

# CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA Y VIDA ÚTIL DE BEBIDAS PROBIÓTICAS FERMENTADAS A BASE DE LACTOSUERO

## Physicochemical and Microbiological Quality and Lifetime of Probiotic Fermented Beverages Based on Whey

Mónica Molero-Méndez <sup>1</sup>, Cateryna Aiello-Mazzarri <sup>2</sup>, José Araujo-Morillo<sup>3</sup> y Wilfido Briñez-Zambrano <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Física, Ciclo Básico, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. Teléfono: 0414-6426638. E-mail: mmolero@fing.luz.edu.ve. <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia. <sup>3</sup>Facultad Experimental de Ciencias. <sup>4</sup>Unidad de Investigación de Tecnología de Alimentos (UDICTA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

### RESUMEN

En los últimos años, la industria láctea ha venido realizando esfuerzos para darle utilidad al lactosuero (LS) que es generado de la fabricación del queso, el cual es un subproducto altamente nutritivo. Sin embargo, es un agente muy contaminante cuando es desechado al medio ambiente. Algunos de los productos que se han creado a partir del LS son bebidas refrescantes, bebidas fermentadas y alcohólicas, concentrados de proteínas, entre otros. Se evaluó la calidad físico-química y microbiológica de formulaciones de bebidas fermentadas a base de LS inoculadas con microorganismos probióticos, determinando su potencial nutritivo e inocuidad y estableciendo su tiempo de vida útil en refrigeración. Las bebidas se caracterizaron fisicoquímica y microbiológicamente determinando pH, acidez titulable, contenido de sólidos totales, grasas, cenizas, azúcares totales y reductores, recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales y fecales y *Staphylococcus aureus*. Se determinó el tiempo de vida útil en refrigeración a través del recuento de microorganismos probióticos en los días (d) 1, 7, 14 y 21 después de culminada la fermentación. Los resultados mostraron bebidas con excelente valor nutritivo y alto nivel de inocuidad, gracias a un recuento bajo de aerobios mesófilos y ausencia de coliformes totales, fecales y *S. aureus*. El tiempo de vida útil en refrigeración fue de 21 d para las dos formulaciones estudiadas.

**Palabras clave:** Lactosuero; bebidas fermentadas; microorganismos probióticos.

### ABSTRACT

In recent years, the dairy industry has been making efforts to find uses to whey (W), generated from cheese making, which it is highly nutritious product. However, turns out to be a pollutant when it is discarded into the environment. Some of the products elaborated from the W are soft drinks, alcoholic beverages and fermented, protein concentrates, among others. The main objective of this research was to conduct a physical-chemical and microbiological characterization of formulations of fermented beverages based on W inoculated with probiotic microorganisms, in order to determine their nutritional potential, ensure their safety and establish their lifetime refrigeration. Physicochemical and microbiological characterization was done by analyzing pH, titratable acidity total solids, ash, fat, protein, total and reducing sugars, aerobic mesophilic count, total and fecal coliforms and *Staphylococcus aureus*. The shelf life under refrigeration was determined by counting of probiotic microorganisms on days (d) 1, 7, 14 and 21 after culminated fermentation. The results showed beverages with excellent nutritional value, and high level of safety value, thanks to a low count of aerobic mesophilic bacteria and total absence of fecal coliforms and *S. aureus*. The shelf life under refrigeration was 21 d for the two formulations studied.

**Key words:** Whey; fermented beverages; probiotics microorganism.

## INTRODUCCIÓN

El lactosuero (LS) es un líquido fluido, de color verdoso amarillento, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido, con un contenido de nutrientes o extracto seco del 5,5 al 7% proveniente de la leche [16]. Retiene cerca del 55% del total de componentes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales [1].

En los últimos años, se han venido realizando esfuerzos para utilizar este subproducto de la fabricación del queso y evitar su disposición al medio ambiente, pues es un agente altamente contaminante, contribuyendo además a darle valor agregado al proceso. Entre los productos que se han creado a partir del LS se encuentran las bebidas refrescantes, bebidas fermentadas y alcohólicas, concentrados de proteínas, entre otros [13]. La utilización del LS y/o de sus componentes, para la elaboración de bebidas de alto valor nutritivo, constituye una importante solución para países que no poseen una desarrollada red de comercialización lechera [17].

