

Viabilidad de probióticos en sustratos lácteos (Probiotic viability on lactic substrates)

García González, Heidy*: Centro de Investigaciones Pesqueras, E mail: heidy@cip.telemar.cu | **Perea Falcón, Julio**: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, E-mail: julio@iia.edu.cu | **Rodríguez Martínez, Oxalys**: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia | **García Rodríguez, Arístides**: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia.

*Centro de Investigaciones Pesqueras. 5ta. Ave. esq. 246, Barlovento, Santa Fe, Playa, La Habana, Cuba.
Instituto de Investigaciones para la industria Alimenticia. Carretera al Guatao, km 3 y ½, La Habana, Cuba.

REDVET: 2008, Vol. IX, Nº 11

Recibido 13.05.2008 - Ref. prov. H023 - Revisado 01.09.08 - Ref. def. 111105_RED VET - Aceptado 30.10.08 - Publicado 01.11.08

Este artículo de investigación está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111108/111105.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

RESUMEN

Se evaluó la viabilidad de probióticos: *Lactobacillus acidophilus* (A) y *Lactobacillus casei* (B) en suero de queso y leche descremada para posterior tratamiento de gastroenteritis en cerdos. Se realizaron 8 tratamientos: suero o alternativamente leche descremada pasterizados o esterillizados y conservados a temperatura ambiente o refrigerada con 3 variantes, mediante la adición respectiva de 1 % de A, B y la mezcla en relación 1:1. La leche descremada se preparó al 9 % de sólidos totales y el suero se tomó de la elaboración de queso fresco de vaca. Los medios recién elaborados se caracterizaron físico-químico y microbiológicamente y se realizó el ensayo de viabilidad de los probióticos a los 1, 7, 14 y 28 días para escoger la mejor variante. Se utilizó Análisis de varianza y Test de Duncan. El suero pasterizado con la mezcla de los microorganismos, mantenido a temperatura ambiente, resultó la variante más promisorio por cumplir el límite de viabilidad durante el tiempo evaluado, alcanzar valores de 10^8 ufc/g a los 14 días y ser la más económica.

Palabras claves: Viabilidad | probióticos | cerdos | gastroenteritis

SUMMARY

The viability of probiotic: *Lactobacillus acidophilus* (A) and *Lactobacillus casei* (B), was evaluated in serum of cheese and skim milk for gastroenteritis treatment in pigs. They were carried out of 8 treatments: pasteurized or sterilized and conserved at ambient or refrigerated temperature serum and skim milk alternatively, with 3 variants, by means of addition 1 % of A, B and mixture in relationship 1:1 respectively. The skim milk was elaborated to 9 % of total solids and the serum was obtained of the elaboration of fresh cow cheese. The products elaborated were characterized by means of physical-chemical, microbiological and viability analyses to the 1, 7, 14, 21 and 28 d, this allowed choose the best variant. It was used variance analyses and Duncan test. Pasteurized serum with probiotic mixes at ambient temperature was the most promissory variant, due to it was reached the limit of viability during evaluated period, it overcame 10^8 ufc/g at 14 d and being the most economic.

Keywords: Viability | probiotics | pigs | gastroenteritis

INTRODUCCIÓN

En Cuba el 64 % de las muertes en crías intensivas de cerdos pequeños es conferido a enfermedades gastrointestinales, lo que ha conllevado a trazar estrategias dirigidas a la resolución de esta problemática (1). Es por ello que se ha acudido a la introducción de microorganismos probióticos en la alimentación de los mismos con resultados satisfactorios, tomando un especial interés el empleo de *Lactobacillus acidophilus* (A), *Lactobacillus casei* (B) y mezclas de ambos (2). El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de fermentación y viabilidad de los cultivos A y B en suero de queso y leche descremada, como medio para su empleo posterior en la prevención y tratamiento de la gastroenteritis en cerdos jóvenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon: leche descremada fluida, suero dulce de leche de vaca, cultivo de *Lactobacillus acidophilus* LA y *Lactobacillus casei* S.

