

INFLUENCIA DE UN SIROPE CON PREBIÓTICOS EN EL CRECIMIENTO DE CULTIVOS LÁCTICOS

*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 Spíritus, 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 el comportamiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* cuando se incorpora un sirope con fructooligosacáridos al medio de fermentación como única fuente de carbono. Se adicionó el sirope en proporciones de 2, 3 y 6 % al medio Caldo Man, Rogosa and Sharpe y se inoculó a 2 % con monocultivo de *L. acidophilus* en unos casos y en otros con cocultivo de *L. acidophilus* y *S. thermophilus*. Se tomaron muestras cada 8 h durante las 24 h de fermentación y se determinó acidez, pH y contenido de azúcares. Con la adición del sirope con fructooligosacáridos al medio de fermentación no se inhibió el crecimiento de los cultivos lácticos empleados. La capacidad de acidificación fue favorable para ambos cultivos, observándose un mejor comportamiento con el cocultivo. Durante las 24 h de fermentación, ambos cultivos consumieron preferentemente mono y disacáridos quedando intacta la fracción del sirope que corresponde a los fructooligosacáridos.

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

ABSTRACT

Influence of syrup with prebiotic on the growth of lactic culture

The growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* when syrup rich in fructooligosaccharides (FOS) was incorporated to the fermentation medium as unique carbon source was evaluated. Syrup was added at 2, 3 and 6% to the Man, Rogosa and Sharpe medium broth and inoculated later with 2% v/v of a *L. acidophilus* monoculture or with a co-culture including *L. acidophilus* and *S. thermophilus*. Lactic acid formation, pH values and sugar contents were determined for samples collected at 8 and 24 h. Growth capacity of mono or co-culture was not affected in any of the used syrup proportions. The growth rate, expressed as the acidification capacity, evaluated at the different times, was favorable for both cultures; however, co-culture displayed a better behavior than monoculture. After 24 h fermentation, both cultures consumed preferentially mono and disaccharides components of the syrup for growth meanwhile the FOS fraction was intact.

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

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

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se busca que el alimento proporcione componentes funcionales al organismo por encima de su valor nutricional original (1). Dentro de los alimentos funcionales han adquirido un papel relevante los probióticos y prebióticos, con importantes efectos en la prevención y el tratamiento de enfermedades (2).

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 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). A los productos obtenidos de la combinación de los probióticos y prebióticos se han definido como simbióticos. Los efectos beneficiosos de esta combinación aún no están claramente demostrados, algunos investigadores opinan que los simbióticos son de gran importancia y pueden ofrecer ventajas al mejorar la supervivencia e implantación de los probióticos en el tracto intestinal, debido a que su sustrato específico está disponible desde el momento de la ingestión (1, 6, 7).

En Cuba se obtiene un sirope con FOS denominado comercialmente ALIDUX que tiene probadas propiedades prebióticas. 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. Es importante verificar la exposición de la fracción prebiótica al cultivo probiótico para 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* conocido también en Cuba como cultivo Bioyogur, es el que se utiliza para la elaboración de la mayoría de las le-

