

Viabilidad de Algunas Cepas de Probióticos en Condiciones Simuladas de Helado

¹A. Homayouni, ¹M.R. Ehsani, ²A. Azizi, ¹S.H. Razavi y ¹M.S. Yarmand

En resumen, el género *Lactobacillus* mostró mayor desarrollo e índice de supervivencia que la *Bifidobacteria* en presencia de sucrosa, oxígeno y tratamientos a bajas temperaturas.



Foto: Bonnie

Introducción

L *actobacillus* y *Bifidobacterium* son las especies de bacteria más comunes utilizadas como probióticos para la producción de productos lácteos fermentados (McFarland y Elmer, 2006). Varios estudios han demostrado que el valor terapéutico de las bacterias probióticas vivas es mayor que el de las células inviables (Owehand y Salminen, 1998). A pesar de que las investigaciones sobre el valor terapéutico de células probióticas muertas y sus metabolitos no son suficientes, la mayoría de los investigadores creen que la relación entre supervivencia de las bacterias probióticas y su valor terapéutico es muy importante (McFarland y Elmer, 2006). Se han realizado algunos estudios para evaluar la tolerancia de los probióticos contra pH bajos y bilis elevada así como condiciones del tracto intestinal. Se requieren más investigaciones para estudiar la supervivencia de probióticos durante el procesamiento y almacenamiento de productos relacionados. Las condiciones de los alimentos lácteos tales como tipo, presencia de aire y temperaturas bajas pueden afectar la viabilidad

de los probióticos. Se han estudiado los factores que afectan la supervivencia de probióticos en yogurt pero en otros productos lácteos como helado se requieren más estudios. La Federación Internacional de Lechería (IDF) sugiere que un mínimo de 10^7 células de probióticos por gramo de producto deben de sobrevivir al tiempo del consumo (Owehand y Salminen, 1998). A fin de que estas bacterias ejerzan sus efectos positivos en la salud, deben llegar a su sitio de acción vivas y establecerse en ciertos números (Sultana et al., 2000). Sin embargo, los estudios indican que los probióticos pueden no sobrevivir en la cantidad requerida cuando se incorporan a los productos lácteos (Kailasapathy y Rybka, 1997). Varios estudios también se han enfocado en la supervivencia de estas bacterias en productos lácteos bajo diferentes condiciones de producción y almacenamiento (Beal et al., 2001).

El método para aumentar la supervivencia de probióticos depende del tipo de alimento. La selección de cepas de probióticos resistentes para tolerar la producción, almacenamiento y condiciones del tracto gastrointestinal, es uno de los métodos más importantes. Otra manera es ajustar las condiciones de producción y almacenamiento para elevar los rangos de supervivencia. La protección física de probióticos por microencapsulación

es un método nuevo que aumenta la supervivencia de los probióticos (Wojitas et al., 2007). La adición de factores promotores de desarrollo o prebióticos, como almidón y oligosacáridos (Crittend et al., 2001), amortiguar las mezclas de yogurt con proteínas de suero (Rábula y Shah, 1998) y modular las condiciones de empaclado, han mejorado la supervivencia de las bacterias (Miller et al., 2003). En este estudio se investigó el desarrollo y supervivencia de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* como probióticos en helado.

Materiales y Métodos

Bacteria y Condiciones de Desarrollo

Se obtuvieron cepas puras de 4 cultivos de probióticos de CHR-Hansen (Dinamarca) y se activaron al inocularlos en caldo MRS (de Man-Rogasa-Sharpe) a 37°C por 24h. Para simular las condiciones del helado, se utilizó caldo MRS (Merck). El pH inicial del caldo MRS fue de 5.72 unidades.

Efecto de la sucrosa en la velocidad desarrollo

La cantidad base de bacterias probióticas en un medio de cultivo fue de 2 g L⁻¹.

¹Facultad de Ingeniería de Biosistemas, Campus de Agricultura y Recursos Naturales, Universidad de Tehrán, Tehrán, Irán

²Instituto Iraní de Investigación de Ingeniería Agrícola, Ministerio de Agricultura, Tehrán, Irán

Después de 24 horas de incubación a 37°C, se añadió una pequeña gota del medio inoculado al caldo MRS al que se le habían agregaron 10, 15, 20 y 25% de sucrosa en tubos de ensayo con 10 ml usando una jeringa de insulina estéril. Las muestras se agitaron en un agitador de tubos y se incubaron a 37°C por 24 h. Después de 24h se determinó la densidad óptica de todas las muestras con un espectrofotómetro (Novaspec II, Farmacia Biotech) a $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$.

