

# Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema\*

Luz Adriana Gutiérrez Ramírez<sup>1</sup> Astrid Johana Gómez Ospina<sup>2</sup>  
Lina Marcela Arias Jaramillo<sup>2</sup> Bibiana Tangarife Patiño<sup>2</sup>

Línea de investigación: Biotecnología Alimentaria. Grupo de Investigación GRIAL y Semillero INNOVA

Evaluation of the feasibility of a probiotic vine native of *Lactobacillus casei* in creamcheese

Avaliação da viabilidade de uma cepa pro-biótica nativa de *Lactobacillus casei* em requeijão

## Resumen

**Introducción.** Los probióticos son microorganismos vivos pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas que al ser ingeridos en cantidades adecuadas son capaces de alterar la microbiota del hospedero y producir efectos benéficos para la salud del consumidor. En Colombia los estarter bacterianos y probióticos de uso comercial han sido importados de otros países; es por esto que actualmente se han realizado estudios para su aislamiento, producción y utilización de cepas nativas de bacterias ácido lácticas en alimentos. **Objetivo.** Se evaluó la viabilidad de una bacteria ácido láctica nativa con actividad probiótica en un queso crema durante 15 días obteniendo resultados positivos de su permanencia en este alimento. **Materiales y métodos.** Se aisló y caracterizó un microorganismo con actividad probiótica como el *Lactobacillus casei* y se evaluó su viabilidad en queso crema. **Resultados.** El queso crema ofrece una serie de ventajas con respecto a las leches fermentadas como vehículo de microorganismos probióticos: el pH, mayor consistencia, contenido graso y capacidad tamponante, estos factores contribuyen a la protección de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento. **Conclusión.** Las evaluaciones sensoriales indican que la adición de los probióticos no alteró las propiedades organolépticas del alimento por lo que se considera que es un vehículo adecuado para la administración de microorganismos probióticos, permitiendo la sobrevivencia de éstos en la cantidad necesaria para producir efectos benéficos a la salud de los consumidores.

**Palabras clave:** Probióticos. Bacterias ácido lácticas. Queso crema. *Lactobacillus casei*.

## Abstract

**Introduction.** Probiotics are living micro organisms from the lactic acid bacteria group, that, eaten in the adequate quantities, are able to affect the biota of the host organism and produce beneficial effects for the health of the customers. In Colombia, the starter bacterial and probiotic of commercial use have been brought from abroad, that is why currently we have studies for its isolation, production and the use of native vines of acid lactic bacteria in food. **Objective.** The feasibility of native acid lactic bacteria with probiotic activity in a cream cheese during 15 days, obtaining positive results concerning its permanence in this product. **Materials and methods.** A microorganism with probiotic activity was isolated and characterized (*Lactobacillus casei*) and its feasibility in cream cheese was evaluated. **Results.** Cream cheese offers a number of advantages compared to fermented milks as a probiotic microorganisms carrier; Its pH, higher consistence, fat content and capacity as an acidity stabilizer, contribute to protect probiotic microorganisms during storage. **Conclusion.** Sensorial evaluations indicate that adding probiotics did not affect the organoleptic properties of the product, and therefore it is considered as an appropriate vehicle to administrate probiotic microorganisms, allowing them to survive in the necessary number to produce benefits for the health of the customers.

\* Investigación financiada con recursos del Fondo de Fomento a la Investigación de la Corporación Universitaria Lasallista

<sup>1</sup> MSc en Biotecnología, Bióloga, profesora de la Corporación Universitaria Lasallista/ <sup>2</sup> Estudiante de Ingeniería de Alimentos de la Corporación Universitaria Lasallista.

