

FORMULACIÓN DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA FERMENTADA A BASE DE LACTOSUERO

Formulation of a Probiotic Fermented Beverage Based on Whey

Mónica Molero-Méndez ¹, Gustavo Castro-Albornoz ² y Wilfido Briñez-Zambrano ³

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

RESUMEN

El lactosuero (LS) es definido como un líquido translúcido verde obtenido por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso. Sus características corresponden a 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%. Estadísticas indican que una importante porción de este residuo es desechado como efluente ocasionando un serio problema ambiental debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo. Por tal motivo, el objetivo central de esta investigación fue formular bebidas probióticas utilizando LS como sustrato, con el fin de aprovechar el valor nutritivo del mismo y contribuir a minimizar la contaminación ambiental que es generada cuando este subproducto es desechado a los afluentes. La materia prima empleada fue LS obtenido de la fabricación de queso artesanal mediante acción enzimática de cuajo en leche proveniente del municipio Jesús Enrique Losada del estado Zulia. Se ensayaron cuatro tratamientos, combinando dos tipos de estabilizante y dos tipos de cultivos microbianos, *Lactobacillus acidophilus* y un cultivo comercial para yogurt. Se determinó el carácter probiótico de las cuatro formulaciones mediante el recuento de microorganismos probióticos en placa. Para la interpretación estadística de los resultados se desarrolló un análisis de varianza de dos factores, el cual arrojó que sólo el tipo de cultivo microbiano afectó significativamente en el recuento final de microorganismos. Las formulaciones ensayadas con el cultivo de *L. acidophilus* tuvieron un recuento de 10^7 ufc/mL. Las formulaciones ensayadas con cultivo mixto de *L. acidophilus* más el cultivo comercial para yogurt tuvieron un recuento final de 10^8 UFC/mL. Las cuatro formulaciones cumplen con lo establecido en los estándares nacionales e internacionales exigidos para alimentos probióticos.

Palabras clave: Lactosuero; bebida fermentada; probiótico.

ABSTRACT

The whey (W) is a translucent green liquid obtained by removing the clot milk in cheese making. Its characteristics correspond to a flowing liquid, yellowish-green color, cloudy, fresh flavor, faintly sweet, acidic, containing nutrients or dry extract from 5.5 to 7%. Statistics indicate that a significant portion of this residue is discarded as effluent causing a serious environmental problem because physically and chemically affects the soil structure. The main objective of this research was to develop probiotic drinks using W as substrate, in order to take advantage of the nutritional value of it and help to minimize environmental pollution that is generated when it is discarded to the tributaries. The raw material used was W obtained from the manufacture of artisan cheese by enzymatic action of rennet milk from Jesús Enrique Losada Municipality in Zulia State. Four treatments were tested, by combining two types of stabilizer and two types of microbial cultures, *Lactobacillus acidophilus* and a commercial yoghurt culture. Probiotic character was determined by counting plate probiotic microorganisms. For statistical interpretation of results analysis of variance of two factors was developed, which showed that only the type of microbial culture influences the final count of microorganisms. The formulations made with *L. acidophilus* culture had a count of 10^7 cfu/mL. The formulations tested with *L. acidophilus* and a mixed culture of more commercial cultivation for yogurt had an end count of 10^8 cfu/mL. The four formulations are agreed in national and international standards for probiotic foods.

Key words: Whey; fermented beverage; probiotics.

INTRODUCCIÓN

El lactosuero (LS) es un líquido translúcido verde obtenido por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso [7, 8]. Sus características corresponden a un líquido fluido, de color verdoso amarillento, turbio, de sabor fresco, débilmente dulce, de carácter ácido, con un contenido de nutrientes o extracto seco provenientes de la leche, del 5,5 al 7% [14]. Retiene cerca del 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales [1].

Estadísticas indican que una importante porción de este residuo es desechado como efluente, ocasionando un serio problema ambiental debido a que afecta física y químicamente la estructura del suelo [14]. Lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas y cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar oxígeno disuelto [1].

Con objeto de disminuir la contaminación ambiental, se han realizado esfuerzos para promover la utilización de este subproducto. Entre los productos de mayor aceptación debido a sus bajos costos de producción, grado de calidad alimenticia y agradable sabor, se encuentran las bebidas refrescantes, bebidas fermentadas y alcohólicas, concentrados de proteínas, entre otros [9].

