

Viabilidad de *Lactobacillus paracasei* en co-cultivo con otras bacterias lácticas en leche descremada fermentada de cabra

Viability of *Lactobacillus paracasei* in co-culture with other bacteria in skim milk lactic fermented goat

*Llerena, C.¹; Chele, J.¹; Saona, R.¹; Díaz, R.¹; Hernández, A.²

¹Universidad de Guayaquil, Ecuador

²Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana

*carmen.llerenar@ug.edu.ec

RESUMEN

La utilización de microorganismos para elaborar productos lácteos permite producir los cambios bioquímicos deseados. El objetivo fue evaluar la viabilidad de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* en co-cultivo con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (cultivo BAL) a diferentes relaciones de inóculo en leche de cabra descremada. La leche fue pasteurizada (85 °C, 30 minutos), enfriada hasta 40 °C e inoculada con una mezcla de cultivos de *Lactobacillus paracasei* y BAL en proporción 9:1 ó 7:1. La leche inoculada fue incubada a 40 °C y cada 30 minutos se midieron pH, acidez (grados Dornic), y recuento de bacterias probióticas (72 horas de incubación) para determinar los parámetros cinéticos de la fermentación. La viabilidad *in vitro* fue evaluada mediante la resistencia a la acidez (pH 2 y 3) y tolerancia a bilis de buey. La leche recibida cumple los parámetros de consumo establecidos por las normas (NTE INEN 9:2012). El descenso de pH fue independiente de la proporción de las mezclas de cultivo empleadas, con valor final de 4,6 y acidez final ligeramente superior al emplear la proporción 9:1. El recuento de bacterias probióticas fue superior a 10⁸ UFC/mL, independientemente de la proporción utilizada, pero la viabilidad de bacterias fue superior al emplear la proporción 9:1. Para ambas proporciones se demostró la tolerancia a la bilis de buey, pero la proporción 9:1 resultó más tolerante a la acidez. Se obtuvo una leche fermentada con un recuento de bacterias probióticas superior a 10⁸ UFC/mL, capaz de superar las pruebas de viabilidad *in vitro*.

Palabras clave: Leche de cabra fermentada, co-cultivo, probiótico.

ABSTRACT

The use of microorganisms in the production of dairy products is an ancient practice that is performed to produce the desired biochemical changes during the development and maturation of various dairy products. The aim of this study was to evaluate the viability and competitiveness of the probiotic *Lactobacillus paracasei* bacteria in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (BAL culture) at different inoculum concentrations on goat milk skim. Quality analysis were performed on milk, determining its density, percentage of total solids and solid fat, pH and titratable acidity as well as the initial microbiological quality by counting total coliform microorganisms, determination of *Escherichia coli* and yeast and mold count plates using petrifilm. Afterwards the milk was pasteurized at 85 ° C for 30 minutes, cooled to 40 ° C and inoculated with a mixed culture of *Lactobacillus paracasei* and BAL cultures in the ratio 9: 1 or 7: 1. The inoculated milk was incubated at 40 ° C and every 30 minutes the pH, titratable acidity, expressed in degrees Domic, and count of probiotic bacteria were measured, making the counting of the plates after 72 hours of incubation and all these results were used to determine the kinetic parameters of the fermentation. The *in vitro* viability was assessed by a test of resistance to acidity using pH values of 2 and 3 and a tolerance test to ox bile. The milk received complies with the parameters established for consumption. The pH decrease was independent of the ratio of the culture mixtures, with a value of 4.6 at the end of the fermentation process and a final acidity slightly higher when used the ratio 9: 1. Probiotic bacteria count was greater than 10⁸ CUF/mL independent of the ratio of bacteria used, but the viability of the bacteria was higher when the used ratio was 9: 1. For both culture ratio, tolerance to ox bile was demonstrated, but the culture ratio 9: 1 was more tolerant to acidity. A fermented milk with a count greater than 10⁸ CUF/mL probiotic bacteria capable of passing the tests of viability *in vitro* was obtained.

Keywords: Fermented goat milk, co-culture, probiotic.

INTRODUCCIÓN

Los efectos benéficos para la salud de las bacterias probióticas, principalmente pertenecientes al género *Lactobacillus*, han sido ampliamente demostradas. La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos así como formas naturales de suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos, han contribuido al concepto de microorganismos probióticos, los cuales no solo compiten y suprimen la fermentación indeseable en el intestino humano, sino que además producen un gran número de efectos benéficos para la salud del consumidor (Goldin, 1998; Nagpal, 2012; Kailasapathy, 2013), ya que actúan sobre el ecosistema intestinal, estimulando tanto los mecanismos inmunitarios de la mucosa como los mecanismos no inmunitarios, a través del anta-

gonismo y competencia con patógenos potenciales (Villanueva, 2015).

