

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS EN SUERO DULCE DE QUESERÍA

*Oxalis Rodríguez**, Julio Perea, Arelys Cortada, Ismaray Padrón, Manuel Fernández y Margarita Núñez

*Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria
Carretera al Guatao, Km 3 1/2, La Habana, C.P. 19 200, Cuba.
E-mail: oxalis@iia.edu.cu, silaxo@yahoo.es*

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue valorar el empleo de suero dulce de queso de leche de vaca como medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*. Se tomó el suero dulce de la elaboración de queso fresco, se pasteurizó y se inoculó con los monocultivos y cocultivos de los lactobacilos a razón de 1 % v/v, empleándose para el cultivo mixto de las bacterias lácticas una relación de inóculo 1:1. Se caracterizó físico, química y microbiológicamente el suero pasteurizado. Se realizó el ensayo de viabilidad de los microorganismos inoculados en el suero, a los 1, 7, 14, 21 y 28 días, para determinar el crecimiento de ambos en el sustrato. La capacidad de acidificación fue favorable para ambos lactobacilos, observándose un mejor comportamiento en los casos en que se utilizó el cocultivo de ambas bacterias. La viabilidad alcanzó valores hasta 10^8 ufc/g a los 14 días en cocultivo, lo cual indica que este medio es bueno para el crecimiento de estos microorganismos.

Palabras clave: probióticos, suero dulce de quesería, medio de cultivo, bacteria ácido láctica.

ABSTRACT

Evaluation of probiotic strains behaviour in the sweet whey cheese

The objective of this work was to evaluate the employment of sweet cheese whey as medium for cultivation of probiotics like *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. Sweet whey from fresh cheese was pasteurized and inoculated with the respective monoculture and co-culture of the lactobacilli in ratio 1% v/v and the rate 1:1 was used for inoculate both lactic bacterium. The physicochemical and microbiological characteristics of the whey were determined after the pasteurization. Viability test was carried out in inoculated whey at the 1, 7, 14, 21 and 28 days, to analyze the growth capacity of both microorganisms in this substrate. The acidification capacity during the evaluated time was favourable for both lactobacilli. Better behaviour was observed, however, in the cases when the co-culture of both bacteria was used. The co-culture showed viability that reaches up to 10^8 ufc/g at 14 days. This result suggest that this medium is favourable for the growth of these microorganisms.

Key words: probiotics, sweet cheese, media, lactic acid bacteria.

INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria cubana produce leches fermentadas con bacterias probióticas para el consumo humano. El suero dulce de quesería es un subproducto que también puede ser empleado como un sustrato para el desarrollo de productos fermentados probióticos y actualmente, en muchas ocasiones, se desvía para la alimentación animal. Los problemas tecnológicos de la industria láctea no permitieron que se continuara realizando el procesamiento y la distribución de este tipo de suero. El derrame de este subproducto al medio ambiente sin ningún tipo de tratamiento previo, por la alta carga de materia orgánica que contiene, puede ser dañino para el ecosistema donde se vierta.

**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.*

Desde el punto de vista nutricional, al igual que la leche, es una materia prima muy versátil. El uso del suero como alimento o como aditivo en dietas, resulta positivo pues es una forma de aprovechar los nutrientes que posee (1).

Para las bacterias ácido lácticas (BAL) el suero puede constituir un óptimo medio de cultivo pues la lactosa representa 70 % de los sólidos totales del suero, y es un carbohidrato que puede ser utilizado por estas bacterias como fuente de carbono y energía. La fracción proteica formada mayoritariamente por proteínas hidrosolubles (lactoalbúminas y lactoglobulinas) constituye junto a los péptidos libres una fuente de nitrógeno disponible (2).

Con respecto a las sales minerales, en el suero están presentes fundamentalmente en forma de bicarbonatos y sulfatos de sodio, fosfatos, cloruros y citratos, las cuales pueden jugar un papel importante como agentes tampones. Formando parte del suero, también se pueden encontrar elementos trazas como zinc, hierro, cobre, selenio y manganeso, que constituyen una fuente de microelementos. Por otra parte, las vitaminas hidrosolubles y las liposolubles junto a los aminoácidos libres presentes en el suero podrían estimular el crecimiento de las BAL (3).

Sobre la base de esta riqueza nutricional que tiene el suero no solo para los humanos, sino también para las BAL, este constituye un sustrato que puede ser utilizado para el desarrollo de productos probióticos a partir de BAL que sería otra vía de utilización de este subproducto.

Este trabajo se realizó con el objetivo de valorar el empleo de suero dulce de queso de leche de vaca como medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos probióticos *L. casei* y *L. acidophilus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron dos cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* procedentes del Banco de Cepas del Instituto de Investigaciones de la Industria Alimentaria. Las bacterias lácticas fueron mantenidas en leche descremada esterilizada (10 % sólidos totales) mediante reactivaciones semanales y conservadas en refrigeración a 4 y 6 °C.