El objetivo principal consistió en desarrollar bebidas fermentadas a base de LS, inoculadas con bacterias ácido lácticas, que le otorgaran carácter probiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

El LS empleado como sustrato para la formulación de la bebida fermentada fue obtenido de la fabricación de queso blanco, mediante acción enzimática del cuajo en leche proveniente de la hacienda Santa María, ubicada en el sector Ambrosio, parroquia José Ramón Yépez del municipio Jesús Enrique Lossada del estado Zulia; en la TABLA I se muestran las características fisicoquímicas del LS empleado [12].

TABLA I
CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL LACTOSUERO

	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
pH	6,5	0,01
Acidez titulable (mL NaOH 0,1N/100 mL)	15	0,00
Sólidos totales (%p/v)	7,25	0,09
Grasa (%p/v)	0,5	0,00
Proteína (%p/v)	1,0	0,00
Lactosa y minerales (%p/v)	5,75	0,00

Estandarización y pasteurización del LS

El LS obtenido de la fabricación del queso se estandarizó, aumentando el porcentaje de sólidos totales para alcanzar una consistencia similar a la de la leche (aumento de la viscosidad), a través del uso de sacarosa, leche en polvo, Carboximetilcelulosa (CMC) y/o gelatina sin sabor (GSS) dependiendo del tratamiento. Adicionalmente se sometió a un proceso de pasteurización lenta, haciendo uso de un baño María (IKA-Works®, Inc. EUA) a 65°C, controlando la temperatura por 20 minutos. La pasteurización se realizó con el objeto de eliminar la carga microbiana patógena, inactivar las enzimas coagulantes y reducir la concentración de bacterias lácticas presentes, evitando la competencia de éstas con las bacterias inoculadas para la fermentación.

Análisis microbiológico LS pasteurizado

El LS estandarizado y pasteurizado se sometió a una prueba microbiológica, determinando el recuento de aerobios mesófilos (RAM), con el objeto de evaluar la efectividad de la pasteurización. Este se realizó de acuerdo a la metodología indicada en la norma COVENIN 902-87[4] para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Pietri, donde se determinó la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) presentes en la muestra. Para esto se prepararon diluciones sucesivas con agua peptonada (0,1 % p/v) en proporciones 1:9, sembrándose en agar estándar Plate Count Agar (Merck®) e incubando las placas a 37°C por 48 horas (h).

Cultivos iniciadores empleados

Se empleó un cultivo liofilizado comercial para yogur compuesto por los microorganismos probióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, y un cultivo comercial del microorganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus*.

Diseño experimental

Se realizaron cuatro combinaciones de tratamientos, ensayando con los dos cultivos y los dos estabilizantes, tal como se muestra en la TABLA II. El diseño corresponde a un arreglo bifactorial 2².

TABLA II
DISEÑO EXPERIMENTAL

Cultivomicrobiano Estabilizante	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + cultivo comercial para yogurt
CMC	Tratamiento 1	Tratamiento 2
GSS	Tratamiento 3	Tratamiento 4

ENSAYOS

formulación se muestra en la FIG. 1.