La microbiota intestinal puede ser mejorada empleando microorganismos probióticos, que deben sobrevivir en el producto durante su vida de anaquel y el tránsito por el tracto gastrointestinal, resistiendo la acidez estomacal y la degradación de las enzimas hidrolíticas y las sales biliares en el intestino delgado. Un producto con alegaciones de salud, debería poseer al menos 10⁶ UFC de microorganismos probióticos /mL para la fecha de expiración (Kailasapathy, 2013).

El consumo de los probióticos suministrados por derivados lácteos, es el enfoque más popular en la actualidad. La mayoría de estos productos se categorizan como alimentos funcionales y

representan una parte significativa del total de este tipo de alimentos (Tripathi & Giri, 2014). En particular, la leche de cabra fermentada constituye una alternativa saludable al consumo del yogur obtenido a partir de la leche de vaca (Montoro, 2015).

Lactobacillus sp., *Streptococcus* y *Bifidobacterium sp.* han sido los más estudiados y utilizados en los últimos años, aunque otros géneros y especies se han ido incorporando. Algunas evidencias indican que incluso microorganismos no viables pueden favorecer la salud, por ejemplo como anti diarreicos (Soccol et al, 2014), aunque se acepta comúnmente que, para su efecto benéfico, los probióticos deben conservar su viabilidad, pero existen muchos factores en los alimentos como su composición, el procesamiento, las sustancias antimicrobianas, métodos de almacenamiento, entre otros (Ribeiro et al, 2014), que pueden afectarla. La temperatura de fermentación es uno de los más importantes, ya que el valor favorable para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos probióticos está en el rango entre 37-43 °C (Korbekandi et al., 2011).

Es conocido que el consumo de bacterias probióticas favorece la integridad del epitelio intestinal por el reforzamiento de sus estructuras. Una de las especies más estudiadas por su habilidad para la protección del intestino ha sido el *Lactobacillus paracasei*, si bien existe relativamente poca información acerca de estudios donde se hayan evaluado directamente su funcionalidad como parte de un producto alimenticio (Chen et al., 2015).

Se presta atención al co-cultivo de microorganismos probióticos junto con los tradicionales. Por ejemplo, se ha trabajado en el co-cultivo de lactobacilos y estreptococos para incrementar el nivel de ácido fólico en leches fermentadas (Laiño et al 2014) y para incrementar el potencial anti fúngico del *L. paracasei* en leches fermentadas (Aunbjerg et al., 2015). Sin embargo, la velocidad de crecimiento del *L. paracasei* durante el proceso de fermentación de la leche es relativamente baja y por tanto consume mucho tiempo (Ma et al., 2015). El uso de fermentaciones con cepas mixtas, parece una forma adecuada de resolver este

problema, reduciendo el tiempo de fermentación sin afectar las características organolépticas del producto en la mayoría de los procesos (Laiño et al., 2014). No todas las bacterias probióticas se ven favorecidas por el co-cultivo. Por ejemplo, las bacterias *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, y *Bifidobacterium lactis* son inhibidas cuando se co-cultivan con *S. thermophilus*, probablemente debido a su rápida velocidad de acidificación, que conduce a un bajo nivel de cepas probióticas, al concluir la fermentación (Oliveira et al., 2009).

Existe una considerable interacción entre *S. thermophilus* y las cepas probióticas, tanto durante la fermentación como durante el almacenamiento refrigerado del producto. Tanto el contenido de ácidos orgánicos como los parámetros cinéticos de la fermentación se ven afectados por el cultivo iniciador empleado, pero los mejores resultados se obtienen cuando se emplea el *S. thermophilus*, puro o en co-cultivo. Al mismo tiempo, las características sensoriales de las leches obtenidas dependen de los microorganismos utilizados en el co-cultivo, lo que puede tener un efecto positivo o negativo sobre las características del producto (Casarotti et al., 2014). El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de la bacteria probiótica *L. paracasei* en cocultivo con *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (cultivo BAL) a diferentes concentraciones de inóculo en leche de cabra descremada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias Primas: Se utilizó leche descremada de cabras obtenidas mediante el cruce Anglo-nubian x Criolla, la cual provino de una finca comercial, ubicada en el cantón Chongón de la provincia Guayas, Ecuador. La leche se transportó refrigerada hasta la Facultad de Ingeniería Química, de la Universidad de Guayaquil, donde se analizaron: pH (método potenciométrico), densidad (lactodensímetro), acidez titulable (método Dornic), contenido de grasa (método Gerber), sólidos no grasos (por diferencia), sólidos totales (calculada según la fórmula de Richmond), y punto de congelación, según la Norma INEN 2623 de

leche pasteurizada de cabra. Se evaluaron cinco lotes de leche y las determinaciones se realizaron por triplicado. La leche fue pasteurizada a 85 °C por 30 minutos, para asegurar la eliminación de los microorganismos patógenos.