Se utilizaron los siguientes medios para el cultivo de los microorganismos: suero dulce de queso de leche de vaca, procedente del proceso de elaboración de cinco producciones de queso fresco obtenido en la planta de productos lácteos del IIIA; así como agar MRS (Oxoid): Para el conteo de células viables de los lactobacilos.

Para la caracterización físico-química del suero pasteurizado, el suero fue recolectado, filtrado y envasado en envases de vidrio de 125 mL de capacidad con 100 mL de volumen efectivo. Posteriormente fue sometido al proceso de pasteurización en baño de agua a 95 °C por 5 min. Luego de refrescado el producto, se sometió a un muestreo aleatorio para realizar las siguientes determinaciones por duplicado: pH (4), acidez (5), sólidos totales, sólidos grasos, contenido de proteínas, azúcares y cenizas (6).

Se realizó la determinación de coliformes totales y fecales (7) y el conteo de hongos y levaduras viables (8). El crecimiento de las bacterias lácticas se determinó mediante el conteo de viables por el método de diluciones seriadas en placas de Petri con medio agar MRS Oxoid (9). El conteo de las colonias se efectuó bajo el microscopio estereoscópico *Olimpus*, auxiliándonos de un contador de colonias *Gerber*. La preparación de las diluciones se llevó a cabo con solución salina peptonada.

Los monocultivos de *Lactobacillus acidophilus* (viabilidad=10⁹ ufc/mL) y *Lactobacillus casei* (viabilidad=10⁹ ufc/mL) fueron inoculados en el suero dulce de queso de leche de vaca a razón de 1 % v/v, empleándose para el cultivo mixto de bacterias lácticas una relación de inóculo 1:1.

La fermentación se realizó en los mismos envases en condiciones estáticas. Los frascos fueron inoculados independientemente con los monocultivos de los lactobacilos y el cultivo mixto de ambos en la relación antes referida. Los cultivos fueron incubados a 37 °C y se tomaron muestras cada 1 h durante 24 h, para realizar las determinaciones de acidez y pH. Los resultados se expresaron tomando el valor promedio de tres repeticiones por variable a estudiar.

El suero fermentado fue conservado en los mismos frascos de la fermentación a temperatura promedio de ambiente, 30 °C. Al cabo de 7, 14, 21 y 28 días fue realizado el conteo de células viables empleando el método indicado por otros autores (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra los resultados de la caracterización físico-química del suero dulce de quesería utilizado como sustrato para la fermentación. Los resultados obtenidos en estas determinaciones presentaron muy poca dispersión. De forma general se aprecia que las características físico-químicas del suero que se utilizó en este estudio se asemejaron más a las informadas para el suero (10) que a las registradas en la base de datos USDA (11). Esto es comprensible pues la composición del suero depende directamente de la leche y esta a su vez depende de muchos factores (2).

Las características físico, químicas y microbiológicas del suero estudiado, indican que este sustrato pasteurizado presenta buenos índices de calidad, lo que posibilita continuar la evaluación de otros indicadores importantes para el mismo. Este derivado lácteo posee variados componentes que pueden satisfacer las necesidades nutricionales de las bacterias ácido-lácticas utilizadas en este estudio.

La Tabla 2 presenta que los conteos de coliformes totales y fecales así como de hongos y levaduras, se encontraron dentro de los límites establecidos en las normas vigentes para el conteo microbiano (12).

La Fig. 1 muestra los resultados que corresponden a la acidez desarrollada por los monocultivos de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* y el cocultivo de ambos (cultivo mixto). Los valores de acidez desarrollados por los monocultivos de los lactobacilos y el cocultivo permanecieron casi constantes durante la primera hora, lo que constituyó un comportamiento similar a una fase de latencia. Pasado este tiempo se comienza a observar un aumento considerable en los valores de acidez, siendo mayores en el intervalo de 3 a 17 h. El cultivo de *L. acidophilus* mostró siempre un poder acidificante mayor que el cultivo de *L. casei*, mientras que el mixto fue a su vez el de mayor poder acidificante. Después de las 18 h, los cultivos presentaron variaciones más discretas en los porcentajes de ácido láctico, detectándose a las 24 h un valor de acidez más alto para el cocultivo (0,93 % de ácido láctico) mientras que para los monocultivos de *L. acidophilus* y de *L. casei* los valores fueron de 0,86 y 0,80 % de ácido láctico, respectivamente.