En este trabajo se planteó como objetivo, la evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica de dos bebidas fermentadas formuladas a base de LS, inoculadas con microorganismos probióticos y saborizadas con esencia de coco (*cocos nucifera*). Esto con el fin de determinar el carácter nutricional de estas bebidas, mejorar su inocuidad y establecer el tiempo de vida útil de las mismas en anaquel, proporcionando así características importantes para los posibles consumidores de las mismas, y hacer de éstas opciones atractivas desde el punto de vista nutricional y microbiológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una evaluación de la calidad fisico-química y microbiológica de dos bebidas fermentadas a base del LS obtenido de la fabricación de queso fresco artesanal, cuyas características fisicoquímicas se presentan en la TABLA I. Las bebidas se prepararon con suero de leche con adición de sacarosa, leche en polvo y carboximetil celulosa (CMC) como estabilizante, inoculadas con microorganismos probióticos. La formulación 1 fue inoculada con un cultivo de *Lactobacillus acidophilus*, mientras que la formulación 2 fue inoculada con un cultivo mixto de *Lactobacillus acidophilus* y un cultivo comercial para yogurt que contiene compuesto por *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (laboratorio Codex-Ing, EUA).

Ambas bebidas fueron saborizadas con esencia de coco y 4% de sacarosa después de la fermentación.

**TABLA I**  
**CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL LACTOSUERO**

Parámetro	Valor promedio
pH	6,50 ± 0,01
Acidez titulable (mL NaOH 1N/100 l)	15,0 ± 0,00
Sólidos totales (%p/v)	7,25 ± 0,09
Grasa (%p/v)	0,50 ± 0,00
Proteína (%p/v)	1,00 ± 0,00
Lactosa y minerales (%p/v)	5,75 ± 0,00

Nota: Valores promedio ± 1 desviación estándar

### Caracterización fisicoquímica

Se analizaron muestras de cada bebida, determinando pH por la Norma COVENIN 1315-79 [7], acidez titulable por la Norma COVENIN 658-1997 [6], sólidos totales por la Norma COVENIN 932-1997 [13], cenizas por la Norma COVENIN 368-1997 [12], grasas por el método de Gerber indicado en la Norma COVENIN 1053-82 [9], proteínas por el método de Kjeldahl para proteínas de leche y sus derivados de la Norma COVENIN 370:1997 [8], azúcares totales por el método de Dubois y col. [14], azúcares reductores por el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico propuesto por Miller [16]. El valor energético se calculó utilizando los factores indicados en la Tabla de Composición de Alimentos de Venezuela del Capítulo Venezolano de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición [19]. Se multiplicó por un factor de 4 el contenido de proteína y el contenido de carbohidratos, por 9 el contenido de grasa. La sumatoria de los aportes obtenidos por cada fracción indicó las cal/g de cada bebida. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Caracterización microbiológica

Las muestras de las dos bebidas se caracterizaron microbiológicamente determinando: a) Número más probable (NPM) de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*, b) Presencia de *Staphylococcus aureus* y c) Recuento de Aerobios mesófilos (RAM) siguiendo los procedimientos establecidos en las Normas Venezolanas COVENIN 1104-1996 [10], 1292-04 [11] y 902-87 [4], respectivamente.

### Viabilidad de la bebida durante la conservación

Para la determinación de la vida útil de las bebidas se realizó el recuento de microorganismos probióticos durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración (Canaima®, Venezuela) (4-6°C) siguiendo la metodología indicada en la Norma COVENIN 902-87 [4]. Los días (d) de evaluación fueron 1; 7; 14 y 21 d después de finalizada la fermentación. Los valores obtenidos se compararon con lo establecido en la Norma COVENIN 2393-2001 para el yogurt [5] y en la Norma CODEX 243-2003 para Leches

fermentadas [2], las cuales indican que valor mínimo requerido para que las bebidas sean consideradas probióticas es de  $10^6$  UFC/mL, durante todo el tiempo de vida útil en anaquel. También se realizó determinación de pH y acidez titulable.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización físico-química

En la TABLA II se muestran los resultados de la caracterización físicoquímica de las dos bebidas fermentadas analizadas. Los valores de pH fueron menores al valor inicial antes de la fermentación (6,5) y muy cercanos para las dos bebidas, 5,00 para la Formulación 1 y de 4,85 para la Formulación 2. El valor bajo de pH es un indicativo de que se desarrolló el proceso de fermentación, es una medida indirecta del crecimiento microbiano. Esto se refleja en un incremento en la acidez titulable en comparación con el valor obtenido antes de la fermentación (15 mL NaOH 0,1 N/100mL), encontrándose valores de 68 mL NaOH 0,1 N/100 mL y de 70 mL NaOH 0,1 N/100 mL, que corresponden a 0,61 y 0,63% de ácido láctico para la Formulación 1 y 2, respectivamente.