Fermentación: La leche pasteurizada fue enfriada a 40 ± 2 °C en cinco minutos. Alcanzada esa temperatura, la mitad de la leche fue inoculada en una proporción de 2% v/v con un cultivo iniciador consistente en un cultivo comercial de yogurt (YoFlex®) constituido por la simbiosis de *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* - *Streptococcus thermophilus* de CHR-HANSEN y la otra parte con 2% v/v de la cepa de cultivo ácido láctico mesófilo Nutrish® de *Lactobacillus Paracasei*, para luego proceder a realizar las mezclas usando dos proporciones (7:1 y 9:1) de *Lactobacillus paracasei*:cultivo comercial con el cultivo comercial de yogurt.

La leche fue fermentada hasta alcanzar un valor de pH de 4,6. Cada 30 minutos se determinaron los valores de pH y acidez y además se cuantificó la cantidad de lactobacilos presentes, para lo cual se sembraron diluciones de 10^5 a 10^7 utilizando agua de peptona como diluyente en proporción 1:9. Estas diluciones se colocaron en cajas Petri a las que se adicionaron 15-20 ml de agar MRS y después de homogenizadas y solidificadas las muestras, se aplicó una segunda capa de medio y se incubaron a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 72 h. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Con los resultados obtenidos se evaluaron los parámetros cinéticos de la fermentación. La máxima velocidad de acidificación (V_m), el tiempo (T_m) para alcanzar V_m y el tiempo total de fermentación para un pH 4,6 (T_e), se calcularon según la metodología propuesta por otros autores (Kristo, Biliaderis y Tzanetakis 2003), a partir de las curvas de pH vs tiempo. V_m , T_m y T_e se consideraron como los responsables de caracterizar la cinética del proceso.

Evaluación de la viabilidad de la bacteria probiótica *L. paracasei*: se emplearon las técnicas de tolerancia al ácido y de tolerancia a la bilis. Para la tolerancia al ácido se preparó cal-

do de cultivo MRS ajustado a pH 2 y 3 con una disolución de HCl al 1%, los cuales simulan las condiciones gástricas. Para cada pH a evaluar se tomaron 10 mL de este medio de cultivo en tubos Schott de 250 mL y se inocularon 100 microlitros de leche fermentada en cada tubo, incubados por 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se realizó la siembra de cada tubo en agar MRS y se evaluó el porcentaje de supervivencia de las bacterias, mediante el recuento en placa después de 48 h de incubación. Para determinar la tolerancia a la bilis, se preparó caldo BRILA, se colocaron 10 mL de este medio de cultivo en tubos Schott, se inocularon 100 microlitros de leche fermentada en cada tubo y se incubaron por 2 horas a 37 °C. Finalmente se sembró en tubo en agar MRS y se evaluó el porcentaje de supervivencia en cada medio, mediante el recuento en placa después de 48 h de incubación.

Análisis estadísticos: Para los valores de composición, se determinó media y desviación estándar y se comparó mediante análisis de varianza si existe diferencia entre las proporciones estudiadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Materias Primas: Las características de la leche de cabra descremada se muestran en la tabla 1.

La calidad microbiológica de la leche fue evaluada antes de su empleo, comprobando la ausencia de enterobacterias, *Salmonella* sp y *Listeria monocytogenes*. Una vez finalizada la pasteurización, se comprobó la ausencia de microorganismos coliformes. Tanto la leche cruda como pasteurizada, cumplen con los parámetros establecidos para su consumo según las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE INEN 0010, 2012).

Proceso de fermentación: La figura 1 muestra los resultados del crecimiento microbiano a partir de la inoculación de la leche con las mezclas de cultivos. Debido a que la inoculación se realizó con un alto nivel de inóculo, la fase de latencia es

Tabla 1. Resultados de los análisis físico-químicos realizados a la leche cruda.