Tabla 1. Características físico-químicas de diferentes sueros dulces de queso de leche de vaca (n=5)

Características físico-químicas	Suero de queso en estudio		Suero dulce de queso de leche de vaca (10)	Suero dulce de queso de leche de vaca (11)
	Media	CV (%)	Media	Media
Sólidos totales (% m/m)	6,38	1,7	6,48	6,66
Grasa (% m/m)	0,42	4,8	0,55	0,36
Proteínas (% m/m)	0,70	4,3	0,66	0,85
Cenizas (% m/m)	0,58	1,7	0,56	0,31
Lactosa (% m/m)	4,68	2,8	4,71	5,14
pH	6,45	9,3	6,46	-
Acidez (% ácido láctico)	0,09	9,1	0,08	-

CV: coeficiente de variación.

Tabla 2. Contaminantes microbianos presentes en el suero de quesería pasteurizado

Microorganismos	(ufc/mL)
Coliformes totales	< 10
Coliformes fecales	< 10
Hongos y levaduras	< 10

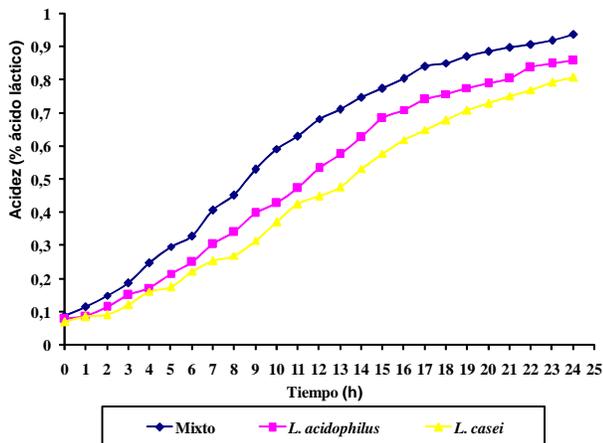


Fig. 1. Capacidad de acidificación de los monocultivos de *L. acidophilus* y *L. casei* y el cultivo mixto en suero de quesería.

El comportamiento observado en la Fig. 1 reafirmó que el suero dulce de queso de leche de vaca obtenido en la planta piloto es un sustrato que puede ser utilizado para el cultivo de estas bacterias ácido lácticas, pues se desarrollaron valores de acidez normales en un período de 24 h.

En el caso del cocultivo se pudo apreciar que siempre alcanzó valores de acidez más altos que los encontrados para los monocultivos de *L. acidophilus* y *L. casei*. Tal comportamiento pudiera deberse a una posible relación sinérgica entre dichos microorganismos, considerando los siguientes elementos: *L. acidophilus* tiene una velocidad de crecimiento mayor a la reportada para *L. casei* (3), por lo que dicho microorganismo debe desarrollarse primero, produciendo diversos compuestos, que pueden ser utilizados posteriormente por *L. casei*. Este último a su vez pudiera producir otros metabolitos que estimulen el crecimiento de *L. acidophilus*.

La Fig. 2 presenta que el crecimiento de las bacterias ácido lácticas a partir de los nutrientes del suero provocó cambios en el pH del medio. El cultivo mixto mostró una mayor velocidad de producción de ácido durante las primeras 14 h de fermentación en relación a los monocultivos. Las variaciones de pH más pronunciadas tuvieron lugar a partir de las 3 h coincidiendo con lo obtenido en las curvas de acidez.

Tanto en los monocultivos como en el cultivo mixto disminuyeron los valores de pH del suero de manera apreciable en las 24 h de fermentación evaluadas. En el caso de los cultivos de *L. acidophilus* se obtuvo un pH final de 3,61 y para *L. casei* de 3,73; mientras que el cultivo mixto en igual tiempo de fermentación provocó una variación en el pH del medio hasta 3,54; valor ligeramente inferior al encontrado para los monocultivos.

De manera global, las curvas de pH y acidez obtenidas (Fig. 1 y 2), confirman que la composición físico-química y la calidad microbiológica del suero dulce de quesería pasteurizado (Tablas 1 y 2), posibilitan que éste puede constituir un sustrato adecuado para la obtención de un suero fermentado utilizando bacterias ácido lácticas con características probióticas.

La Fig. 3 refleja los resultados obtenidos de la viabilidad individual y del cocultivo de ambos lactobacilos durante el período de 28 días.

En todos los casos los valores para ambos microorganismos se mantuvieron en el orden de 10^7 ufc/mL (mínimo terapéutico establecido), durante los días 7 al 15 de la fermentación, llegando a los 18 días en el caso del cultivo mixto. Es de destacar que con el cocultivo se obtuvieron valores de viabilidad superiores en la mayoría del período fermentativo. Estos resultados confirman que ambos microorganismos se ven favorecidos cuando son cultivados de forma conjunta.