**TABLA II**  
**CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE**  
**LAS BEBIDAS FERMENTADAS**

Parámetro	Formulación 1	Formulación 2
pH	5,0 ± 0,00	4,85 ± --
Acidez titulable (mL NaOH 0,1N/100 mL)	68 ± 1,4	70 ± 1,2
Sólidos totales (%p/v)	12,4 ± 0,1	12,5 ± 0,2
Grasa (%p/v)	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Proteína (%p/v)	1 ± 0,1	1 ± 0,1
Ceniza (%p/v)	0,55 ± 0,02	0,6 ± 0,02
Azúcares totales (%p/v)	10,0 ± 0,2	10,2 ± 0,25
Azúcares reductores (lactosa, %p/v)	4,2 ± 0,15	3,9 ± 0,2
Valor energético (Kcal por 100 g de muestra)	87,2 ± --	87,1 ± --

Nota: Valores promedio ± 1 desviación estándar

El porcentaje de sólidos totales (ST) determinado para ambas bebidas fermentadas es el esperado, 12,4 y 12,5% para la Formulación 1 y 2, respectivamente, dada la adición de sacarosa y leche en polvo al LS con el objeto de conseguir un porcentaje de ST similar al de la leche (12% aproximadamente) y lograr una consistencia atractiva desde el punto de vista organoléptico. De esos ST el 0,8% para la primera formulación y 0,7% para la segunda, corresponden a la grasa. Estos valores son superiores

al contenido de grasa del LS sin fermentar (0,5%), lo cual es debido a la adición de leche en polvo que contiene un porcentaje de grasa adicional. El contenido de proteína no se ve afectado por el proceso de fermentación, obteniéndose para ambas bebidas el mismo valor de 1%, determinado antes de la fermentación. Las proteínas del LS se consideran de alta calidad nutricional y valor biológico.

El contenido de azúcares en las bebidas fermentadas es información relevante para el consumidor que busca características nutricionales específicas de los alimentos, y más en aquellos que se promocionan como saludables. El contenido de azúcares totales fue similar para las dos bebidas, 10% para la Formulación 1 y 10,2% para la Formulación 2. La determinación del contenido de azúcares reductores es una medida indirecta del progreso de la fermentación. La lactosa es el principal sustrato para el crecimiento microbiano; su valor debe ser menor en el LS fermentado que en el LS sin fermentar, pues es consumida por los microorganismos durante el proceso. Los valores de 4,2 y 3,9% de azúcares reductores, expresados como lactosa, encontrados para la Formulación 1 y 2, respectivamente, son menores en comparación con el valor de 5,75% de lactosa y minerales del LS sin fermentar (TABLA I). Estos resultados le confieren a las bebidas un atractivo nutricional para los consumidores parcialmente intolerantes a la lactosa, pues la misma se ve disminuida en más de un 20% aproximadamente después del proceso de fermentación para ambas formulaciones. El valor energético de las bebidas fue similar, con valores de 87,2 y 87,1 calorías/100 g para las Formulaciones 1 y 2, respectivamente, dándoles es un atractivo nutricional, pues son formulaciones de bajo aporte calórico.