Un esquema general de los pasos que se siguieron para la

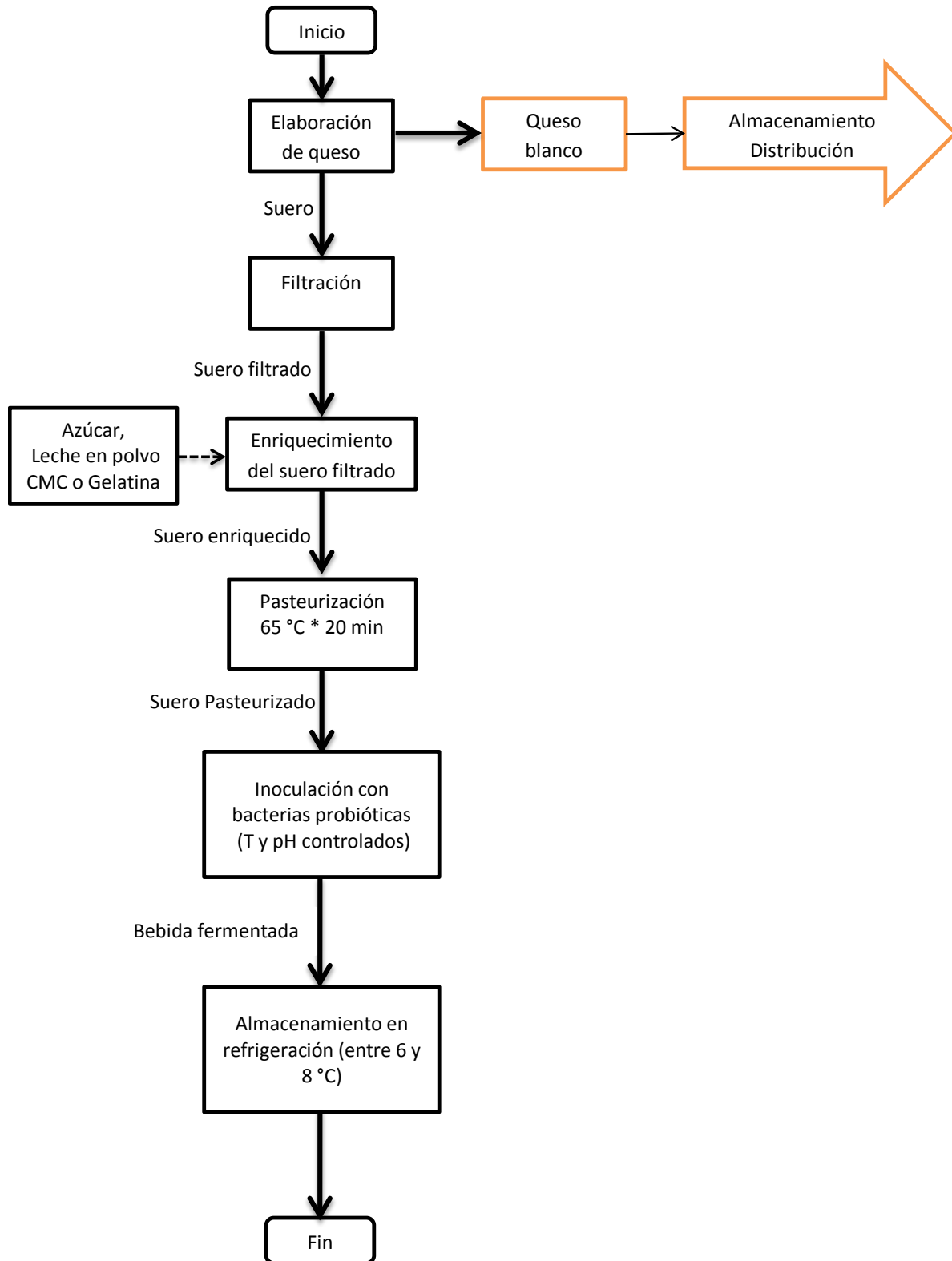


FIGURA 1. ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO DE FORMULACIÓN DE LA BEBIDA FERMENTADA

Determinación del carácter probiótico

El carácter probiótico se determinó como función del recuento de microorganismos probióticos en placa y la comparación de dicho recuento con lo establecido en la norma Venezolana COVENIN 2393-2001 [5] para yogurt y lo establecido en la Norma Internacional CODEX 243-2003 [2] para leches fermentadas.

Para el recuento en placa se siguió la metodología indicada en la norma COVENIN 902-87 [4] para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri, donde se determina la cantidad de UFC presentes en cada muestra. Para esto se prepararon diluciones sucesivas con agua peptonada (0,1 % p/v) en proporciones 1:9, sembrándose en agar MRS e incubando las placas a 37°C por 48 h.

Análisis estadístico

En cuanto a la evaluación físico-química del LS, se calcularon los valores promedios para las variables determinadas y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias entre lotes. Las diferencias se consideraron significativas a un valor $P < 0,05$. Para la interpretación estadística de los resultados referentes al carácter probiótico de las bebidas fermentadas, se realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA) completamente aleatorizado con un nivel de significancia de 5% ($\alpha = 0,05$). El paquete estadístico empleado fue el PASW Statistics 18 [13].

El modelo estadístico es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

(Diseño: intersección + cultivo + estabilizante + cultivo* estabilizante)

Y_{ij} : Variable respuesta: carácter probiótico.

μ : media general de la variable respuesta.

α_i : efectos del factor fila (cultivo microbiano).

β_j : efecto del factor columna (estabilizante).

$(\alpha\beta)_{ij}$: Interacción cultivo microbiano-estabilizante.

