

Artículo Original

Sobrevivencia del probiótico *L. Casei* en quesos untables¹

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez², Astrid Johana Gómez Ospina³,
Lina Marcela Arias Jaramillo⁴, Bibiana Tangarife Patiño⁴

Artículo recibido: 3 de marzo de 2015 / Artículo aceptado: 30 de noviembre de 2015

RESUMEN

Introducción. Dentro del grupo de alimentos funcionales están los probióticos, estos microorganismos tiene la habilidad de mejorar las condiciones intestinales, una vez se consumen en cantidades adecuadas. En la actualidad son pocos los alimentos que contienen probióticos, pues el alimento vehículos de este deben cumplir condiciones prebióticas para su viabilidad. **Objetivo.** Determinar la sobrevivencia de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso untable. **Materiales y métodos.** El *Lactobacillus casei* fue aislado de leche fermentadas y caracterizado como probiótico por pruebas de desempeño frente a sales biliares 0,3% y pH 2,5. El *Lactobacillus casei* se adicionó a un queso crema a una concentración de 1×10^{12} UFC y a suero de leche como alimento control en la misma concentración, evaluando la sobrevivencia del probiótico durante 15 días, mediante conteos de UFC cada 5 días. **Resultados.** Los recuentos encontrados a los 15 días de evaluación fueron de 11×10^8 UFC en queso crema y $6,2 \times 10^9$ UFC en suero de leche; los resultados estadísticos no mostraron diferencias significativas entre ambos recuentos, lo cual sugiere que el queso crema ofrece una serie de ventajas como vehículo de microorganismos probióticos: el pH, mayor consistencia, contenido graso y capacidad tamponante, factores que favorecen la protección de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento. **Conclusión.** Las evaluaciones de los recuentos indican que el queso crema es un vehículo adecuado para la administración de microorganismos probióticos, pues permite la sobrevivencia de estos en la cantidad necesaria para producir los efectos benéficos a la salud de los consumidores.

1 Investigación financiada con recursos del Fondo de Fomento a la Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista.

2 MSc en Biotecnología, Bióloga, profesora de la Universidad Nacional, sede Medellín. lugutierrezramirez@gmail.com

3 Ingeniería de Alimentos. SENA

4 Estudiante de Ingeniería de Alimentos, Corporación Universitaria Lasallista.

Autor para correspondencia: lugutierrezramirez@gmail.com

Palabras clave: *L. Casei*, bacterias acidolácticas, queso untable, cepas probióticas.

Survival of the *L. Casei* probiotic in spreadable cheese

ABSTRACT

Introduction. Probiotics are included within the group known as functional food. These microorganisms have the ability to improve intestinal conditions, once they are eaten in adequate quantities. In current times not many food items contain probiotics, as the vehicle food for them must fulfill prebiotic conditions to be feasible. **Objective.** Determine the survival of a native probiotic strain of *Lactobacillus casei* in spreadable cheese. **Materials and methods.** *Lactobacillus casei* was isolated from fermented milks and characterized as a probiotic by means of performance tests in comparison to bile salts 0,3% and pH 2,5. *Lactobacillus casei* was added to a cream cheese at a 1×10^{12} UFC concentration and to milk whey as a control food in the same concentration, evaluating the probiotics' survival during 15 days by means of UFC counts every 5 days. **Results.** The counts found after 15 days of assessment were 11×10^8 UFC in cream cheese and $6,2 \times 10^9$ UFC in cheese whey. The statistics results did not have significant differences between both counts, thus suggesting that cream cheese has advantages as a vehicle for probiotic microorganisms: The pH, a thicker consistency, content of fat and buffering capacity, factors that favor the protection of the probiotic microorganisms during storage.

Conclusion. The assessment of the counts indicate that cream cheese is an adequate vehicle for probiotic microorganisms, as it allows their survival in a quantity enough to produce the beneficial effect they have on the consumers' health.

Keywords: *L. Casei*, lactic acid bacteria, spreadable cheese, probiotic strains.