### Caracterización microbiológica

Los valores obtenidos del recuento de aerobios mesófilos determinado para ambas bebidas fermentadas fueron cercanos, de  $35 \times 10^1$  UFC/mL y de  $38 \times 10^1$  UFC/mL para la Formulación 1 y 2, respectivamente. Estos resultados son un indicativo de inocuidad de las bebidas fermentadas y el bajo valor encontrado para ambas bebidas podría sugerir que el único crecimiento microbiano es el relacionado con los cultivos probióticos inoculados. En la prueba de coliformes totales realizada no se observó turbidez, ni presencia de gas en ninguno de los tubos inoculados en caldo bilis verde brillante, evidenciando con esto la ausencia de coliformes. De acuerdo a la norma venezolana COVENIN 1104-1996 [10] cuando hay ausencia de turbidez en las tres diluciones, el contenido de coliformes es inferior a 3 NMP/mL. Este resultado se encontró para las dos formulaciones estudiadas, por lo que no se continuó con los ensayos que contempla la mencionada norma para la detección de coliformes fecales y *Escherichia coli*. En la prueba de detección de *Staphylococcus aureus*, las placas de Petri con agar Baird Parker inoculadas en superficie con las muestras de cada bebida, al cabo de 24 horas, estuvieron carentes de crecimiento microbiano, sin presencia de colonias de éste con las características indicadas para este microorganismo. De acuerdo a lo indicado en la Norma COVENIN 1292-04 [11], la

presencia de *S. aureus* se confirma por la aparición de colonias circulares, suaves, húmedas y convexas con un diámetro entre 2-3 mm, de color gris oscuro o negras brillantes. Estos resultados indican que las dos bebidas fermentadas obtenidas poseen alta calidad microbiológica.

#### Viabilidad de las bebidas durante la conservación

En la TABLA III se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados a las bebidas fermentadas durante los 21 d de conservación bajo refrigeración entre 4 y 6°C. Se observa que tanto el pH como la acidez titulable de la bebida preparada con la Formulación 1, mantienen su valor inicial de 5,00 y 68 mL NaOH 0,1 N/ 100 mL, respectivamente, durante los 21 d de almacenamiento bajo refrigeración. Estos

resultados concuerdan con el hecho de que el contenido de microorganismos probióticos, *Lactobacillus acidophilus*, en este caso, se mantiene en el orden de  $10^6$  UFC/mL variando 38 a  $28 \times 10^6$  UFC/mL entre el d 1 y el 21 de la conservación de la bebida. Este microorganismo es mesófilo, de forma que al almacenar la bebida a 4 y 6°C, la temperatura estaría muy por debajo de su temperatura óptima de crecimiento, haciendo que la fermentación se vuelva muy lenta y por ende muy pocos cambios en el contenido de probióticos, el pH y la acidez titulable. Resultados similares se encontraron para la bebida preparada con la Formulación 2. Tanto el pH como la acidez titulable se mantienen en 4,85 y 72 mL NaOH 0,1 N/ 100 mL, durante el tiempo de almacenamiento. El contenido de microorganismos probióticos varió de  $39 \times 10^7$  UFC/mL en el día 1 a  $31 \times 10^7$  UFC/mL en el d 21.

**TABLA III**  
**PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS MONITOREADOS DURANTE LA CONSERVACIÓN DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS**

Día	1		7		14		21	
Formulación	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
pH	5,05	4,85	5,05	4,82	5,00	4,77	5,00	4,77
Acidez titulable (mL NaOH 0,1 N /100 mL)	68	72	68	72	70	73	70	73
Contenido de Probióticos (UFC/mL)	$38 \times 10^6$	$39 \times 10^7$	$35 \times 10^6$	$39 \times 10^7$	$28 \times 10^6$	$31 \times 10^7$	$28 \times 10^6$	$31 \times 10^7$

Nota: Valores promedio  $\pm$  1 desviación estándar

Al mantenerse estable el contenido de probióticos, en  $10^6$  y  $10^7$  UFC/mL, para la Formulación 1 y 2, respectivamente, durante los 21 d de conservación, las bebidas conservan su carácter probiótico durante todo el tiempo de vida útil en anaquel, cumpliendo con lo requerido tanto por Norma venezolana COVENIN 2394-2001 para yogurt [5] como por la Norma internacional CODEX 243-2003 para leches fermentadas [2]. Es importante resaltar que entre mayor sea el exponente del crecimiento microbiano, mayor es el beneficio desde el punto de vista probiótico [2].

