *Leches fermentadas. Especificaciones*, Cuba.
11. NC-78-11-03:1983. *Leche. Método de ensayo. Determinación del pH*, Cuba.
12. NC-ISO-11869:2006. *Yogur. Determinación de acidez. Método potenciométrico*, Cuba.
13. NC 76-04-7. *Productos alimenticios y bebidas. Métodos de ensayos microbiológicos. Determinación del número de bacterias viables formadoras de ácido*, 1976.
14. Perea, J. y Brito, A. I. Cienc. Tecnol. Alim. 18 (1): 20-24, 2008.