

DESARROLLO DE UNA LECHE FERMENTADA A PARTIR DE LECHE DE BÚFALA Y CULTIVO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

*Carola Íñiguez**, Tamara Rodríguez, Osmar Hernández, Isbel Martínez y María Nieto

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carr. al Guatao km 3 ½ La Habana, Cuba, CP 19200.

E-mail: carolai@iia.edu.cu

RESUMEN

Se estudió la influencia de tres valores de inoculación del cultivo *Lactobacillus acidophilus* sobre la cinética de fermentación ácido láctica durante la etapa de incubación y sobre el desarrollo de acidez, sabor y textura, de una leche fermentada a partir de leche entera de búfala con un 9 % de azúcar, lográndose los mejores resultados con un valor de cultivo del 2,5 % y adición de 0,03 % de emulsión de naranja. La formulación seleccionada fue caracterizada en sus indicadores composicionales, sensoriales, microbiológicos y de viabilidad celular del probiótico. La estimación de la durabilidad se realizó por el método gráfico utilizando la distribución de Weibull. Los resultados evidencian la posibilidad de obtener un producto con adecuadas características de calidad. La vida útil del producto conservado a 4 °C es de 18 días. El conteo *L. acidophilus* resultó superior al mínimo terapéutico que se considera para productos probióticos.

Palabras clave: búfala, leche fermentada, *Lactobacillus acidophilus*.

ABSTRACT

Development of fermented milk from buffalo milk using culture of *Lactobacillus acidophilus*

The influence of three inoculation values of the *Lactobacillus acidophilus* culture on the kinetics of lactic acid fermentation during the incubation stage and on the development of acidity, flavor and texture, of a milk fermented from buffalo whole milk with a 9 % sugar, was studied. Best results were achieving with an inoculation rate of 2.5 % and adding 0.03 % orange emulsion. The selected formulation was characterized in its compositional, sensory, microbiological and cell viability indicators of the probiotic. The durability estimation was performed by the graphical method using the Weibull distribution. It was concluded that the products showed adequate quality characteristics. The shelf life at 4 °C is 18 days. At this time the *L. acidophilus* count was higher than the therapeutic minimum considered for probiotic products.

Keywords: buffalo, fermented milk, *Lactobacillus acidophilus*.

INTRODUCCIÓN

Lactobacillus acidophilus es uno de los microorganismos con características probióticas más utilizado en el país ya sea asociado con otras cepas entre las que resalta el cultivo láctico Bioyogur (cocultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*) o solo, dando como resultado una leche comúnmente conocida como leche acidófila. Específicamente a *L. acidophilus* le son atribuidas las propiedades de mantener el estreñimiento y la diarrea bajo control, contrarrestar la intolerancia a la lactosa por su asociación con lactasa, la reducción de los gases internos, el control del colesterol mediante una absorción normal de grasas en la dieta, así como la prevención de la contaminación por enfermedades infecciosas intestinales (1, 2).

***Carola Íñiguez:** Licenciada en Química (UH, 1970). Investigador Auxiliar Dirección de Lácteos. Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Sus principales líneas de trabajo son el desarrollo e implantación de nuevas técnicas analíticas para la determinación de los índices de calidad físico químicos de leche y derivados, empleo de extensores en leches fermentadas, utilización de cultivos probióticos en leches fermentadas a partir de leche de búfala. Es miembro del Comité Técnico de Normalización de Leche y Productos Lácteos.

Considerando además resultados de estudios que han demostrado una serie de ventajas de la leche de búfala con respecto a la de vaca, entre las que se pueden mencionar: un contenido de colesterol menor (275/100 g de grasa) que el de la leche de vaca (300 mg/100 g de grasa), un contenido más elevado de calcio y fósforo, mejor digestibilidad debido a la producción mayoritaria de β -caseína-A2, comportamiento que la asemeja más a la composición en proteínas de la leche humana, así como su riqueza en los componentes mayoritarios, que favorecen notablemente el rendimiento de los quesos, y las características sensoriales de las leches fermentadas a partir de ella elaboradas (3) así como la necesidad de incrementar la industrialización y comercialización de derivados lácteos a partir de este tipo de leche, el objetivo del presente trabajo consistió en: desarrollar una leche fermentada aromatizada a partir de leche de búfala definiendo los niveles de inoculación del cultivo *Lactobacillus acidophilus* y de aromatizante, así como la calidad sensorial, de composición, la microbiológica y la durabilidad de la leche fermentada desarrollada a temperatura de conservación de 4 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo, se empleó leche entera de búfala con adecuadas características, composiciones y de calidad microbiológica, cultivo *Lactobacillus acidophilus* con una acidez expresada en ácido láctico de 0,95 %, y una viabilidad celular 10^9 ufc/mL, azúcar refino calidad alimentaria, cuya proporción del 9 % fue establecida atendiendo a los buenos resultados obtenidos en el desarrollo de otras leches fermentadas aromatizadas a partir de leche de búfala (4) y emulsión de naranja con una densidad de 0,80 g/mL y un índice de refracción de 1,35 proveniente de la Planta de Aromas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia.