Los valores constantes de pH, 5,00 para la Formulación 1 y 4,85 para la Formulación 2, durante los 21 d de conservación, hace que sean bebidas palatables, sensorialmente agradables hasta el último d de vida útil, pues el consumidor experimentará en el d 21 una acidez idéntica a la del d 1.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por otros investigadores. Sepúlveda y col. [18], quienes evaluaron las características fisicoquímicas durante el almacenamiento de una bebida fermentada preparada a base de LS con adición de pulpa de Maracuyá, encontrando que tanto el recuento de probióticos como el pH se mantenían durante el almacenamiento, indicando un tiempo en anaquel de 21 d. Córdor y col. [3] evaluaron una bebida preparada a base de LS utilizando células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus* durante el almacenamiento, indicando que la bebida era microbiológicamente aceptable,

con un perfil de acidez y pH que se mantuvo hasta el quinto mes de evaluación, tanto a temperatura ambiente (22°C) como bajo refrigeración (4°C). Hernández y col. [15] evaluaron una bebida a base de LS inoculada con *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium bifidum*, encontrando que la bebida cumplía el criterio de alimentos probióticos de forma aceptable, luego del almacenamiento a 4°C durante 30 d.

#### CONCLUSIONES

Las bebidas fermentadas evaluadas poseen características físico-químicas tales que resultan atractivas desde el punto de vista nutricional. Ambas bebidas presentaron ausencia de coliformes y muy baja presencia de microorganismos aerobios mesófilos, mostrando una aceptable calidad microbiológica. La vida útil bajo refrigeración para las dos bebidas fue de 21 d, con un contenido de microorganismos probióticos superior a  $10^6$  UFC/mL, cumpliendo con lo requerido a nivel nacional e internacional para alimentos con carácter probiótico.

### AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, específicamente al laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche por permitir la realización de los ensayos pertinentes a esta investigación. También al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico CONDES por el apoyo y financiamiento parcial a través del Proyecto CC-0640-13.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. **Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.** 10(3): 334-341. 2009.
- [2] ALIMENTARIUS CODEX. Standard for Fermented Milks 243–2003. Food and Agriculture Organization, Rome. 2003.
- [3] CÓNDROR, R.; MEZA, V.; LUDEÑA, F. Obtención de una bebida fermentada a partir de suero de queso utilizando células inmovilizadas de *Kluyveromyces marxianus*. **Rev. Peruana Biol.** 7(2): 124-133. 2000.
- [4] COVENIN 902-87. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Recuento de aerobios mesófilos en placas de Petri, Pp 4-5. 1987.
- [5] COVENIN 2393-2001. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Yogurt. Pp 1-7. 1987.
- [6] COVENIN 658-1997. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Determinación de Acidez Titulable para Leche y sus derivados, Pp 1-2. 1997.
- [7] COVENIN 1315-79. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Determinación de pH, Pp 5-6. 1979.
- [8] COVENIN 370:1997. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Determinación de Proteínas para Leche y sus Derivados, Pp 3-5. 1997.
- [9] COVENIN 1053-82. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Determinación de Grasa por el Método de Gerber, Pp 10-12. 1982.
- [10] COVENIN 1104-96. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli*. Pp 1-7. 1996.
- [11] COVENIN 1292-04. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Aislamiento e Identificación de *Staphylococcus aureus* en Alimentos. Pp 1-5. 2004.
- [12] COVENIN 368-97. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Determinación de cenizas para leche y sus derivados. Pp 1-5. 1982.
- [13] COVENIN 932-1997. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Leche y sus Derivados. Determinación de sólidos totales. Pp 1-3. 1997.
- [14] DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analit. Chem.** 28(3): 350-356. 1956.
- [15] HERNANDEZ-MENDOZA, A.; ROBLES, V.; ANGULO, J.; DE LA CRUZ, J.; GARCIA, H. Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. **Food Technol. and Biotechnol.** 45(1): 27-31. 2007.
- [16] MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analit. Chem.** 31(3): 426-428. 1959.
- [17] PARRA, R. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. **Rev. Fac. Nac. Agron.** Medellín. 62(1): 4967-4982. 2009.
- [18] SEPÚLVEDA, J.; FLÓREZ, L.; PEÑA, C. Utilización de Lactosuero de queso fresco en la elaboración de una bebida fermentada con adición de pulpa de Maracuyá (*Passiflora edulis*) variedad púrpura y Carboximetil celulosa (CMC), enriquecida con vitaminas A y D. **Rev. Fac. Nac. Agron.** Medellín. 5(2): 1633-1674. 2002.
- [19] CAPÍTULO ZULIANO SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICIÓN. Tabla de Composición de alimentos de Venezuela. Pp 1. 2001.