Sobrevivência do probiótico *L. Casei* em queijos untáveis

RESUMO

Introdução. Dentro do grupo de alimentos funcionais estão os probióticos, estes microrganismos têm a habilidade de melhorar as condições intestinais, uma vez se consumem em quantidades adequadas. Na atualidade são poucos os alimentos que contêm probióticos, pois o alimento veículo deste devem cumprir condições prebióticas para sua viabilidade. **Objetivo.** Determinar a sobrevivência de uma cepa probiótica nativa do *Lactobacillus casei* em queijo untáveis. **Materiais e métodos.** O *Lactobacillus casei* foi isolado da leite fermentada e caracterizado como probiótico por provas de desempenho frente a sais biliares 0,3% e pH 2,5. O *Lactobacillus casei* se adicionou a um creme de queijo a uma concentração de 1×10^{12} UFC e o soro do leite como alimento controle na mesma concentração, avaliando a sobrevivência do probiótico durante 15 dias, mediante contagens de UFC cada 5 dias. **Resultados.** As contagens encontradas aos

15 dias de avaliação foram de 11X10⁸UFC no creme de queijo e 6,2X10⁹UFC no soro de leite; os resultados estatísticos não mostraram diferenças significativas entre ambas contagens, o qual sugere que o creme de queijo oferece uma série de vantagens como veículo de microrganismos probióticos: o pH, maior consistência, conteúdo de gordura e capacidade intermediário, fatores que favorecem a proteção dos microrganismos probióticos durante a armazenagem. **Conclusão.** As avaliações das contagens indicam que o creme de queijo é um veículo adequado para a administração de microrganismos probióticos, pois permite a sobrevivência destes na quantidade necessária para produzir os efeitos benéficos à saúde dos consumidores.

Palavras chave: *L. Casei*, bactérias ácido lácticas, queijo untáveis, linhagens probióticas.

■ INTRODUCCIÓN

Los prebióticos y probióticos se incluyen en el concepto de alimentos funcionales, que son aquellos alimentos que, además de destacarse por sus cualidades nutricionales, aportan beneficios adicionales para la salud¹.

Los prebióticos utilizados son bacterias que deben cumplir ciertas características entre las que se incluyen: ser habitante normal del intestino humano, no ser patógeno ni toxigénico, sobrevivir al medio ácido del estómago y al efecto de la sales biliares en el duodeno, tener capacidad de adhesión a células epiteliales, adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente, producir sustancias antimicrobianas y aumentar de modo positivo

las funciones inmunes y las actividades metabólicas^{2,3}.

Para que los microorganismos sean considerados probióticos deben cumplir con criterios que aseguren su funcionalidad una vez estén al interior del organismo, como lo son la resistencia a los ácidos estomacales y a las sales biliares del intestino⁴.

Entre los microorganismos probióticos utilizados en el consumo humano se encuentran las bacterias ácidolácticas (BAL) que comprenden lactobacilos y bifidobacterias, pero también se utilizan otras cepas bacterianas no patógenas, como *Streptococcus*, *Enterococcus* y levaduras no patógenas como *Saccharomyces boulardii*³.

Los alimentos prebióticos, son ingredientes no digeridos como inulina, derivados lácteos y fructooligosacáridos que benefician al huésped, estimulando el crecimiento o actividad de bacterias intestinales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*⁵.

Los simbióticos son productos que contienen pre y probióticos e implica sinergismo entre los dos, aumentando los beneficios en el huésped⁵.

Cuando los probióticos o prebióticos se incorporan en los alimentos como parte del proceso de elaboración o como aditivos, se generan los alimentos funcionales, entre los que se encuentran las leches fermentadas, el yogurt, los quesos, y jugos^{6,7}.

El queso crema con respecto a las leches fermentadas presenta una serie de ventajas como el poseer un pH que oscila entre 4,00 y 4,79, consistencia, contenido graso

y capacidad tamponante; los anteriores factores contribuyen a la protección de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento.

En Colombia los alimentos probióticos para humanos se han comercializado en las bebidas lácteas, y no se han encontrado registros de su incorporación en otros alimentos, como el queso crema. Con el objetivo de evaluar la viabilidad de una bacteria ácido láctica nativa con actividad probiótica en un queso crema durante 15 días, se realizó este estudio cuyos principales hallazgos son expuestos a continuación

■ MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista; las muestras de leches se obtuvieron directamente de las granjas de la Corporación.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas provenientes de leches fermentadas. La leche se dejó fermentar alrededor de 25 días antes de iniciar el aislamiento de bacterias ácido lácticas. Estas se aislaron en agar selectivo MRS (Man Rogosa y Sharpe) de Merck) Ref.1.106614, y se incubaron en condiciones anaeróbicas durante 48 horas a 37°C.