Se decidió considerar porcentajes de inoculación de cultivo de 2,5; 3,0 y 3,5 % superiores a los utilizados en leches fermentadas sin aromatizar entre 2,0 a 2,5 % debido, a que la presencia del azúcar en la formulación trae aparejada una cierta inhibición en el desarrollo de los microorganismos que conforman el cultivo iniciador como derivación del incremento de la presión osmótica del medio y a los buenos resultados que se han obtenido en otras leches fermentadas con adición de cultivo de *L. acidophilus* (4).

Con el propósito de evaluar las características de la fermentación ácido láctica durante la etapa de incubación a los tres valores de inóculo en estudio, fueron efectuadas cuatro corridas de 4 L de leche, con adición del 9 % de azúcar. Para obtener las curvas de fermentación se determinaron en cada corrida los valores de acidez a tiempo cero (recién inoculada) y cada 30 min. El momento seleccionado para la interrupción de la etapa de incubación (fin de la etapa) se consideró a niveles de acidez de 0,45 a 0,50; al ser estos los niveles industrialmente establecidos para esta etapa en otras leches fermentadas a partir de leche de búfala (4) Los valores medios de acidez total obtenidos a los diferentes niveles de inoculación se expresaron de forma gráfica contra el tiempo de incubación.

A las 24 h de fabricadas las diferentes variantes, tiempo al cual se consideran como productos terminados, se determinaron la acidez total (5) y la evaluación sensorial. El análisis sensorial, se realizó tomando ocho muestras representativas de cada producción, las que fueron analizadas a la temperatura de 12 °C, por una comisión de evaluación sensorial integrada por ocho catadores entrenados, que evaluaron las características sensoriales fundamentales en este derivado lácteo sabor y textura, así como los atributos que las integran utilizando para ello el Procedimiento Analítico para la Evaluación Sensorial (6) vigente que permite calificar los atributos descritos en la ficha de acuerdo con el defecto presentado y la intensidad con que se percibe el mismo. La calificación otorgada por los evaluadores es expresada para cada atributo desde excelente (cinco puntos) a mala (un punto). La puntuación promedio asignada por los evaluadores a los atributos que integran el sabor y la textura debe resultar $\geq 4,0$ para una evaluación cualitativa entre buena y excelente.

Una vez definido el porcentaje de inoculación se procedió a determinar el del aromatizante en este caso emulsión de naranja. Las formulaciones ensayadas 0,15; 0,20 y 0,25 % fueron sometidas a una prueba sensorial de ordenamiento mediante nueve catadores entrenados, estableciendo un orden ascendente y considerando la tipicidad (calidad e intensidad) del olor y sabor del aromatizante añadido. Los resultados fueron procesados siguiendo el procedimiento establecido en la norma correspondiente (7).

Con la formulación seleccionada, aplicando la tecnología establecida para la leche fermentada de coágulo se efectuaron cuatro corridas de 30 L de leche. El producto se envasó en potes de polipropileno de 200 mL con tapas de aluminio. Para la caracterización física y química del producto se determinaron el desarrollo de acidez total (expresada como ácido láctico) (8), el contenido en materia grasa y proteínica, así como los sólidos totales y las cenizas (9), los hidratos de carbono fueron obtenidos por diferencia.

Se efectuó además el conteo de coliformes totales (10), mohos y levaduras (11) así como conteo de células viables *L. acidophilus* (12). La evaluación sensorial global por ocho catadores entrenados se llevó a cabo por el procedimiento analítico vigente para el control de la calidad sensorial de leches fermentadas mediante el análisis y calificación de los atributos que configuran sus características organolépticas (6).

Se efectuó una prueba de aceptación con la participación de 70 consumidores con una escala de siete puntos donde siete equivalió a me gusta extremadamente y uno a me disgusta extremadamente (13).

Para el estudio de durabilidad cuatro lotes de leche fermentada aromatizada con adecuadas características de composición, calidad higiénico sanitaria y sensorial, envasadas en potes de polipropileno de 200 mL fueron conservados en nevera a 4 °C.