Se realizó un diseño factorial con 24 experimentos y 8 tratamientos: suero o alternativamente leche descremada sometidos a tratamientos de pasterización o esterilización y conservados a temperatura ambiente (30 °C) o refrigerada (4 °C) con 3 variantes, mediante la adición de A, B y la mezcla de ambos, respectivamente. Se realizaron 3 réplicas por cada experimento. Como resultado de trabajos precedentes, se empleó el 1 % de inóculo de las bacterias y la relación 1: 1 en la mezcla (3).

Se preparó la leche descremada al 9 % de sólidos totales (4) y el suero se tomó con pH alrededor de 6,3 (12). La pasterización se realizó a 95 °C por 5 min y la esterilización a 120 °C por 10 min. Los medios se envasaron en erlenmeyers de 100 mL y se caracterizaron mediante los análisis: acidez (5),

pH (6), sólidos totales (7), grasa (8), proteínas (9), coliformes totales y fecales (10), hongos y levaduras viables (11) y la viabilidad de los microorganismos en estudio.

Se realizó el ensayo de viabilidad individual de las bacterias a los 1, 7, 14, 21 y 28 días. Los recuentos en placas se efectuaron en medio agar MRS. Los resultados fueron expresados en notación logarítmica en cada tiempo de conservación evaluado.

Como criterio de selección se tuvo en cuenta la variante que: cumpliera con el límite exigido de viabilidad 10^5 ufc/g (concentración mínima, que garantiza la incidencia favorable en los indicadores de mortalidad en los cerdos) (1), alcanzara la mayor viabilidad y a su vez, resultara más económica. Se realizó un previo análisis de la normalidad de los datos y homogeneidad de la varianza, luego se utilizó el análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores obtenidos como resultado de la evaluación de los índices físico-químicos en el suero y la leche descremada inoculados coinciden con las normas establecidas para los mismos y con los obtenidos en trabajos anteriores (3,12). Los resultados de los índices microbiológicos para los productos elaborados denotan, al inicio de los experimentos, excelente calidad higiénico-sanitaria y viabilidad por encima del límite exigido (10^5 ufc/g).

Las Tablas 1 y 2 muestran los resultados del Análisis de Varianza realizado para el suero pasteurizado y esterilizado.

Tabla 1. Análisis de varianza realizado para el suero pasteurizado

Fuentes de Variación	Suma de cuadrados	g/l	Cuadrado Medio	F	P
Temperatura	33,323	1	33,323	864,791	,000
Tipo de microorganismo	3,286	2	1,643	42,635	,000
Tiempo	573,007	4	143,252	3717,606	,000
Temperatura * tipo de microorganismo	0,947	2	,473	12,282	,000
Temperatura * tiempo	135,291	4	33,823	877,753	,000
Tipo de microorganismo* tiempo	17,587	8	2,198	57,051	,000

Tabla 2. Análisis de varianza realizado para el suero esterilizado

Fuentes de Variación	Suma de cuadrados	g/l	Cuadrado Medio	F	P
Temperatura	6,451	1	6,451	189,445	,000
Tipo de microorganismo	1,307	2	0,654	19,193	,000
Tiempo	103,963	5	20,793	610,647	,000
Temperatura * tipo de microorganismo	1,892	2	,946	27,781	,000
Temperatura * tiempo	30,240	4	7,560	222,029	,000
Tipo de microorganismo* tiempo	12,613	8	1,577	46,302	,000
Temperatura * tipo_de microorganismo* tiempo	7,540	7	1,077	31,636	,000

Tanto para el suero pasteurizado y esterilizado, como para la leche descremada pasteurizada y esterilizada, la probabilidad de error (p) es siempre < 0,001. Esto indica que para todas las fuentes de variación hay diferencias altamente significativas, es decir que la viabilidad varía significativamente de acuerdo con el tratamiento térmico, tipo de conservación, tipo de microorganismo empleado, tiempos de análisis y a la interacción entre ellos.