Las colonias aisladas en el medio MRS se caracterizaron morfológicamente por medio de la coloración de gram y de pruebas bioquímicas convencionales como reducción de azúcares y catalasa⁴. Las colonias que no se ajustaban a estos parámetros fueron descartadas.

Evaluación del poder probiótico de bacterias lácticas nativas

- **Estabilidad en el paso por el estómago:** como el pH del estómago humano es de 2,5 y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago son 90 minutos. Para evaluar la capacidad del microorganismo de sobrevivir en este medio se ajustó a pH de 2,5 con ácido acético, sometiendo la cepa aislada a esta acidez durante cuatro horas^{8,9}.

- **Resistencia a las sales biliares:** de la misma manera como se evaluó la resistencia del microorganismo a la acción del pH, se evaluó la resistencia a las sales biliares a una concentración de 0.3% durante cuatro horas⁸.

- **Viabilidad de la cepa en un alimento:** se inoculó 1×10^{12} UFC/mL en 250 gramos de queso crema recién preparado realizando recuento de UFC cada 5 días hasta el día 15. Para comparar los resultados se utilizó como control 250 mL de suero de leche esterilizado obtenido de las granjas de la Corporación, el cual se sometió a 121°C y 15 libras de presión/15 minutos, e inoculado con la misma cantidad de microorganismos.

- **Análisis estadístico:** a los datos obtenidos de los recuentos de UFC/mL de *Lactobacillus casei* realizados a los dos tratamientos, en tres repeticiones, se les aplicó la prueba t de diferencias entre medias, utilizando para su análisis el programa estadístico Statistic 4.0. Se asumió como hipótesis nula que no existían diferencias significativas en el Log de las UFC de los recuentos de *L.casei* en queso crema y en suero de leche como testigo.

RESULTADOS

Se aislaron alrededor de 10 colonias distintas de microorganismos de la leche fermentada, las colonias que no cumplieron con los parámetros de identificación fueron descartadas.

De las colonias de bacterias ácido lácticas aisladas, sólo una cumplió todos los parámetros

de identificación microscópica, bacilo corto, Gram (+), no formador de esporas, catalasa (-). En la caracterización bioquímica, su comportamiento frente a la reducción de azúcares fue muy similar a *Lactobacillus casei* reportado por el Manual del Bergey¹⁰, tal como se detalla en la Tabla 1. El microorganismo soportó las pruebas de pH y sales biliares, por lo tanto se consideró probiótico.

Table 1. Determinación del comportamiento bioquímico de *Lactobacillus casei*

Microorganismos	Temperaturas		Reducción de azúcares						Nh3arginina	Crecimiento en caldo 4 % NaCl
	15 °C	45 °C	Lactosa	Sucrosa	Sal	Manitol	Sorbitol	Xilosa		
<i>L. casei</i>	+	V	+/-	+/-	+	+	+	-	-	+

Los resultados observados en la tabla 2 muestran los promedios de los recuentos de *L.casei* obtenidos en tres repeticiones, tanto para queso crema como para suero de leche. Aunque no se encontró ningún efecto desfavorable del queso crema sobre la viabilidad del probiótico, se presentó en las dos muestras una disminución en los recuentos realizados en el tiempo; siendo probable que la refrigeración hubiera tenido consecuencias en su disminución.

En tabla 3 se observan los datos correspondientes a las medias y varianzas de la variable de UFC/mL transformada a LogUFC/mL de los datos obtenidos en queso crema y suero de leche. En la prueba de diferencias entre medias se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre de los dos tratamientos al compararse el valor t calculado con el valor t tabulado=2,77.