ches fermentadas probióticas que se comercializan en el territorio nacional. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de *L. acidophilus* y *S. thermophilus* cuando se incorpora un sirope con fructooligosacáridos al medio de fermentación como única fuente de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los ensayos se utilizó medio de cultivo Caldo Man, Rogosa and Sharpe (MRS) procedente del BIOCEN (Cuba), cultivo Bioyogur (cocultivo de *L. acidophilus* y *S. thermophilus*) y monocultivo de *L. acidophilus*, procedentes del Banco de Cepas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia y un sirope FOS-G producido en el Instituto de Investigaciones del Azúcar, cuyo nombre comercial es ALIDUX. Este sirope FOS-G contiene fructosa 2,6 % m/m, glucosa 18,8 % m/m, sacarosa 20,4 % m/m, kestosa 54,4 % m/m y nistosa 3,8 % m/m. Sobre la base de la ingesta diaria recomendada de los FOS (niños hasta 0,7 g y adultos hasta 1,5 g) (8), se incorporó el sirope en proporciones de 2, 3 y 6 % al caldo MRS. Se utilizaron dos patrones, uno compuesto por caldo MRS y 2 % de glucosa y otro solo por caldo MRS. Se empleó 2 % de inóculo de monocultivo de *L. acidophilus* en unos casos y en otros de cultivo de Bioyogur. Las variantes fueron incubadas durante 24 h a las temperaturas óptimas de crecimiento de los cultivos de *L. acidophilus* y Bioyogur: 37 y 45 °C, respectivamente. Se tomaron muestras cada 8 h durante toda la fermentación para la determinación de acidez (9) y pH (10). Se recolectaron las variantes estudiadas a las 0 y 24 h y se cuantificaron los azúcares no consumidos por cromatografía líquida de alta resolución. Las determinaciones se efectuaron a partir de 20 mL 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). Los resultados se analizaron con ayuda del paquete informático BioCrom, versión 3.0 (CIGB, La Habana). Se elaboraron las curvas de pH y acidez en función del tiempo de fermentación y se graficó el consumo de azúcares a las 0 y 24 h. Se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparaciones múltiples de Duncan para comparar los valores de pH y los valores de acidez obtenidos cada 8 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figs. 1 y 2 presentan los valores de acidez y pH desarrollados por el monocultivo de *L. acidophilus* cuando se incorporaron en el medio de cultivo 2, 3 y 6 % de sirope FOS-G y se utilizaron como controles medio suplementado con 2 % de glucosa y sin fuente de carbono, respectivamente.

Los valores de acidez y pH iniciales ($t=0$) fueron similares para las cinco variantes y estadísticamente no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Se observó que a medida que transcurrió el tiempo, aumentó la acidez y disminuyó el pH, excepto en la variante 4 correspondiente al medio MRS sin fuente de carbono. Este resultado evidencia que, al menos, uno de los azúcares presentes en el sirope fue metabolizado por la bacteria para su crecimiento y producción de ácido láctico.

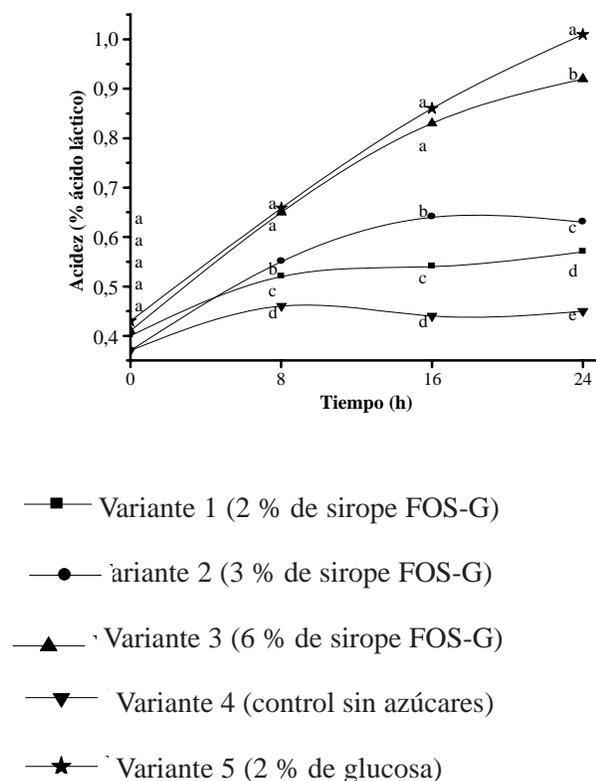


Fig. 1. Variación en el tiempo de los valores de acidez del caldo MRS suplementado con diferentes porcentajes de sirope FOS-G y monocultivo de *L. acidophilus*. Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