Correspondencia: Luz Adriana Gutiérrez Ramírez. e-mail: lugutierrez@lasallista.edu.co

Fecha de recibo: 22/09/2007; fecha de aprobación: 16/11/2007

**Key words:** Probiotics. Acid lactic bacteria. Cream-cheese. *Lactobacillus casei*.

## Resumo

**Introdução.** Os pro-bióticos são microorganismos vivos pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas que ao ser ingeridos em quantidades adequadas são capazes de alterar a micro-biota do hospedeiro e produzir efeitos benéficos para a saúde do consumidor. Na Colômbia os afoadores bacterianos e pro-bióticos de uso comercial foram importados de outros países; é por isto que atualmente se realizaram estudos para seu isolamento, produção e utilização de cepas nativas de bactérias ácido lácticas em alimentos. **Objetivo.** Avaliou-se a viabilidade de uma bactéria ácido láctica nativa com atividade pro-biótica num requeijão durante 15 dias obtendo resultados positivos de sua permanência neste ali-

mento. **Materiais e métodos.** Isolou-se e caracterizou um microorganismo com atividade pro-biótica como o *Lactobacillus casei* e se avaliou sua viabilidade no requeijão. **Resultados.** O requeijão oferece uma série de vantagens com respeito aos leites fermentados como veículo de microorganismos pro-bióticos: o pH, maior consistência, conteúdo gorduroso e capacidade de tapar, estes fatores contribuem à proteção dos microorganismos pro-bióticos durante o armazenamento. **Conclusão.** As avaliações sensoriais indicam que a adição dos pro-bióticos não alterou as propriedades organolépticas do alimento pelo que se considera que é um veículo adequado para a administração de microorganismos pro-bióticos, permitindo a sobrevivência destes na quantidade necessária para produzir efeitos benéficos à saúde dos consumidores.

**Palavras chaves:** Pro-bióticos. Bactérias ácidas lácticas. Requeijão. *Lactobacillus casei*.

---

## 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 salud<sup>1</sup>.

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<sup>2,3</sup>.

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 intestino<sup>4</sup>.

Entre los microorganismos probióticos utilizados en el consumo humano se encuentran las bacterias acidolácticas (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*<sup>3</sup>.

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*<sup>5</sup>.

Los simbióticos son productos que contienen pre y probióticos e implica sinergismo entre los dos, aumentando los beneficios en el huésped<sup>5</sup>.

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<sup>6,7</sup>.

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 catalasa<sup>4</sup>. 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<sup>8,9</sup>.

- **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 horas<sup>8</sup>.

- **Viabilidad de la cepa en un alimento:** se inoculó  $1 \times 10^{12}$  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

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

Microorganismos	Temperaturas		Reducción de azúcares						NH <sub>3</sub> arginina	Crecimiento en caldo 4 % NaCl
	15 °C	45 °C	Lactosa	Sucrosa	Sal	Manitol	Sorbitol	Xilosa		
<i>L. casei</i>	+	V	+/-	+/-	+	+	+	-	-	+

Bergey<sup>10</sup>, tal como se detalla en la Tabla 1. El microorganismo soportó las pruebas de pH y sales biliares, por lo tanto se consideró probiótico.

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.

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

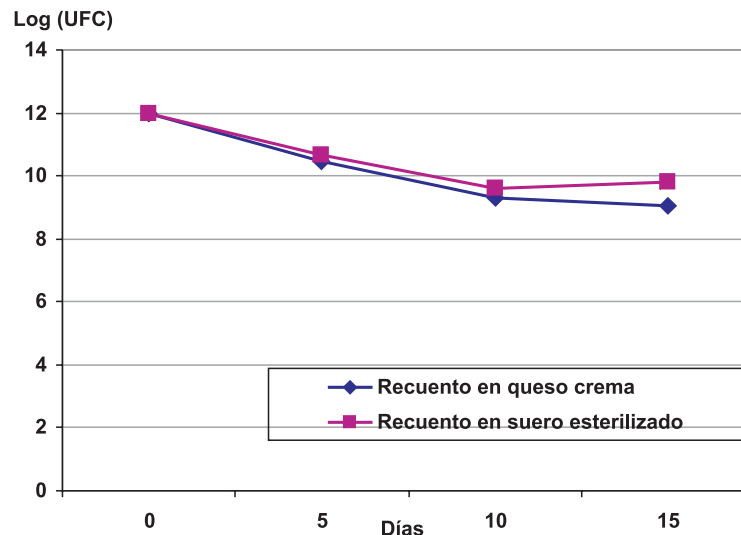
Tiempo en días	Recuento en queso crema	Recuento en suero esterilizado
0	1,0x10 <sup>12</sup> ufc/ml	1,0x10 <sup>12</sup> ufc/ml
5	3,0x10 <sup>10</sup> ufc/ml	4,5x10 <sup>10</sup> ufc/ml
10	2,0x10 <sup>9</sup> ufc/ml	4,0x10 <sup>9</sup> ufc/ml
15	11,0x10 <sup>8</sup> ufc/ml	6,2x10 <sup>9</sup> ufc/ml