En la gráfica 1, se puede observar la comparación entre las medias de Log de las UFC para el queso crema con el Log de UFC para el suero estéril que sirvió como control positivo de crecimiento

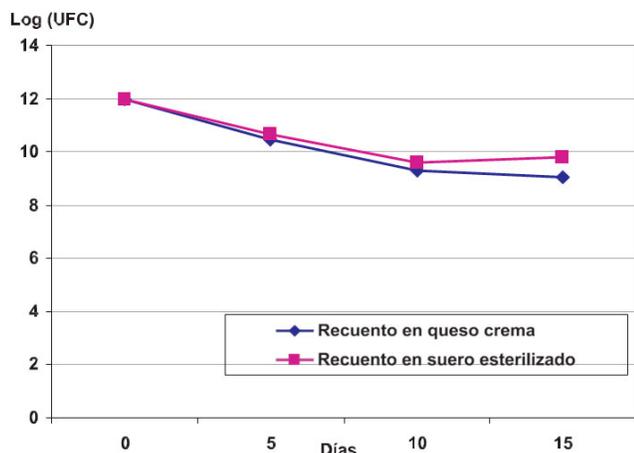
Table 2. Promedio de los recuento de *Lactobacillus casei* en queso crema y suero de leche

Tiempo en días	Recuento en queso crema	Recuento en suero esterilizado
0	1,0x10 ¹² ufc/ml	1,0x10 ¹² ufc/ml
5	3,0x10 ¹⁰ ufc/ml	4,5x10 ¹⁰ ufc/ml
10	2,0x10 ⁹ ufc/ml	4,0x10 ⁹ ufc/ml
15	11,0x10 ⁸ ufc/ml	6,2x10 ⁹ ufc/ml

Table 3. Pruebas de diferencias entre medias de LogUFC/mL en queso crema y suero de leche

Media queso	Media queso	Varianza queso	Varianza suero	valor t
10,55	10,98	0,48	0,28	-0,85
9,07	9,30	0,16	0,36	-0,55
9,35	9,80	9,80	0,01	-0,92

Gráfica 1. Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* en queso crema y suero esterilizado



de *Lactobacillus casei*, determinando en ambos casos, un comportamiento muy similar, pues no hubo diferencias significativas de las medias en los dos tratamientos. Ambos se iniciaron con un inóculo inicial de 1×10^{12} UFC/mL.

DISCUSIÓN

Lactobacillus casei es un bacilo microaerófilo, gram positivo, catalasa negativa. Este organismo forma ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares, por lo tanto se consideran microorganismos homofermentadores¹¹. Al evaluar la capacidad de reducción de azúcares en la investigación, se corroboró la incapacidad de utilizar la xilosa como fuente de energía, pues los homofermentadores no emplean la vía de las pentosas para su metabolismo como lo hacen las heterofermentadoras.

De acuerdo a los parámetros nutricionales de viabilidad de los probióticos en los alimentos, *Lactobacillus casei* cumplió con el requisito de viabilidad, los cuales deben ser mayores de 10^6 . En este estudio los recuentos obtenidos después

de los 15 días de almacenamiento fueron de 11×10^8 UFC/mL y 6.2×10^9 UFC/mL en queso crema y suero respectivamente. Aunque no se encontró ningún efecto desfavorable del queso crema sobre la viabilidad del probiótico, se presentó en las dos muestras una disminución en los recuentos realizados en el tiempo; siendo probable que la refrigeración hubiera tenido consecuencias en su disminución. Resultados similares fueron reportados por Jaskari, y colaboradores en 1998¹², quienes encontraron que los recuentos realizados de *Lactobacillus plantarum* disminuyeron en quesos refrigerados igual que en el control, pero aun así permanecía una cantidad viable.

Los análisis estadísticos confirman que el queso crema es un buen vehículo para la administración del probiótico, pues al comparar la media obtenida de Log UFC/mL con la de suero de leche no presentó diferencias estadísticas significativas. Estos resultados soportan los obtenidos por Kasimoglu¹³ y colaboradores, quienes reportaron que el queso es un buen vehículo para la viabilidad del probiótico y que presenta las mismas virtudes prebióticas que el yogurt.

Las propiedades sensoriales del queso crema con probióticos no fueron alteradas en los días de estudio, en investigaciones similares a ésta, quesos con probióticos en anaquel no presentaron cambios en sus propiedades organolépticas en sus 21 días de almacenamiento, mientras en los quesos sin probióticos hubo evidentes signos de alteración alrededor del día 17 en aroma y sabor, esto sugiere que los microorganismos generan bioconservantes naturales que dan un valor agregado al producto^{6, 14}.

