

Calidad Microbiológica de Leche Fermentada Producida con Cultivo por Lote Repetido

Kiyohiko Nakasaki,^{1*} Mitsunori Yanagisawa,¹ y Koji Kobayashi¹

La calidad de la leche fermentada se volvió casi constante con respecto a los cambios en las densidades celulares de las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas.



Foto: Vanessa Pike-Russell

Se llevó a cabo la producción de leche fermentada usando un cultivo iniciador por lote repetido que contenía *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Acetobacter orientalis* durante 14 días. El pH disminuyó a aproximadamente 4.3 y la leche solidificó cuando la proporción de mezcla de leche fermentada a leche fresca se fijó a un nivel tan alto como 10%. La población microbiana cambió conforme el cultivo progresó y la densidad celular de las bacterias lácticas y acéticas finalmente llegaron a un valor constante. La calidad de la leche fermentada se volvió casi constante con respecto a los cambios en las densidades celulares de las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas. Se inoculó *Escherichia coli* dentro de la leche fermentada para estimular la contaminación del medio. *E. coli* se fue eliminando con el progreso del cultivo por lote repetido y por tanto no mostró efectos adversos en la producción de la leche.

Recientemente se ha reconocido que los alimentos fermentados contienen nutrientes esenciales necesarios para mantener una salud óptima así como compuestos no nutricionales que contribuyen a la prevención o retraso de enfermedades crónicas asociadas con la edad. La leche fermentada es uno de los alimentos más populares y se ha consumido tradicionalmente por mucho tiempo en varios países. Existen diferentes tipos de leches fermentadas disponibles en el mercado japonés. La leche fermentada

a veces también se elabora para propio consumo en los hogares. Cuando la leche fermentada se hace en casa, se usan cultivos por lote repetido.

Se han reportado varios estudios sobre cambios en la población microbiana en la producción y almacenamiento de leche fermentada, incluyendo al yogurt, ya que varios microorganismos coexisten en la leche fermentada. Estos estudios, sin embargo, han sido para operaciones en lotes comunes, en los cuales el producto no se vuelve a usar como semilla para el siguiente lote. También han habido estudios que usan cultivos por lote repetido para la fermentación de leche. Entre estos, en la fermentación coexisten varios microorganismos, como una mezcla de cultivos de células inmovilizadas de bacterias ácido lácticas y levaduras de kefir y cultivos de gránulos de kefir que contienen varios tipos de microorganismos, pero no hay investigaciones sobre los cambios en la población microbiana de varios microorganismos con el progreso de cultivos por lote repetido. Además no se ha reportado, que sepamos, cultivos por lote repetido para la producción de leche fermentada en donde se utilicen una mezcla de cultivos de dos tipos de bacterias, por ejemplo, bacterias ácido lácticas, y ácido acéticas, que es uno de los usos más populares de los cultivos iniciadores en Japón.

En este estudio, se investigaron los cambios en la población microbiana en leche fermentada durante un cultivo por lote repetido con un cultivo iniciador que contiene estos dos tipos de bacterias en particular. Además, se usó *Escherichia coli* como un modelo con-

¹Departamento de Material de Ciencias e Ingeniería Química, Universidad Shizuoka Japón

taminante para estudiar el efecto de la contaminación, ya que siempre hay riesgo de contaminación por varios microorganismos durante la fermentación realizada con cultivos por lote repetido en hogares.

Se utilizó uno de los cultivos iniciadores comerciales disponibles en el mercado japonés; consiste en un polvo secado por congelación que contiene *Lactococcus lactis subsp. cremoris* como una bacteria ácido láctica y *Acetobacter orientalis* como una bacteria ácido acética. La proporción de la mezcla de estas bacterias no la dio a conocer el proveedor pero las densidades celulares de *L. lactis subsp. cremoris* y *A. orientalis* que se midió en un medio agar GYP-CaCO₃ (glucosa, 10g; extracto de levadura, 10g; Bacto peptona, 5g; CH₃COONa·3H₂O, 2g; MgSO₄·7H₂O, 10mg; NaCl, 10mg; Polisorbato 80, 500mg; CaCO₃, 5g; agar, 12 g; agua destilada, 1 l; pH=6.8 fue 6.7log10 y 2.9log10 ufc/g de cultivo iniciador seco, respectivamente.