PARÁMETRO	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DES. TÍP.
Densidad (g/mL)	5	1,0301	1,0393	1,035660	0,0037806
Grasa (%)	5	0,2500	0,3600	0,314000	0,0472229
Proteínas (%)	5	4,4700	5,5000	5,130000	0,4814561
Sólidos no grasos (%)	5	9,7400	10,9000	10,428000	0,5078582
Punto de congelación	5	0,508	0,599	0,5574	3,8952535
pH	5	6,31	6,57	6,45	0,1116542

corta en ambas proporciones, pero como es de esperar, el tiempo para alcanzar la fase logarítmica es menor cuando se utiliza mayor proporción del *Lactobacillus paracasei*, ya que la cantidad a inocular del cultivo comercial, fue constante. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros investigadores (De Souza et al., 2012), aunque estos utilizaron una cepa probiótica diferente y confirman los resultados de otros autores (Yilmaz-Ersan & Kurdal, 2014) quienes encontraron que el periodo de incubación es más corto al emplear el cultivo tradicional que cuando se utilizan otras bacterias probióticas. Independientemente de la proporción de cultivos empleada, al final de la fermentación se encuentran valores superiores a 10^8 UFC/ml cumpliendo lo establecido por las normas ecuatorianas (NTE INEN 2395:2011).

pH e incremento de acidez: Durante los primeros 90 minutos de fermentación, el incremento de pH es independiente de la relación de inóculo empleada y a partir de ahí se observa una mayor acidez en el proceso con mayor proporción del *L. paracasei*, confirmando lo señalado en la literatura por Ma et al. (2015), respecto a la menor velocidad de crecimiento de esta bacteria frente al cultivo tradicional.

El valor TVmax no fue afectado significativamente por la proporción empleada para los co-cultivos, lo que coincide con lo reportado anteriormente (Ma et al., 2015) quienes señalaron que la velocidad de crecimiento del *L. paracasei* durante la fermentación de la leche es relativamente baja y por tanto este parámetro está determinado principalmente por la rápida velocidad de acidificación del *S. thermophilus*. La velocidad máxima de acidificación (V_{max}) fue ligeramente mayor para la mayor proporción del *L. paracasei* y, una vez alcanzada la fase de máxima velocidad, el co-cultivo con mayor proporción del mismo demoró menos en alcanzar el pH final, indicando que hubo un crecimiento significativamente más alto de esta bacteria. En ambos casos, el descenso de pH fue similar, llegando al mismo valor final, solo que cuando se utiliza mayor proporción del *L. paracasei*, se acorta ligeramente el tiempo necesario para dar por terminado el proceso.

Evaluación de la viabilidad de la bacteria probiótica *L. paracasei*: La definición de probiótico exige el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos durante todo el periodo de vida útil del producto, ya que esto condicionará su

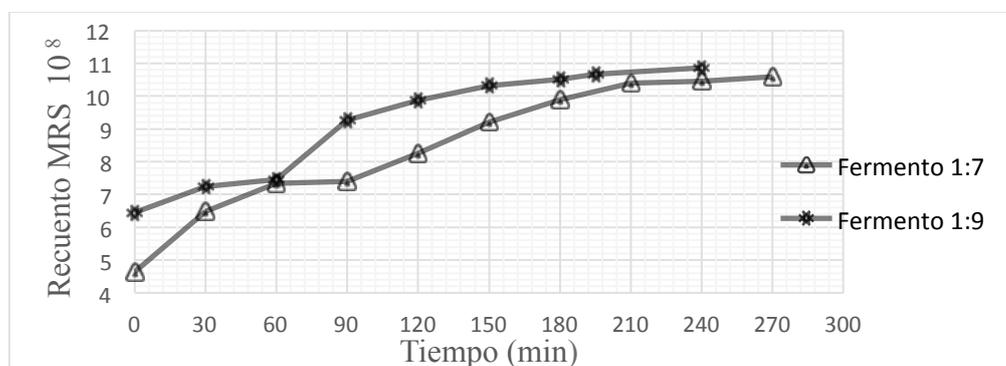


Figura 1. Influencia de la relación de cultivo probiótico/cultivo tradicional sobre la curva de crecimiento

Tabla 2. Resultados de los parámetros cinéticos estudiados.

PROPORCIÓN	VMAX (ΔPH/MIN)	TVMAX (MIN)	TPH5.0 (MIN)	TPH4.5B (MIN)
7:1	0.0068	90	161	220
9:1	0.0087	90	150	200

efectividad; si bien ciertas propiedades inmunológicas también se han atribuido a bacterias no viables. En general, se considera necesario que diariamente entre 10⁹ y 10¹⁰ organismos viables alcancen el intestino delgado. Por ello, se sugiere que estos productos mantengan unos valores de viables de 10⁶ -10⁷/mL (Sanz et al, 2003).