Tabla 3. Comparación de la viabilidad de los microorganismos correspondiente al suero pasteurizado

Temperatura conservación	Tipo de microorganismo	Tiempo (días)				
		1	7	14	21	28
ambiente	<i>L. acidophilus</i>	6,62 ghi	7,28 lm	7,42 mn	5,82 e	4,80 a
	<i>L. casei</i>	6,76 hij	7,50 mno	7,70 o	7,04 kl	4,20a
	mezcla	5,78 e	7,36 mn	8,64 p	6,68 hi	5,60 a
refrigerado	<i>L. acidophilus</i>	6,82 ijk	7,08 kl	7,52 mno	6,52 gh	4,00 b
	<i>L. casei</i>	6,50 gh	6,98 jk	7,34 mn	7,58 no	4,30 c
	mezcla	6,2 f	6,4 fg	7,54 mno	8,58 p	5,40 d

Letras diferentes indican diferencias significativas para $\alpha \leq 0,05$

Los resultados de la comparación de las medias de la viabilidad de los microorganismos correspondientes al suero pasterizado y esterilizado se presentan en las Tablas 3 y 4 respectivamente.

Tabla 4. Comparación de la viabilidad de los microorganismos correspondiente al suero esterilizado

Temperatura conservación	Tipo de microorganismo	Tiempo (días)				
		1	7	14	21	28
ambiente	<i>L. acidophilus</i>	6,76 fgh	7,58 jkl	7,80 l	5,92 c	4,26 a
	<i>L. casei</i>	6,70 fg	7,42 j	7,68 jkl	7,80 l	5,12 b
	mezcla	6,34 d	6,70 fg	8,82 m	7,46 j	5,16 a
refrigerado	<i>L. acidophilus</i>	6,52 def	7,00 hi	7,65 jkl	7,78 l	6,60 efg
	<i>L. casei</i>	6,70 fg	7,08 i	7,50 jk	7,62 jkl	6,38 de
	mezcla	6,70 fg	6,82 gh	7,74 kl	8,72 m	6,40 de

Letras diferentes indican diferencias significativas para $\alpha \leq 0,05$

Se observa en ambas tablas que la mezcla de microorganismos mostró el mejor comportamiento, pues no solo alcanzó el límite de viabilidad establecido durante el ensayo (1), sino que también alcanzó niveles máximos por encima de 10^8 ufc/g a los 14 días tanto en el suero pasterizado como esterilizado mantenidos a temperatura ambiente y a los 21 días tanto en el suero pasterizado como en el esterilizado refrigerados, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. Esto demuestra un sinergismo favorable entre los microorganismos involucrados en la mezcla.

Los contaminantes microbiológicos evaluados resultaron negativos para todas las variantes del suero analizadas, denotando buena calidad higiénico-sanitaria durante el periodo evaluado.

Se seleccionó en el caso del suero, la variante pasterizada ambiente con la mezcla de los microorganismos, pues cumple con el mínimo de viabilidad establecida y alcanza valores por encima de 10^8 ufc/g a los 15 días e implica menos gasto de energía, al no involucrar en su elaboración esterilización, ni refrigeración.

En las Tablas 5 y 6 se presentan los resultados del Análisis de Varianza correspondientes a la leche descremada pasterizada y esterilizada, empleadas en este trabajo.

Tabla 5. Análisis de varianza realizado para la leche descremada pasterizada

Fuentes de Variación	Suma de cuadrados	g/l	Cuadrado Medio	F	P
Temperatura	616,228	1	616,228	15632,641	,000
Tipo de microorganismo	2,403	2	1,201	30,479	,000
Tiempo	718,276	4	179,569	4555,356	,000
Temperatura * tipo de microorganismo	3,321	2	1,661	42,127	,000
Temperatura * tiempo	287,767	4	71,942	1825,040	,000
Tipo de microorganismo* tiempo	8,841	8	1,105	28,034	,000
Temperatura * tipo de microorganismo* tiempo	5,479	8	,685	17,373	,000