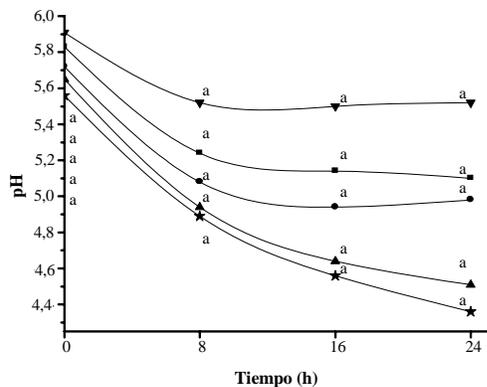
La Fig. 1 muestra que a las 8 h de transcurrida la fermentación se alcanzaron valores de acidez en el rango de 0,46 a 0,66 % de ácido láctico para todas las variantes. Los mayores valores correspondieron a la variante 3 (6 % de sirope) con 0,65 % de ácido láctico y la variante 5 (2 % de glucosa) con 0,66 % de ácido láctico, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre ellos. Esta conversión, similar en las variantes 3 y 5, es un resultado esperado pues las proporciones de glucosa en ambos medios son las más cercanas con respecto al resto de las variantes. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre todos los valores de acidez desarrollados por las variantes 1, 2 y 4, y de estas con respecto a las variantes 3 y 5. La comparación entre los valores de acidez de las diferentes variantes a las 16 h de la fermentación mostró el mismo resultado estadístico que el de las 8 h. A las 16 h los mayores valores correspondieron al igual que en el tiempo anterior a la variante 3 (0,83 % de ácido láctico) y variante 5 (0,86 % de ácido láctico).

Al final del estudio (24 h), los valores de acidez alcanzados por todas las muestras fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$); correspondiendo la mayor acidez a la variante 5 (1,01 % de ácido láctico), seguida de la variante 3 con 0,92 % de ácido láctico.

La Fig. 2 refleja que los valores de pH desarrollados por *L. acidophilus* durante las 24 h de fermentación no fueron significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) entre las cinco variantes. Aunque se debe señalar que los menores valores de pH correspondieron a la variante 5 (pH= 4,36) y variante 3 (pH= 4,51). Este resultado era de esperar al ser estas variantes las que en el medio de cultivo tienen mayor proporción de sirope y por lo tanto, es mayor la cantidad de azúcares fermentables disponibles para ser utilizadas por el microorganismo, lo que motivó una mayor producción de ácido láctico.

Las Figs. 3 y 4 exhiben el curso temporal de los valores de acidez y pH como resultado del crecimiento del cultivo Bioyogur al incorporar en el medio los mismos porcentajes de sirope FOS-G empleados en el estudio con el monocultivo de *L. acidophilus*.

La tendencia general de este resultado indica un comportamiento similar al obtenido en el estudio con el monocultivo, que evidencia 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 fermentación, excepto para la variante 4.



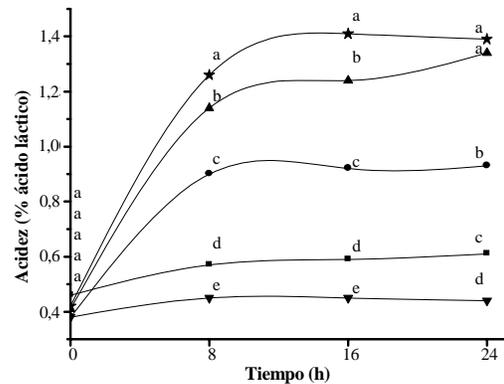
- Variante 1 (2 % de sirope FOS-G)
- Variante 2 (3 % de sirope FOS-G)
- ▲— Variante 3 (6 % de sirope FOS-G)
- ▼— Variante 4 (control sin azúcares)
- ★— Variante 5 (2 % de glucosa)

Fig. 2. Variación en el tiempo de los valores de pH del caldo MRS suplementado con diferentes porcentajes de sirope FOS-G y monocultivo de *L. acidophilus*. Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

Los valores de acidez desarrollados en este caso fueron superiores a los obtenidos en la fermentación con el monocultivo.

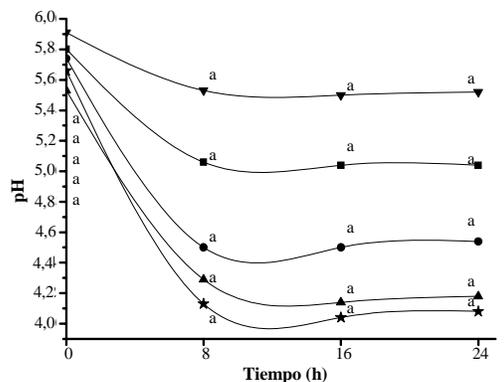
Es válido analizar que este comportamiento de los microorganismos durante la fermentación puede deberse a que ocurra algún tipo de relación sinérgica entre *L. acidophilus* y *S. thermophilus*, similar a la que existe entre este último y *Lactobacillus bulgaricus* durante la fermentación del yogur.