ϵ_{ij} : error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis microbiológico del lactosuero pasteurizado

El recuento de aerobios mesófilos determinado experimentalmente fue en promedio de 36×10^1 UFC/mL el cual es significativamente bajo, y garantizó excelentes condiciones microbiológicas para iniciar la fermentación. De esta forma se aseguró que no habría competencia microbiana durante el proceso de la fermentación.

Determinación del carácter probiótico

En la TABLA III se presenta el ANOVA de dos factores. De acuerdo a estos resultados, el factor que afecta el recuento de microorganismos probióticos es el tipo de cultivo empleado ($P = 0,00\%$); ni el estabilizante ($P = 38\%$) ni la interacción cultivo-estabilizante ($P = 67\%$) afectan esta característica ($\alpha = 5\%$).

En la TABLA IV se muestran los resultados promedio del tipo del recuento de microorganismos probióticos para cada uno de los tratamientos. Se observa cómo los tratamientos en los cuales se empleó el cultivo mixto compuesto por *L. acidophilus* y cultivo comercial para yogurt (tratamientos 2 y 4) obtuvieron un recuento mayor que aquellos en donde se empleó el cultivo de *L. acidophilus* (tratamientos 1 y 3).

El cultivo mixto compuesto por *L. acidophilus* y el cultivo comercial para yogurt, afecta positivamente el recuento final de microorganismos en las bebidas fermentadas, siendo una unidad logarítmica mayor que el recuento obtenido en las formulaciones con el cultivo de *L. acidophilus*. Mientras que la media del recuento microbiano en el cultivo mixto es de $4,7 \times 10^8$ UFC/mL, para el cultivo de *L. acidophilus* es de $4,9 \times 10^7$ UFC/mL.

TABLA III
ANOVA DE DOS FACTORES PARA LA DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PROBIÓTICO

Pruebas de los efectos inter-sujetos/ Variable dependiente: Probiótico

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	$3,54 \times 10^{17}$	3	$1,18 \times 10^{17}$	19,90	0,00
Intersección	$5,78 \times 10^{17}$	1	$5,78 \times 10^{17}$	97,27	0,00
cultivo	$3,48 \times 10^{17}$	1	$3,48 \times 10^{17}$	58,69	0,00
estabilizante	$4,96 \times 10^{15}$	1	$4,96 \times 10^{15}$	0,83	0,38
cultivo * estabilizante	$1,12 \times 10^{15}$	1	$1,12 \times 10^{15}$	0,18	0,67
Error	$4,75 \times 10^{16}$	8	$5,94 \times 10^{15}$		
Total	$9,80 \times 10^{17}$	12			
Total corregida	$4,02 \times 10^{17}$	11			

a. R cuadrado = ,882 (R cuadrado corregida = ,838)

TABLA IV
RECuento FINAL DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS POR TRATAMIENTO

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4
Recuento de microorganismos probióticos (UFC/mL)	3,8 x0 ⁷	4x10 ⁸	6x10 ⁷	5,4x10 ⁸

Nota: resultados promedio del análisis de las muestras por triplicado.

Esta diferencia a favor del cultivo mixto, pudiera ser debida a la sinergia que se produce gracias a la interacción coco-bacilo, generando un efecto benéfico en el crecimiento bacteriano, en la producción de ácido láctico y de compuestos aromáticos [14]. Estas bacterias son capaces de crecer por sí mismas en la leche y en sus derivados. Esta interacción indirecta y positiva se llama proto-cooperación. Cuando los cocos y los bacilos crecen en forma asociada, el tiempo de fermentación es menor y el crecimiento microbiano se incrementa. Las investigaciones recientes han demostrado [3] que el *Lactobacillus*. estimula el crecimiento del *Streptococcus* liberando aminoácidos de la caseína. El efecto estimulante de los aminoácidos conduce a que el *Streptococcus* crezca más rápido durante los periodos iniciales de incubación. En una etapa posterior, el *Streptococcus* se reduce debido al efecto adverso del ácido láctico, equiparando gradualmente la porción de *Lactobacillus*. Así, la producción del ácido en la primera etapa de incubación es producida por el *Streptococcus* y en una segunda etapa por el *Lactobacillus* [15].