Efecto del extractor de oxígeno en la velocidad de desarrollo

Las bacterias probióticas se añadieron a tubos de ensayo con 10 ml de caldo MRS el cual contenía 0.05% L-Cisteína y L-ascorbato. Las muestras se prepararon en dos series; la deaeración del primero grupo se realizó hirviendo el agua antes de la inoculación. El segundo grupo de muestras se añadió una pequeña gota de medio inoculado y se incubó a 37°C por 24h. Al día siguiente se determinó la densidad óptica de todas las muestras por espectrofotometría a $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$.

Efecto de bajas temperaturas en el índice de supervivencia

Las bacterias probióticas se añadieron a viales con 40 ml de caldo MRS. Los viales se incubaron a 37°C por 24 h. Las muestras se tomaron después de 24 h y se coloraron 4 y -20°C por 3 meses. Después de 1, 2 y 3 meses, se añadió bajo condiciones estériles, 1 ml de cada vial a tubos de ensayo con 10 ml de caldo MRS y se agitaron usando un agitador de tupos. Los tubos se incubaron a 37°C por 24 h. Al día siguiente se determinó la densidad óptica con un estrofotómetro a $\lambda_{\max} = 580 \text{ nm}$.

Análisis estadístico

Para el análisis de datos se utilizó un experimento factorial con diseño estadístico completamente randomizado (CRD). Los valores promedio y la desviación estándar se calcularon de los datos obtenidos con experi-




NUTRER
DVA GROUP
Just what you need

Especialista en aditivos para la industria de alimentos.









- **Grasas especializadas y aceites termoestables**
- **Proteínas de soya y lácteas**
- **Humos líquidos**
- **Conservadores**
- **Vitaminas y minerales**
- **Antioxidantes naturales y artificiales**
- **Edulcorantes**
- **Gomas, Hidrocoloides y Gelificantes**
- **Colorantes naturales**
- **Derivados Lácteos**
- **Funcionales y prebióticos**
- **Texturizantes**
- **Unidades para cárnicos**
- **Aquarresinas y oleorresinas**
- **Enzimas**
- **Sustituto de cocoa**
- **Acondicionadores y maduradores**
- **Acidulantes**



NUTRER, S.A. DE C.V.
Matriz
Calle 4 No.25-C
Fracc. Ind. Alce Blanco, 53370
Naucalpan, Estado de México
Tel.: 2122 0400 Fax: 5358 9420

Sucursal Monterrey
Av. Carlos Salinas de Gortari
No. 1020 Bodega 1040
Col. Apodaca Centro 66600
Apodaca, NL México
Tel. (0181) 83 86 65 75
Fax: (0181) 83 86 65 76

Sucursal Guadalajara
Volcán Vesubio No. 5387
Col. El Colli, Urbano, 45070
Zapopan, Jalisco
Tel.: (0133) 3125 5159
Fax: (0133) 3620 4232

Sucursal Bajío
Tel.: (045) 477 6702 139
Fax: (01 461) 617 50 91

ventasfood@nutrer.com.mx
www.nutrer.com
www.dva-group.com

Lada sin costo 01800 0000 382











































info@mundolacteoycarnico.com

Mayo/Junio 2009

Mundo Lácteo y Cárnico

29

mentos por triplicado. Estos datos se compararon con el método de Rango Múltiple de Duncan (SAS, 1996).

Resultados y discusión

La velocidad de desarrollo de bacterias probióticas en altas concentraciones de sucrosa

Debido a la importancia de la sucrosa a diferentes concentraciones en la formulación del helado, la supervivencia de cepas probióticas utilizadas en este producto pueden verse afectadas por la presión osmótica asociada con la sucrosa (Ziemer y Gibson, 1998; Medici et al., 2004). Cuatro cepas utilizadas en este estudio mostraron diferentes respuestas en concentraciones de sucrosa al 10, 15, 20 y 25% respectivamente. *Lactobacillus casei* (Lc01) mostró mayor velocidad de desarrollo en todas las concentraciones

(Tabla 1). El número de células viables de *Lactobacillus casei* a la máxima absorbancia (1,800) fue 1×10^{10} (cfu mL⁻¹).

En general, el género *Lactobacillus* muestra un mejor desarrollo que las *Bifidobacterias* a diferentes concentraciones de sucrosa. Se ha demostrado que azúcares reductoras como la maltosa puede incrementar la velocidad de desarrollo de *L. acidophilus*, *L. reuteri* (fermentum) y *L. plantarum* (Charalampopoulos et al., 2003). A pesar de que la sucrosa que no es un azúcar reductor, los resultados mostraron que puede aumentar la velocidad de desarrollo de *L. acidophilus* y *L. casei*. La resistencia a la presión osmótica de la sucrosa es un factor dependiente de la cepa. El número de células viables de *Lactobacillus casei* a una máxima absorbancia (1,800) fue de 1×10^{10} (cfu mL⁻¹). Las bacterias género

Lactobacillus poseen mejor resistencia que las *Bifidobacteria* a diferentes concentraciones de sucrosa. Esto fue en contraste con los resultados de Hekmat y McMahon (1992).