Estos resultados indican que cuando se utiliza el sirope FOS-G a 6 %, el comportamiento se acerca al que se obtiene con el crecimiento de estos microorganismos en el medio de cultivo tradicional (2 % glucosa, variante 5). El comportamiento de la acidez y el pH es esperado, pues cuando en el medio de cultivo hay mayor cantidad de azúcares simples como en las variantes 3 y 5, si no hay sustancias inhibitorias del crecimiento microbiano, debe haber una mayor producción de ácido láctico.



- Variante 1 (2 % de sirope FOS-G)
- Variante 2 (3 % de sirope FOS-G)
- ▲— Variante 3 (6 % de sirope FOS-G)
- ▼— Variante 4 (control sin azúcares)
- ★— Variante 5 (2 % de glucosa)

Fig. 3. Variación en el tiempo de los valores de acidez del caldo MRS suplementado con diferentes porcentajes de sirope FOS-G y cultivo de Bioyogur. Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.



- Variante 1 (2 % de sirope FOS-G)
- Variante 2 (3 % de sirope FOS-G)
- ▲— Variante 3 (6 % de sirope FOS-G)
- ▼— Variante 4 (control sin azúcares)
- ★— Variante 5 (2 % de glucosa)

Fig. 4. Variación en el tiempo de los valores de pH del caldo MRS suplementado con diferentes porcentajes de sirope FOS-G y cultivo de Bioyogur. Letras distintas indican diferencias significativas para $p \leq 0,05$.

Las Fig. 1 a 4 muestran que el comportamiento es indicativo de que tanto *L. acidophilus* en monocultivo como en cocultivo, con *S. thermophilus*, es capaz de producir ácido láctico a partir de la fermentación de al menos uno de los azúcares presentes en el medio de cultivo con los porcentajes de sirope empleados en el estudio. Estos resultados se corresponden con lo indicado por otros investigadores (6) que demostraron en sus

estudios que las bacterias ácido lácticas son capaces de crecer en medios sencillos a partir de azúcares sencillos produciendo ácido láctico.

La Fig. 5 refleja que los resultados obtenidos sobre el consumo de azúcares por parte de las bacterias lácticas utilizadas en este estudio, cuando fueron cultivadas a los diferentes porcentajes del Sirope FOS-G.