La calidad del producto durante la conservación fue determinada considerando criterios sensoriales, microbiológicos y de viabilidad celular *L. acidophilus*. Adicionalmente se consideró la determinación del índice de acidez, aunque no fue tomada en cuenta para la determinación de la vida útil del producto, puede servir de valiosa información sobre posibles alteraciones en alguna de las características del mismo, relacionada fundamentalmente con la detección de un sabor ácido o la sinéresis.

El panel encargado de la evaluación sensorial estuvo integrado por nueve catadores entrenados en este tipo de producto cada uno de los cuales emitía un criterio basándose en términos de acepto – rechazo. Se le solicitó a los evaluadores indicaran en la boleta la causa del rechazo, (alteraciones en el sabor, olor, consistencia, entre otras). Los lotes se consideraron rechazados siempre que se alcanzó en el dictamen el número mínimo

significativo de juicios fallo (muestras rechazadas) para $a = 0,1$ dada por una distribución binomial $p < 0,1$ (14). Por tratarse de un producto perecedero se decidió efectuar las determinaciones de acidez, y la evaluación sensorial diariamente.

Desde el punto de vista microbiológico, las determinaciones de los indicadores microbiológicos conteo total de microorganismos coliformes, mohos y levaduras así como la viabilidad celular del microorganismo probiótico, se efectuaron cada 72 h y una vez aparecido algún rechazo, diariamente hasta el fallo. Para la aceptación o rechazo de lote el número de muestras a tomar y los parámetros microbiológicos son los establecidos en la norma cubana correspondiente (15), mientras que la viabilidad celular deberá resultar superior al mínimo terapéutico establecido (12).

Para la estimación de la durabilidad se asumió que el tiempo de vida útil de la leche fermentada se distribuye probabilísticamente de acuerdo a la Ley de Weibull. Para su ajuste fue utilizada la técnica de riesgo para datos incompletos de fallo (14).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 muestra las curvas de fermentación obtenidas con los diferentes porcentajes de inoculación del cultivo. Se puede apreciar como a medida que transcurre el tiempo de coagulación aumenta la acidez, comportamiento lógico pues al no estar presentes en el medio sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano hay una producción importante del producto mayoritario del metabolismo fermentativo de esta bacteria, el ácido láctico, lo que se traduce en un incremento en la acidez.

Se aprecia además un aumento en el tiempo de coagulación en la medida que aumenta el porcentaje de cultivo ya que el momento seleccionado para considerar finalizada la etapa de incubación (0,45 a 0,50 % de acidez) se alcanzó a valores de inoculación de 2,5 % entre los 150 y los 180 min, mientras que a valores de inoculación de 3,0 y 3,5 % se necesitaron entre 180 y 210 min, como probable derivación del aumento del lactobacilo probiótico, que presenta una cinética de acidificación lenta con tiempos de coagulación altos, este mayor poder acidificante del cultivo *L. acidophilus* al 2,5 % de inoculación, pudiera estar relacionada además con una mayor fragmentación o hidrólisis de las proteínas en sus respectivos aminoácidos (proteólisis) lo que

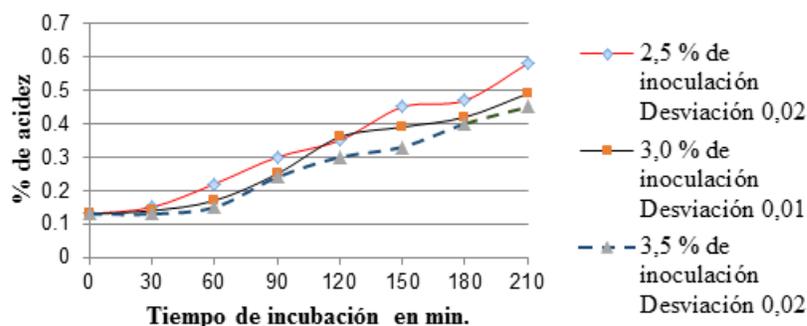


Fig. 1. Curvas de fermentación con los diferentes niveles de inoculación.

provocaría cierto efecto tampón, y por consiguiente determinada inhibición en el desarrollo de la acidez a valores de inoculación del 3,0 y 3,5 % (2, 3).