Mantener la viabilidad de las células probióticas hasta el tránsito por el tracto gastro-intestinal es importante para que alcancen el sitio de acción en número suficiente, ya que después del consumo del alimento funcional existe una considerable pérdida de viabilidad por el paso a través del bajo pH estomacal y la alta concentración de sales biliares en el intestino (Soccol et al., 2014), La tabla 3 muestra los resultados de la prueba de viabilidad *in vitro*.

Las pruebas *in vitro* mostraron que al emplear la proporción 9:1 las bacterias resultantes resisten ambos pH con un grado de sobrevivencia relativamente alto, mayor que el 60 % recomendado pero que para el producto elaborado con la proporción 7:1, no hay sobrevivencia a pH 2. Los resultados de la prueba realizada en tolerancia a bilis de buey, muestran un buen porcentaje de supervivencia de bacterias probióticas en las dos proporciones. La combinación de ambos resul-

tados nos indica que se debe emplear la mayor proporción si se quiere obtener un producto con valor funcional.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una leche fermentada con características probióticas, adecuada para el consumo por aquellas personas que padecen de intolerancia o alergias relacionadas con la leche de vaca.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aunbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., & Knøchel, S. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International journal of food microbiology*, 194, 46-53.

Casarotti, S. N., Monteiro, D. A., Moretti, M. M., & Penna, A. L. B. (2014). Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, 59, 67-75.

Chen, Y. P., Hsu, C. A., Hung, W. T., & Chen, M. J. (2015). Effects of *Lactobacillus paracasei* 01 fermented milk beverage on protection of intestinal epithelial cell *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

De Souza Oliveira, R. P., Perego, P., de Oliveira, M. N., & Converti, A. (2012). Effect of inulin

Tabla 3. Resultados de la prueba de viabilidad *in vitro*

PRUEBA IN VITRO	PH	PROPORCIÓN EMPLEADA	RECUENTO (UFC/ ML)		PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA
			Inicial	Final	
Resistencia a la acidez	3	7:1	5,2 x 10 ¹¹	1,8 x 10 ⁶	70,46
	2			0	0
	3	9:1	9,6 x 10 ¹¹	2,2 x 10 ⁶	69,62
Resistencia a las sales biliares	2			1,32x10 ⁴	34,39
	7:1		5,2 x 10 ¹¹	2,6 x10 ⁸	71,82
	9:1		9,6 x 10 ¹¹	1,4 x 10 ⁹	76,33

- on the growth and metabolism of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. *LWT-Food Science and Technology*, 47(2), 358-363.
- Goldin, B. (1998). Health benefits of probiotics. *The British journal of nutrition*, 80(4), S203-7.
- Kailasapathy, K. (2013). Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits-a review. *International Journal of Fermented Foods*, 2(1), 1.
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Tzanetakis, N. (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry*, 83(3), 437-446.
- Laiño, J. E., del Valle, M. J., de Giori, G. S., & LeBlanc, J. G. J. (2014). Applicability of a *Lactobacillus amylovorus* strain as co-culture for natural folate bio-enrichment of fermented milk. *International journal of food microbiology*, 191, 10-16.
- Ma, C., Ma, A., Gong, G., Liu, Z., Wu, Z., Guo, B., & Chen, Z. (2015). Cracking *Streptococcus thermophilus* to stimulate the growth of the probiotic *Lactobacillus casei* in co-culture. *International journal of food microbiology*, 210, 42-46.
- Montoro, M. M. (2015). Diseño y desarrollo de un derivado fermentado de leche de cabra como alimento funcional. Péptidos bioactivos (Doctoral dissertation, Universidad de Granada).
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334(1), 1-15.
- Oliveira, R. P. D. S., Perego, P., Converti, A., & De Oliveira, M. N. (2009). Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. *LWT-Food Science and Technology*, 42(5), 1015-1021.
- Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N., Grosso, C. R., & Gigante, M. L. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, 66, 424-431.
- Sanz, Y., Collado, M. C., & Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica española*, 61(9), 476-482.
- Socol, C. R., Prado, M. R. M., Garcia, L. M. B., Rodrigues, C., Medeiros, A. B. P., & Socol, V. T. (2014). Current developments in probiotics. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 2015.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9, 225-241.
- Villanueva-Flores, R. (2015). Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. *Ingeniería Industrial*, (33), 265-275.
- Yilmaz-Ersan, L., & Kurdal, E. (2014). The Production of Set-Type-Bio-Yoghurt with Commercial Probiotic Culture. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 402.