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.

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

Media queso	Media suero	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	0,68	0,01	-0,92

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 de *Lactobacillus casei*, determinando en ambos casos, un comportamiento muy similar, pues no hubo diferencias significativas de las medias en



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

los dos tratamientos. Ambos se iniciaron con un inóculo inicial de  $1 \times 10^{12}$  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 homofermentadores<sup>11</sup>. 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  $11 \times 10^8$  UFC/mL y  $6.2 \times 10^9$  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 1998<sup>12</sup>, 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 Kasimoglu<sup>13</sup> 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<sup>6,14</sup>.

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<sup>15,16</sup>.

Otros investigadores elaboraron quesos con contenidos similares, por ejemplo, Vinderola<sup>16</sup> y colaboradores en el 2003 elaboraron un queso fresco con una mezcla *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con un contenido de  $10^8$  UFC/g y, Kasimoglu<sup>13</sup> y colaboradores en el 2004 elaboraron un queso blanco con *L. acidophilus* y encontraron que los microorganismos sobreviven en cantidades superiores a  $10^7$  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

1. 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.
2. YOUNG, R.J. and HUFFMANS, S. Probiotic use in children. In : Journal of Pediatric Health Care Vol. 17, No. 6 (2003); p. 277-283.
3. 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.
4. SALAZARALZATE, 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.
5. SCHREZENMEIR J. and DE VRESS, M. Probiotics, prebiotics and symbiotic- approaching a definition. American. Journal of Clinical Nutrition. Vol. 73, No. 2 (Suppl. 2001); p. 361-364.
6. GONZÁLEZ MARTINEZ, Blanca; SALAS, Zacarias J. y HEREDIA R., Laura. Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de Salmonella enteritidis. En: Ciencia UANL. Vol. 9, No. 4 (dic. 2006)
7. FARNSWORTH, E.R. Probiotics and prebiotics. In: Handbook of Nutraceutical and functional foods. Vol. 25 (2001); p. 407-422.
8. 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.
9. O'SULLIVAN, M.G., et al. Probiotic Bacteria: Myth Or Reality? In: Trends in Food Science & Technology. Vol 31 (dec. 1992); p. 309-314.
10. WILLIAMS AND WILKINS. Bergeys Manual Of Determinative Bacteriology. 9 ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 1994.
11. HUANG, M.K., et al. Effects Of Lactobacilli And An Acidophilic Fungus On The Production Performance And Immune Responses In Broiler Chickens. In : Poultry Science. Vol. 83, No. 5 (2004); p. 788-795.
12. JASKARI, J.; KONTULA, P. and SIITONEN, A.. Oat b -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. In : Applied Microbiology Biotechnology. Vol. 49 (1998); p.175-81.
13. KASIMOGLU, A.; GÖNCÜOĞLU, M and AKGÜN, S. Probiotic white cheese with Lactobacillus acidophilus. In: International Dairy Journal. Vol. 14, No. 12 (2004)); p.1067-1073.
14. 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.
15. 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.
16. VINDEROLA, C., et al. (2003). Bioqueso lloay Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. En: ILE: Industria Láctea Española. No. 298 (2003); p. 34-48.