Efecto de los componentes de la eliminación de oxígeno en el desarrollo de bacterias

Durante la congelación de la mezcla de helados, el aire se incorpora en el producto final. Aproximadamente se incorpora en un 100%. Queda claro que el 21% (v/v) del aire es oxígeno. Por otro lado, las bacterias probióticas son microaerófilas para las bacterias anaeróbicas y el oxígeno molecular tiene un efecto tóxico sobre estas últimas. La aplicación de eliminadores de oxígeno como ácido L-ascórbico y L-cisteína en productos lácteos y su uso en material

Tabla 1. Cepas de Probióticos y su tolerancia a la presión osmótica, oxígeno y frío.

Parámetros		<i>Lactobacillus acidophilus</i> (La5)	<i>Lactobacillus casei</i> (Lc01)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> (Bb12)	<i>Bifidobacterium longum</i> (Bb46)
¹ Concentración de Sucrosa (%)					
10		0.561±0.018 ^{ns}	1.614±0.164 ^{ns}	0.383±0.091 ^{ns}	0.117±0.072 ^{ns}
15		0.569±0.057 ^{ns}	1.574±0.108 ^{ns}	0.260±0.126 ^{ns}	0.058±0.014 ^{ns}
20		0.635±0.037 ^{ns}	1.541±0.160 ^{ns}	0.204±0.037 ^{ns}	0.039±0.010 ^{ns}
25		0.687±0.014 ^{ns}	1.339±0.040*	0.178±0.017 ^{ns}	0.023±0.018 ^{ns}
¹ Componentes de la extracción de oxígeno					
0.05% Cisteína	(Aeróbico)	1.039±0.057 ^{ns}	1.495±0.056*	0.829±0.084*	0.005±0.003 ^{ns}
	(Anaeróbico)	1.013±0.049 ^{ns}	1.622±0.058*	0.675±0.014*	0.010±0.007 ^{ns}
0.05% Vit C	(Aeróbico)	1.063±0.015 ^{ns}	1.402±0.032*	0.396±0.036*	0.032±0.005 ^{ns}
	(Anaeróbico)	1.037±0.025 ^{ns}	1.483±0.057*	0.374±0.068*	0.016±0.002 ^{ns}
¹ Temperaturas					
4°C	1 mes	0.054±0.001 ^{ns}	1.379±0.056*	1.001±0.015*	0.012±0.012 ^{ns}
	2 meses	0.053±0.001 ^{ns}	1.060±0.011 ^{ns}	0.817±0.033*	0.040±0.011 ^{ns}
	3 meses	0.061±0.002 ^{ns}	1.060±0.057 ^{ns}	0.729±0.073*	0.040±0.011 ^{ns}
-20°C	1 mes	0.106±0.011*	1.155±0.003 ^{ns}	0.697±0.027 ^{ns}	0.011±0.010 ^{ns}
	2 meses	0.088±0.003*	1.145±0.004 ^{ns}	0.593±0.009 ^{ns}	0.000±0.000 ^{ns}
	3 meses	0.029±0.018*	1.151±0.001 ^{ns}	0.585±0.005*	0.000±0.000 ^{ns}
² Resistencia a la presión osmótica de sucrosa	Alto	Alto	Alto	Medio	Bajo
² Resistencia a oxígeno	Alto	Alto	Alto	Medio	Bajo
² Resistencia a bajas temperaturas	Bajo	Alto	Alto	Alto	Bajo

¹ Desarrollo promedio ± SD (O.D.₅₈₀ después de 24 h de incubación a 37°C, Resistencia a presión osmótica, Oxígeno y frío (comparado con O.D. ; alto >0.8, 0.8 > medio > 0.2, bajo < 0.2), ns, *representa las diferencias no significativas y significativas (p = 0.05) en la misma columna respectivamente de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Duncan

de empaque impermeable contra la permeabilidad del oxígeno puede reducir la cantidad de oxígeno en productos lácteos (Dave y Shah, 1997); Shah, 2000; Miller et al., 2003). El ácido ascórbico no tiene un efecto considerable en el pH de los productos lácteos pero disminuye el potencial de oxidación/reducción de los productos lo que los hace apropiados para la supervivencia de probióticos (Dave y Shah, 1997). También el peróxido de hidrógeno producido con bacterias ácido lácticas pueden disminuir el potencial de oxidación/reducción del producto al absorber el oxígeno molecular y cambiando el peróxido de hidrógeno a agua (Varnam y Sutherland, 1994). Además, L-cisteína puede usarse por las bacterias probióticas como un amino ácido esencial (Shah, 2000; Dave y Shah, 1998). Se recomienda el uso de 50 mg kg⁻¹ de L-cisteína en productos lácteos probióticos (Ishibashi y Shimamura, 1993; Dave y Shah, 1997).