El uso de alimentos con varias cepas de probióticos ha mostrado ser más eficiente que el de los productos de una sola especie, dado que se potencian los efectos benéficos a la salud y además se logran ventajas tecnológicas y organolépticas^{15, 16}.

Otros investigadores elaboraron quesos con contenidos similares, por ejemplo, Vinderola¹⁶ y colaboradores en el 2003 elaboraron un queso fresco con una mezcla *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con un contenido de 10⁸ UFC/g y, Kasimoglu¹³ y colaboradores en el 2004 elaboraron un queso blanco con *L. acidophilus* y encontraron que los microorganismos sobreviven en cantidades superiores a 10⁷ UFC/g.

CONCLUSIONES

El aislado nativo de *Lactobacillus casei* presentó actividad probiótica y se mantuvo viable en el queso crema durante las dos semanas de estudio.

Las evaluaciones de los recuentos indican que el queso crema es un vehículo adecuado para la administración de microorganismos probióticos, pues permite la sobrevivencia de estos en la cantidad necesaria para producir los efectos benéficos a la salud de los consumidores.

Se recomienda para futuros trabajos, no sólo utilizar derivados lácteos como agentes prebióticos, sino también bebidas de frutas y oligosacáridos.

REFERENCIAS

- MOLLET, B. and ROWLAND, I. Functional foods: at the frontier between food and pharma. In: Current in Opinion and Biotechnology. Vol. 13, No. 5 (oct. 2002); p. 483-485.
- YOUNG, R.J. and HUFFMANS, S. Probiotic use in children. In : Journal of Pediatric Health Care Vol. 17, No. 6 (2003); p. 277-283.
- DUNNE, Colum, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. In : The American journal of clinical nutrition. Vol. 73, No. 2 (2001); p. 386S-92S.
- SALAZAR ALZATE, Blanca Cecilia y MONTOYA C., Olga Inés. Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. En : Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica. Vol. 10, No. 2 (2003); p. 20-26.
- SCHREZENMEIR J. and DE VRESS, M. Probiotics, prebiotics and symbiotic-approach- ing a definition. American. Journal of Clinical Nu- trition. Vol. 73, No. 2 (Suppl. 2001); p. 361-364.
- GONZÁLEZ MARTINEZ, Blanca; SALAS, Zacarias J. y HEREDIA R., Laura. Efecto de microorganismos probioticos sobre el crecimiento de Salmonella enteritis. En: Ciencia UANL. Vol. 9, No. 4 (dic. 2006)
- FARNSWORTH, E.R. Probiotics and prebiotics. In: Handbook of Nutraceutical and functional foods. Vol. 25 (2001); p. 407-422.
- SMET, I De, et al. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. In: The Journal Applied of Bacteriology. Vol. 79, No. 3 (sep. 1995); p. 292-301.
- O'SULLIVAN, M.G., et al. Probiotic Bacteria: Myth Or Reality? In: Trends in Food Science & Tech- nology. Vol 31 (dec. 1992); p. 309-314.
- WILLIAMS AND WILKINS. Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology. 9 ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
- HUANG, M.K., et al. Effects Of Lactobacilli And An Acidophilic Fungus On The Production Perfor- mance And Immune Responses In

Broiler Chickens. In : Poultry Science. Vol. 83, No. 5 (2004); p. 788-795.

JASKARI, J.; KONTULA, P. and SIITONEN, A.. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. In : Applied Microbiology Biotechnology. Vol. 49 (1998); p.175-81.

KASIMOGLU, A.; GÖNCÜOGLU, M and AKGÜN, S. Probiotic white cheese with Lactobacillus acidophilus. In: International Dairy Journal. Vol. 14, No. 12 (2004)); p.1067-1073.

TIMMERMAN, H.M., et. al. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics a

comparison of functionality and efficacy. In: International Journal of Food Microbiology. Vol. 96, No. 3 (2004); p. 219-233.

HARGROVE, Alford Ja. Growth Rate And Feed Efficiency Of Rats Fed Yogurt And Other Fermented Milks. In: Journal of Dairy Science. Vol.61 (1978); p. 11-9.

VINDEROLA, C., et al. (2003). Bioqueso Ilolay Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. En: ILE: Industria Láctea Española. No. 298 (2003); p. 34-48.