A las 24 h de producidas las leches fermentadas y para los tres niveles de inóculo ensayados, los niveles de acidez desarrollados cumplieron los valores especificados en la correspondiente norma de calidad (15). En ese mismo periodo a partir del valor medio de inoculación del cultivo *L. acidophilus* las puntuaciones alcanzadas en la evaluación sensorial de la característica textura, incumplen la restricción impuesta al resultar inferiores a cuatro puntos. El atributo que influyó decisivamente en estas bajas puntuaciones resultó la consistencia/viscosidad. De forma general los panelistas manifestaron una seria afectación en la filantez del producto al evaluar esta propiedad de marcada como probable derivación de que estos niveles de inoculación se corresponden con un exceso de cultivo, lo que provoca un incremento en la producción de mucílagos característica intrínseca del cultivo *L. acidophilus*, con la consiguiente afectación de la calidad sensorial del mismo (1).

Considerando que el momento seleccionado para dar por finalizada la etapa de incubación se alcanzó entre los 150 y los 180 min, a niveles de inoculación del cultivo de 2,5 % necesitando los valores de inoculación de

3,0 y 3,5 % entre 180 a 210 min y que solo el nivel más bajo de inoculación satisface la restricción impuesta en la evaluación sensorial de la textura, se selecciona el valor de inoculación de 2,5 % para las posteriores etapas del trabajo.

Analizando los resultados obtenidos en la definición del nivel del aromatizante, y tomando en cuenta el valor del estadígrafo F ($F_{cal} > F_{crítica}$) se puede afirmar que al menos una de las variantes es diferente ($\alpha=0,05$). Mediante la prueba de las diferencias pareadas de Friedman para dos muestras y nueve evaluadores (7) se logró precisar que la variante diferente se corresponde con un 0,15 % del aromatizante, cuya suma de rangos ($R = 26$) la definen como la de mejor ubicación (preferencia).

De forma general, a los valores medio y alto de la emulsión de naranja, los evaluadores detectaron un sabor amargo y un olor intenso como probable derivación de una proporción excesiva de la dosis de emulsión lo que provocó una afectación importante en las puntuaciones asignadas y por consiguiente en su calidad sensorial.

La Tabla 1 muestra las características físicas, químicas y microbiológicas y la puntuación alcanzada en la evaluación sensorial global de la leche fermentada

Tabla 1. Características de la leche fermentada desarrollada

Componente	Media \pm IC	Indicadores microbiológicos	ufc/g
Materia proteínica (g/100 g)	3,9 \pm 0,12	Coliformes	< 10
Materia grasa (g/100 g)	5,9 \pm 0,66	Mohos	10
Hidratos de carbono (g/100 g)	12,3 \pm 0,48	Levaduras	10
Cenizas (g/100 g)	0,61 \pm 0,08	Células viables	2 x 10 ⁸
Sólidos totales (g/100 g)	22,7 \pm 0,26		
Valor calórico kcal/100 g	118		
Acidez como ácido láctico (g/100 g)	0,86 \pm 0,02		
Evaluación sensorial (puntos)	19,4		

n=4 IC límites de confianza nivel de confianza 95 %.

desarrollada. Los resultados de la composición proximal, se corresponden con la proporción de la leche de búfala en la formulación de la leche fermentada. El contenido en hidratos de carbono está en correspondencia con el de la lactosa que aporta la leche y el porcentaje de azúcar añadido un 9 %. El valor de la acidez se considera normal para una leche fermentada a las 24 h de elaborada.

Destaca la buena calidad higiénico sanitaria de la leche fermentada ya que los conteos de los indicadores microbiológicos cumplieron las especificaciones establecidas en la norma correspondiente (16). El elevado conteo de viabilidad *L. acidophilus* garantiza el mínimo terapéutico, establecido en el orden de 10^7 ufc/g (12). La puntuación alcanzada en la evaluación sensorial global al resultar superior a los 19 puntos permite una evaluación cualitativa de excelente, lo que avala la alta valoración de las características sensoriales.

La prueba de aceptación por 70 consumidores dio como resultado una evaluación que corresponde a una clasificación cualitativa de me gusta mucho. La Fig. 2 presenta los resultados en forma gráfica. Este resultado concuerda con los criterios emitidos por el grupo de catadores especializados.

Durante la conservación de la leche fermentada, los conteos de los indicadores microbiológicos considerados, conteo total de microorganismos coliformes, de hongos y de levaduras, no sustentaron el rechazo de los lotes en estudio al resultar inferiores al máximo establecido en las normas cubanas correspondientes de 10^2 ufc/g. (16). El conteo en células viables superior al mínimo terapéutico establecido de 10^7 ufc/g demuestra que el probiótico aporta sus propiedades dieto terapéuticas con las ventajas que de ello se deriva. Las variaciones de acidez (Fig. 3) estuvieron centradas a límites muy estrechos por lo que no existió deterioro del producto por acidificación.