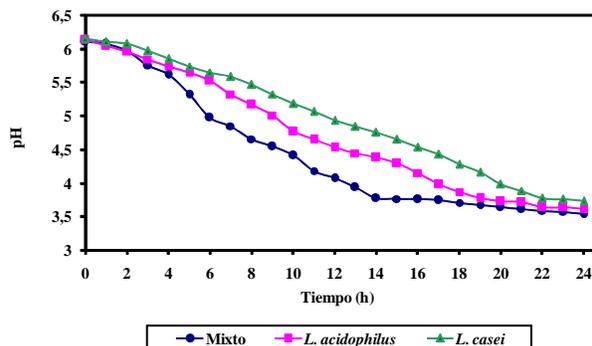


Fig. 2. Comportamiento del pH de los cultivos de *L. acidophilus* y *L. casei* y el mixto inoculados en el suero dulce de quesería.

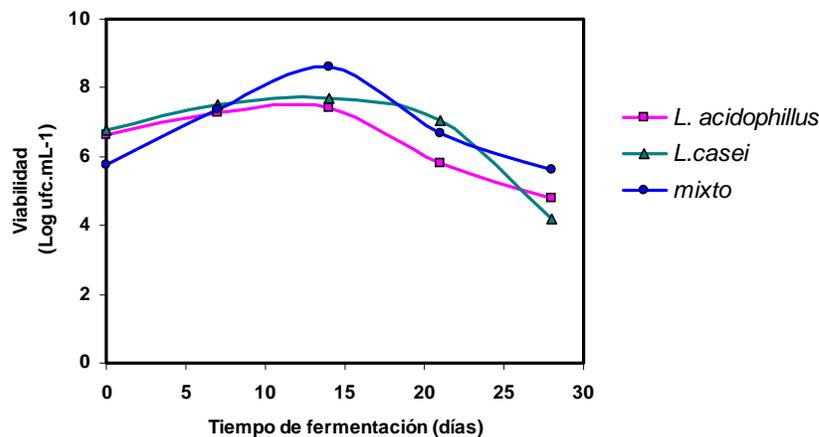


Fig. 3. Viabilidad de *L. acidophilus*, *L. casei* y cultivo mixto en el suero fermentado.

CONCLUSIONES

Tanto *L. casei* como *L. acidophilus* pertenecen al género *Lactobacillus*, es por ello que son capaces de resistir los incrementos de acidez que se suscitan durante este período (3). Asociado a su capacidad de resistencia está la presencia de los metabolitos resultantes de la fermentación láctica, lo cual es característico de estas especies (13).

Tanto *L. casei* como *L. acidophilus* mostraron buena capacidad de acidificación, observándose un mejor comportamiento cuando se utilizó el cocultivo de ambos microorganismos. La viabilidad se mantuvo en valores mayores de 10^7 ufc/g entre los 7 y 15 días, alcanzando valores de 10^8 ufc/g a los 14 días en el caso del cocultivo, lo cual indica que el suero dulce de quesería es un medio favorable para el crecimiento de estos microorganismos.

REFERENCIAS

1. Perea, J. y Paz, T. Desarrollo de un yogur de soya con adición de suero de quesería. *Alimentaria*, No. 327: 113-116, 2001.
2. Hernández, R. Características de la composición química de la leche en Cuba en la década del 1990-1999 (tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias. Universidad de Santi Spíritus Cuba) 2000.
3. Leveau, J. y Bouix, M. *Los microorganismos de interés industrial*. Ed. Acribia, Zaragoza. Cap. 2: 167-323, 2000.
4. NC 78-11-03:1983. *Leche. Método de ensayo. Determinación del pH*. Cuba, 1983.
5. NC 71:2000. *Leche. Métodos de ensayo. Determinación del índice de acidez*. Cuba, 2000.
6. AOAC. *Oficial Methods of Analysis*. William Horowitz. 15 Ed. Washington, D C., 1990.
7. NC: ISO 4832:1991. *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía General para la enumeración de los coliformes. Técnica de placa vertida*, 2002.
8. NC: ISO 7954: 1987. *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía General para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25 °C*, 2002.
9. García, H. Obtención de leche fermentada con microorganismos mesófilos probióticos (tesis presentada en opción al título académico de Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Instituto Farmacia y Alimento, La Habana) Cuba, 2004.
10. Perea, J. y Paz, T. Desarrollo de un yogur de soya con adición de suero de quesería. I Definición de la formulación. *Alimentaria*, No. 323: 91-93, 2001.
11. USDA. Health Tech SR Search. National Nutrition Database for Windows. Stander Referente Relace SR 16, 2004.
12. NC:TS 457:2006: *Leches fermentadas. Especificaciones*. Cuba, 2006.
13. Holt, J.; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J. y Williams, S. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Ed. Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. Parte 3. 1994, p. 566,