Tabla 6. Análisis de varianza realizado para la leche descremada esterilizada

Fuentes de Variación	Suma de cuadrados	g/l	Cuadrado Medio	F	P
Temperatura	313,323	1	313,323	18642,791	,000
Tipo de microorganismo	3,286	2	1,643	42,635	,000
Tiempo	678,007	4	154,252	3728,606	,000
Temperatura * tipo de microorganismo	2,947	2	0,573	30,382	,000
Temperatura * tiempo	138,297	4	63,723	1815,754	,000
Tipo de microorganismo* tiempo	6,587	8	1,199	14,052	,000
Temperatura * tipo de microorganismo* tiempo	3,666	8	,258	12,869	,000

De manera similar al comportamiento del suero pasterizado y esterilizado, en la leche descremada bajo los tratamientos térmicos practicados, la probabilidad de error (p) es siempre $< 0,001$, lo que indica que para todas las fuentes de variación hay diferencias altamente significativas, es decir que la viabilidad varía significativamente de acuerdo: al tratamiento térmico, tipo de conservación, tipo de microorganismo empleado, tiempos de análisis y a la interacción entre ellos.

Los resultados del Test de Duncan para discriminar las diferencias entre las medias correspondientes en cada caso se presentan en las Tablas 7 y 8 respectivamente.

Tabla 7. Comparación de la viabilidad de los microorganismos correspondiente a la leche descremada pasteurizada

Temperatura de conservación	Tipo de microorganismo	Tiempo (días)				
		1	7	14	21	28
ambiente	<i>L. acidophilus</i>	8,34 m	2,00 c	0 a	0 a	0 a
	<i>L. casei</i>	8,62 n	1,90 b	0 a	0 a	0 a
	mezcla	8,54 n	3,00 d	0 a	0 a	0 a
refrigerado	<i>L. acidophilus</i>	8,00 k	7,82 jk	7,30 h	6,45 f	5,00 e
	<i>L. casei</i>	8,01 k	7,95 j	7,37 hi	6,67 f	5,20 e
	mezcla	8,08 k	7,62 i	7,50 i	7,27 g	5,35 e

Letras diferentes indican diferencias significativas para $\alpha \leq 0,05$

Tabla 8. Comparación de la viabilidad de los microorganismos correspondiente a la leche descremada esterilizada

Temperatura de conservación	Tipo de microorganismo	Tiempo (días)				
		1	7	14	21	28
ambiente	<i>L. acidophilus</i>	9,00 h	2,50 a	0 a	0 a	0 a
	<i>L. casei</i>	9,09 h	2,00 b	0 a	0 a	0 a
	mezcla	9,10 h	3,00 b	0 a	0 a	0 a
refrigerado	<i>L. acidophilus</i>	8,80 g	8,41 f	7,78 de	7,60 d	6,52 c
	<i>L. casei</i>	8,87 g	8,77 g	7,75 d	7,58 d	6,38 c
	mezcla	8,89 gh	8,33 f	8,18 ef	7,70 d	6,40 c

Letras diferentes indican diferencias significativas para $\alpha \leq 0,05$

Para la leche descremada pasteurizada refrigerada se cumple que todas las variantes sobrepasan los conteos mínimos de 10^5 ufc/g. En el caso de la leche descremada pasteurizada y esterilizada ambiente, desde los 7 días no se garantizó el mínimo exigido de 10^5 ufc/g, probablemente debido a que la leche presenta mayor cantidad de proteínas que el suero y ocurre una mayor proteólisis a temperatura ambiente, por lo que se alcanza más rápido la etapa de muerte celular donde los propios metabolitos producidos por los microorganismos, se convierten en inhibitorios para su crecimiento (13).