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Hernández y col. [10], quienes determinaron el carácter probiótico de tres formulaciones de bebidas fermentadas a base de L, empleando *L. reuteri* y *Bifidobacterium bifidum*, consiguiendo un recuento superior a 10⁷ UFC/mL. Resultados similares fueron reportados por De Castro y col. [6], quienes determinaron el recuento final de microorganismos probióticos de bebidas preparadas a partir de LS, utilizando un cultivo de *L. acidophilus* y *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, encontrando un recuento de 10⁶ UFC/mL. Londoño y col. [11], realizaron un recuento de microorganismos probióticos a una bebida fermentada a base de L con adición de pulpa de Maracuyá (*Passiflora edulis*), utilizando como inóculo *L. casei* y cultivo de yogur, encontrando un recuento final de 10⁷ UFC/mL.

Las cuatro formulaciones evaluadas cumplen con los requisitos establecidos para bebidas probióticas en las normas COVENIN 2393-2001 para yogurt [5] (de un mínimo de microorganismos vivos de 10⁶UFC/mL) y por la Norma Internacional CODEX 243-2003 para Leches fermentadas [2] (de un mínimo de 10⁶UFC/mL).

CONCLUSIONES

Se estandarizó un proceso de formulación de las bebidas fermentadas, en el cual se evidenció que sólo el cultivo iniciador tuvo efecto sobre el recuento final de microorganismos, mientras

que el estabilizante y la interacción cultivo- estabilizante no afectan dicha característica. Los tratamientos ensayados mostraron un recuento superior a 10⁶ UFC/mL de microorganismos probióticos, observando un mayor valor en la bebida preparada con el tratamiento con cultivo mixto de *L. acidophilus* y el cultivo comercial para yogurt. Las cuatro formulaciones se consideraron probióticas, de acuerdo a lo establecido en la Norma venezolana COVENIN para yogurt 2393-2001 y la Norma Internacional CODEX 243-2003 para leches fermentadas.

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 otorgado (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. & Emerging Technol.** 10(3): 334-341. 2009.
- [2] ALIMENTARIUS, C. Standard for Fermented Milks 243-2003. Food and Agriculture Organization, Rome. 2003.
- [3] COURTIN, P.; RUL, F. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. **Le Lait**, 84(1-2): 125-134. 2004.
- [4] COVENIN 902-87. Alimentos. Método para Recuento de Colonias de Bacterias Aeróbicas en placa de Petri. (2da revisión). Comisión venezolana de normas industriales. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. Pp 4-5.1987.
- [5] COVENIN 2393-2001. Yogurt. (3era revisión). Comisión venezolana de normas industriales. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. Pp 4-10. 2001.
- [6] DE CASTRO, F.; CUNHA, T.; BARRETO, P.; AMBONI, R.; PRUDENCIO, E. Effect of oligofructose incorporation on the

- properties of fermented probiotic lactic beverages. **Intern. J. Dairy Technol.** 62(1): 68-74. 2009.
- [7] FOEGEDING, E.; LUCK, P. Whey protein products. 1957-1960. **Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition.** Academic Press, New York. Pp 235. 2002.
- [8] JELEN, P. Whey processing. Utilization and Products. **Encyclopedia of Dairy Sciences.** Academic Press. London, UK. Pp 2739-2745. 2003.
- [9] KOURKOUTAS, Y.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.; KANELLAKI, M.; BANAT, I.; MARCHANT, R. Continuous whey fermentation using kefir yeast immobilized on delignified cellulosic material. **J. Agricult. Food Chemistry.** 50(9): 2543-2547. 2002.
- [10] 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. Biotechnol.** 45(1): 27-31. 2007.
- [11] LONDOÑO, M.; SEPÚLVEDA, J.; HERNÁNDEZ, A.; PARRA, J. Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. **Rev. Fac. Nal. Agr.** Medellín. 61(1): 4409-4421. 2008.
- [12] MOLERO, M; CASTRO, G; BRIÑEZ, W. Evaluación fisicoquímica del Lactosuero obtenido de la producción de queso blanco aplicando un método artesanal. **Revista Científica, FCV-LUZ XXVII (3):** 149-153. 2017.
- [13] NORUSIS, M. Pasw Satatistics 18 Statistical Procedures Companion. Editorial Reviews. 2010.
- [14] PARRA-HUERTAS, R. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. **Rev. Fac. Nac. Agron.** Medellín. 62(1): 4967-4982. 2009.
- [15] VINDEROLA, C.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **J. Dairy Sci.** 85(4): 721-729. 2002.