El efecto de los componentes de la eliminación de oxígeno en la velocidad de desarrollo de bacterias probióticas es dependiente de la cepa. En la Tabla 1 se reportan los resultados en términos de velocidad de desarrollo de cuatro bac-

terias probióticas después de sembrar células frescas con 0.05% de L-cisteína y ácido L-ascórbico como componentes eliminadores de oxígeno. Una concentración de 0.05% de L-cisteína causa un aumento significativo ($p < 0.05$) de la velocidad de desarrollo de *L. casei*. El número de células de *Lactobacillus casei* a un máximo de absorbancia (1,200) fue de 2×10^8 (cfu mL⁻¹). Los resultados muestran que la adición de L-cisteína aumenta la producción de biomasa de *L. casei* mejor que el ácido L-ascórbico.

Índice de supervivencia de bacterias a bajas temperaturas

Los probióticos como aditivos de alimentos lácteos deben ser capaces de sobrevivir a bajas temperaturas de almacenamiento bajo refrigeración y congelamiento. Con el fin de investigar la adición de cepas de bacterias probióticas a alimentos de larga vida de anaquel, se estudió el efecto de bajas temperaturas (4 y -20°C) en el índice de supervivencia durante tres meses en caldo MRS. La Tabla 1 representa el efecto de bajas temperaturas (4 y 20°C) en el índice de supervivencia de cuatro bacterias probióticas después de

1, 2 y 3 meses. Los resultados mostraron que las temperaturas bajas tienen un efecto significativo ($p < 0.05$) en el índice de supervivencia de estas bacterias. Los resultados mostrados para *L. casei* tienen el índice máximo de supervivencia a -20°C después de tres meses de tratamiento. El número de las células viables de *Lactobacillus casei* a una máxima absorbancia (1,400) fue de 5×10^7 (cfu mL⁻¹).

En general, las *Bifidobacteria* mostraron más baja resistencia que el género *Lactobacillus* a bajas temperaturas como lo observaron Gómez y Malkata (1999).

Todos los factores de estrés investigados como concentraciones de sucrosa, oxígeno y bajas temperaturas son capaces de afectar el desarrollo y supervivencia de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum*. Este estudio ha demostrado que es posible seleccionar las cepas adecuadas de probióticos para usarlas en helado. En conclusión, una comparación con otras cepas de probióticos (Tabla 2) revelaron que el *Lactobacillus casei* (Lc01) y *Bifidobacterium bifidum* (Bb12) tienen la mayor resistencia a condiciones simuladas del helado, haciéndolas cepas de probióticos adecuadas para usarse en helados. En resumen, el género *Lactobacillus* mostró mayor desarrollo e índice de supervivencia que las *Bifidobacteria* en presencia de sucrosa, oxígeno y tratamientos a bajas temperaturas.

Fuente de la que extrajo la información:

Growth and Survival of some Probiotic Strains in Simulated Ice Cream Conditions. Journal of Applied Sciences (8). 379-382. 2008.

Traducción: I.A. Violeta Morales V.

Tabla 2. Respuesta microbiana para las condiciones ambientales en alimentos

Microorganismos	Resistencia a sucrosa	Resistencia a oxígeno	Resistencia a bajas Temperaturas
<i>Bifidobacterium bifidum</i> (Bb12) ^a	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Bifidobacterium infantis</i> (1912)	-	-	Resistente
<i>Bifidobacterium lactis</i> (BLC-1) ^b	-	Resistente	Resistente
<i>Bifidobacterium lactis</i> (DD920)	-	-	Resistente
<i>Bifidobacterium longum</i> (Bb46) ^a	Sensitivo	Sensitivo	Sensitivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (2401)	-	-	Resistente
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (DD910)	-	-	Resistente
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (La5) ^a	Resistente	Resistente	Sensitivo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (Lafti L10)	-	-	Resistente
<i>Lactobacillus casei</i> (Lc01) ^a	Resistente	Resistente	Resistente
<i>Lactobacillus johnsonii</i> (La1)	Resistente	-	Resistente
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. Paracasei (LCS1)	-	-	Resistente

^aLa resistencia al oxígeno se evaluó bajo condiciones simuladas del helado,

^bLa resistencia al oxígeno se evaluó bajo las condiciones del helado bajo en grasa