Todas las variantes correspondientes a la leche descremada esterilizada refrigerada, alcanzaron valores por encima del límite exigido (10^5 ufc/g) durante todo el tiempo evaluado. En este caso la temperatura de conservación hace más lento el metabolismo de las bacterias inoculadas (13). La leche descremada esterilizada refrigerada con la inoculación de la mezcla de microorganismos, fue la única que mantuvo valores por encima de 10^8 ufc/g hasta los 14 días, a diferencia de las otras variantes, que exclusivamente la mantuvieron hasta los 7 días e incluso que las variantes de la leche descremada pasteurizada refrigerada que únicamente alcanzaron estos valores el primer día.

Los contaminantes microbiológicos correspondientes a la leche descremada resultaron negativos para todas las variantes analizadas durante el periodo evaluado, denotando buena calidad higiénico-sanitaria.

Luego de todos los análisis anteriores, se seleccionó la variante del suero pasteurizado ambiente con la mezcla de las bacterias utilizadas, porque no solo cumple con el límite exigido y alcanza valores de 10^8 ufc/g a los 14 días, sino que al incurrir en menos gastos de materias primas y energéticos por su tratamiento térmico y temperatura de conservación resulta la más económica.

CONCLUSIONES

1. Los mayores conteos, del orden de 10^8 ufc/g, se obtuvieron con la mezcla de microorganismos en el suero pasteurizado y esterilizado ambiente a los 14 días y en el suero pasteurizado y esterilizado refrigerado a los 21 días.
2. Con la leche descremada como sustrato pasteurizada y esterilizada, mantenidas a temperatura ambiente, no se alcanzan los valores de 10^5 ufc/g después del primer día de inoculadas.
3. En la leche descremada pasteurizada refrigerada, todas las variantes mantienen conteos mínimos de 10^5 ufc/g durante el tiempo evaluado y solo alcanzan los niveles de 10^8 ufc/g el primer día.
4. Para todas las variantes correspondientes a la leche descremada esterilizada refrigerada, se mantienen conteos por encima de 10^5 ufc/g, pero solo se logran conteos más elevados hasta los 14 días en la que contiene la mezcla de microorganismos.
5. Se seleccionó la variante suero pasteurizado mantenido ambiente como la más promisoría por mantener los requerimientos de viabilidad durante el tiempo evaluado, alcanzar valores de 10^8 ufc/g a los 14 días y ser la más económica.

RECOMENDACIONES

Se recomienda darle continuidad a esta investigación con la aplicación de la variante suero pasteurizado mantenido a temperatura ambiente en el tratamiento de la gastroenteritis en cerdos.

REFERENCIAS

1. **Bach Knudsen, K.E.**. J. Animal Food Science and Technology, 1997; (67): 319-338.
2. **Scheuermann, S. E.** Animal Food Science and Technology, 1993; (41): 181-189.
3. **García, G. H.; Paz, F.T.; Pino, A. J.** Elaboración de una leche fermentada a partir de Lactobacilos. Alimentaria, 1999; (300): 45-49.
4. **Códex Alimentarius. Codex Stan 243-2003.** Norma del Codex para leches fermentadas.
5. **ISO 11869:1997.** Yogurt. Determination of titratable acidity. Potentiometric method.
6. **AOAC.** Food Composition, Additives, Natural Contaminants. 15th Edition, 1990; 804-830.
7. **ISO 6731: 2001.** Leche, crema y leche evaporada. Determinación de sólidos totales y no grasos. Método de ensayo.
8. **ISO 1211: 1999** Milk. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method)
9. **ISO 8968-1: 2001.** Milk -- Determination of nitrogen content -- Part 1: Kjeldahl method.
10. **ISO 4832: 1991.** Guía General para la enumeración de los coliformes. Técnicas para el conteo de colonias.
11. **ISO 6611: 1992.** Milk and milk products. Enumeration of colony-forming units of yeast and/or moulds. Colony-count technique at 25°C.
12. **Perea, F. J. ; Paz, T.**. Desarrollo de un yogur de soya con adición de suero de quesería. Alimentaria. 2001; (327):113-116.
13. **Leveau, J. Y.; Bouix, M. L.** Los microorganismos de interés industrial. Microbiología industrial. Zaragoza. Editorial Acribia, 2000; 2, 177-183.