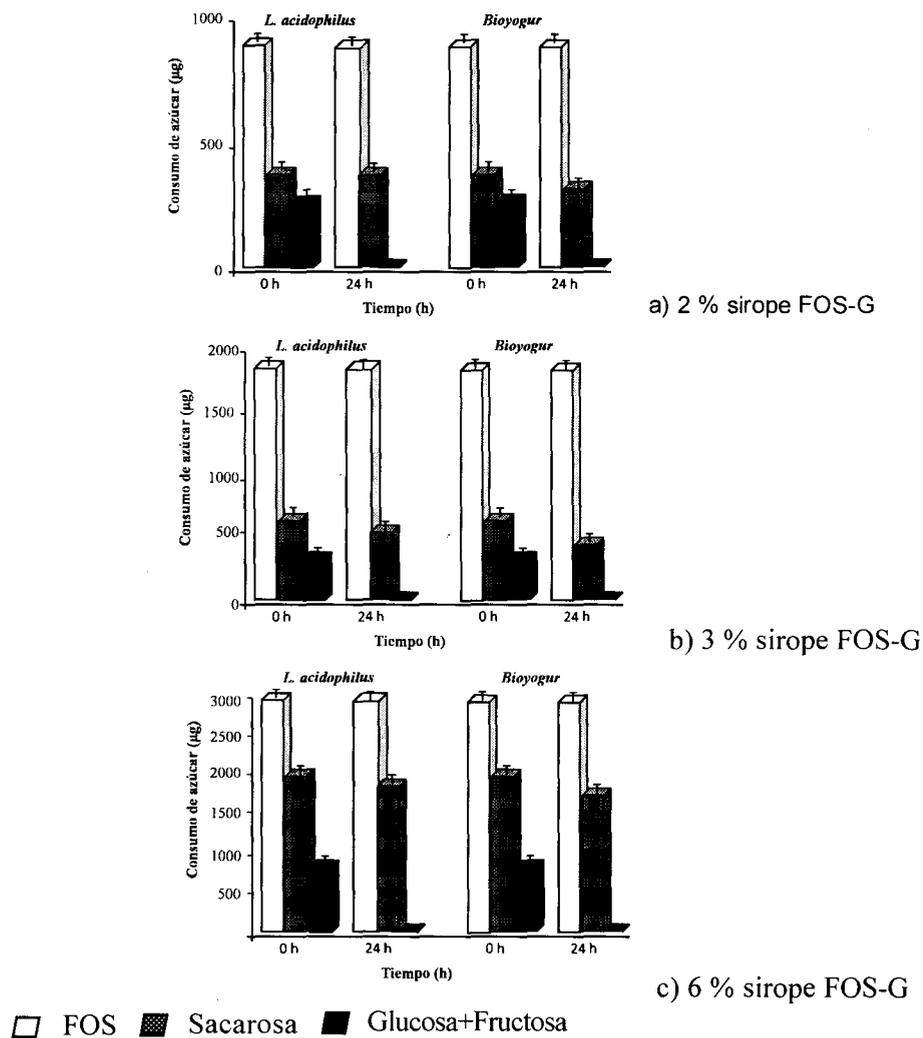


Fig. 5. Consumo de azúcares por los cultivos de *L. acidophilus* y *Bioyogur* durante el crecimiento en medio MRS suplementado con diferentes concentraciones de sirope FOS-G.

En todos los casos resulta coincidente que a las 24 h de fermentación hubo consumo preferencial de monosacáridos simples como glucosa y fructosa, mientras que la fracción de FOS se mantuvo intacta. En el caso del Bioyogur, cuando se emplearon las variantes con 2, 3 y 6 % de sirope FOS-G, se observó un ligero consumo de sacarosa respecto a esas mismas variantes con el cultivo de *L. acidophilus*. Este comportamiento puede deberse a que al agotarse la glucosa y fructosa, los microorganismos comienzan a consumir preferentemente la sacarosa. Este resultado es similar al informado por otros investigadores (11) cuando estudiaron el consumo preferencial de azúcares por la bacteria *Lactobacillus plantarum*.

CONCLUSIONES

No hubo inhibición del crecimiento de *L. acidophilus* y *S. thermophilus* cuando se les adicionó al medio el 2, 3 y 6 % del sirope con FOS. Durante las 24 h de fermentación los cultivos lácticos estudiados no consumen la fracción de FOS presente en el medio.

REFERENCIAS

1. Cagigas, A. L. 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. Botana, A. Bol. Informativo del Medicamento. 54: 5-10, 2005.
7. Chacón-Villalobos, A. Agron. Mesoamericana. 17(2): 265-286, 2006.
8. Pérez, E. Obtención de un biocatalizador para la producción industrial de FOS a partir de la sacarosa, utilizando una fructosiltransferasa vegetal expresada en *Pichia pastory* (tesis de Maestría en Ingeniería de Procesos Biotecnológicos, Universidad Central de las Villas, Santa Clara) Cuba, 2010.
9. NC-71:2000. *Leche. Métodos de ensayo. Determinación del índice de acidez*. Cuba, 2000.
10. NC-78-11-03:1983. *Leche. Método de ensayo. Determinación del pH*. Cuba, 1983.
11. Saulnier, D.; Molenaar, D.; de Voss, W.; Gibson, G. y Kolida, S. Appl. Environ. Microb. 73: 1753-1765, 2007.

La fracción de FOS se mantuvo intacta aún cuando se utilizó el porcentaje de incorporación más bajo (2 %). Este resultado es beneficioso y pudiera indicar que cuando el sirope de FOS sea incorporado a un producto fermentado antes del proceso de fermentación, esta fracción no será consumida y permitirá que pueda llegar al tracto gastrointestinal para ejercer su acción prebiótica.