Fig. 2. Prueba de aceptación por consumidores.

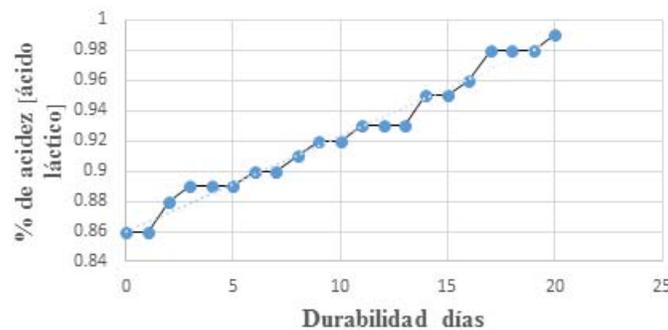


Fig. 3. Variaciones de la acidez total durante la conservación.

En la medida en que transcurre el estudio de durabilidad y aún sin ser rechazadas las muestras, algunos catadores comenzaron a detectar alteraciones en la característica sensorial sabor, referidas como producto envejecido con pérdida en la intensidad del sabor, afectaciones que al intensificarse en la medida en que avanzó el estudio de durabilidad provocaron finalmente el rechazo de los lotes y la conclusión del estudio de durabilidad y por consiguiente la vida útil del producto establecida mediante criterios sensoriales, resultó de 18 d considerado un 5 % de unidades deterioradas. Los resultados de la prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov Smirnov, de los tiempos de vida útil a la distribución asumida indicaron que los tiempos de fallo pueden ser explicados mediante la distribución de Weibull, confirmando el estimado de durabilidad obtenido.

REFERENCIAS

1. Rodríguez Gómez JM. Microorganismos y salud: Bacterias lácticas y bifidobacterias. Disponible en <https://books.google.com/books?isbn=8474918235> Acceso junio 2017.
2. FAO Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales. Disponible en: www.fao.org/3/a-a0512s.pdf 2006. Acceso noviembre 2016.
3. González K. ¿Sabías que existen dos tipos de leche y que estas pueden afectar de manera distinta tu salud? Disponible en: zoovetespasion.com/ganaderia/tipos-de-leche. Acceso julio de 2017.
4. Íñiguez C, Rodríguez T, Valdés M. Utilización de cultivos probióticos en leche fermentada de búfala. En: XIII Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICTA 13); 2016 jun 6-10; La Habana, Cuba. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; 2016. p. 715-22.
5. NC 71. Leche Determinación de la acidez. Cuba; 2000.
6. Zamora E, Álvarez MD, Rodríguez M, Duarte C. Procedimiento analítico para la evaluación sensorial de productos de la industria láctea. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; 2006.
7. NC ISO 8587. Análisis sensorial. Metodología y Ordenamiento. Cuba; 2008.
8. NC ISO 11869. Yogur Determinación de la acidez titulable. Método potenciométrico. Cuba; 2006.
9. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemists. 20th ed. Washington DC: Arlington, VA; 2016.
10. NC-ISO 4832. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía General para la enumeración de los coliformes. Técnica de placa vertida. Cuba; 2013.
11. NC: 1004. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía General para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25 °C. Cuba, 2016.
12. García H, Paz T, Tejedor R, Rodríguez O. Lactobacilos probióticos en una leche fermentada. *Alimentaria* 2004; 359:54-8.
13. Torricella RG, Zamora E, Pulido H. Evaluación Sensorial Aplicada a la Industria Alimentaria. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; 1989.
14. Cantillo J, Fernández C, Nuñez de Villavicencio M. Durabilidad de los Alimentos. Métodos de estimación. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; 1994.
15. FAO. Leches fermentadas CODEX STAN 243; 2003.
16. NC 585. Contaminantes microbiológicos. Regulaciones sanitarias. Cuba; 2017.

CONCLUSIONES

Es posible obtener una leche fermentada aromatizada a partir de entera de búfala por adición de un 2,5 % de cultivo *Lactobacillus acidophilus*; 0,15 % de emulsión de naranja y 9 % de azúcar, con adecuadas características sensoriales, composicionales y de calidad higiénico sanitaria. La vida útil de la leche fermentada en envases de polipropileno de 200 mL de capacidad provistas de tapas de aluminio y conservada a 4 °C fue de 18 d, durante ese periodo el conteo de *Lactobacillus acidophilus* se mantuvo en el orden de 10^8 ufc/mL (superior al mínimo terapéutico establecido de 10^7) lo que demuestra que el cultivo probiótico aporta sus propiedades dieto terapéuticas con las ventajas que esto presupone.