Se utilizó en el estudio leche de larga vida (también conocida como leche ultrapasteurizada) comercializada bajo la marca Hokkaido 3.7 Milk (Nippon Milk Community, Tokio) y se compró en el mismo supermercado a la misma hora para mantener una calidad de

leche estándar. No se detectaron microorganismos en la leche en el análisis en la placa con agar GYP. La concentración de la lactosa en la leche fue de 44.7± 0.50 g/l.

Para preparar la leche fermentada para sembrar con un cultivo por lote repetido, se añadió 1 g de cultivo iniciador a 200 ml de leche fresca y la mezcla se incubó a 20°C por 24 h. La inoculación se realizó bajo condiciones asépticas. Después de la incubación, se midió el pH y se determinaron las densidades celulares de ambas bacterias ácido lácticas y ácido acéticas en un medio de agar GYP-CaCO₃, las placas con agar se utilizaron para contar colonias de cada bacteria que se diferenciaron en la dilución dependiendo de las densidades celulares. Es fácil distinguir estas bacterias en la placa con agar, ya que las colonias tienen apariencia diferente como lo describe el método de Mitruka y Bonner. Las colonias de *L. lactis subsp. cremoris* son de color blanco, puntiformes, convexas en elevación, margen completo y forma pequeña (0.5mmφ), mientras que *A. orientalis* son de color café, circular, convexa en elevación, margen completo y forma colonias más grandes que las bacterias ácido lácticas (2mmφ). Además, la densidad celular de las bacterias ácido acé-



Tipper Tie México tiene la respuesta para todas las necesidades de embutido. Ahora con las líneas de engrapadoras Tipper Tie Alpina, embutidoras y hornos Marlen, así como la línea completa de llenadoras, cubicadoras y deshebradoras marca Carruthers.



Grapas Nacionales de México, S.A. de C.V.
Cráter No. 644 Col. Jardines del Pedregal C.P. 01900, México, D.F. Tel.: (55) 5652-8960 Fax: (55) 5652-6171 E-mail: cgarcess@tippertie.com.mx

www.tippertie.com

ticas es más fácil de detectar en mezclas con mucho mayor cantidad de bacterias ácido lácticas, aunque sea mucho menor, tanto como 1/5000 o menos, que la de las bacterias ácido lácticas porque las bacterias ácido acéticas forman colonias claras junto a las miles de colonias de bacterias ácido lácticas. Se estableció en un experimento preliminar que la cuenta de colonias de bacterias ácido acéticas en la suspensión y en la mezcla con un número extremadamente mayor de bacterias ácido lácticas fueron similares.

En el cultivo por lote repetido, se realizaron dos corridas experimentales variando la proporción de la mezcla de la leche fermentada preparada a partir de leche fresca: una fue 1 v/v% (corrida 1), otra fue 10 v/v (corrida 2). Las proporciones de mezcla utilizadas en el hogar no puede determinarse pero se dice que la proporción de la mezcla se ajusta a aproximadamente 10-20 v/v%. Primero se agregaron cien mililitros de cada mezcla en un matraz Erlenmeyer y se cultivó a 20°C por 12h y posteriormente se maduró a 8°C por 12 h en un refrigerador hasta el día siguiente. Se eligió una temperatura de cultivo de 20°C, que es más favorable para la actividad de las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas que las temperaturas bajas; no se eligieron arbitrariamente para poder obtener resultados básicos en un ejemplo simple de producción de leche fermentada, para que en experimentos posteriores se estudien diferentes temperaturas y cambie la temperatura conforme progresa el cultivo. La leche fermentada se agitó con un agitador magnético en el matraz y se tomó una muestra antes de transferirlo a la misma proporción de mezcla de cada experimento al siguiente lote después de un intervalo de 24h. La corrida 1 paró después de una semana, mientras que la corrida 2 continuó por dos semanas. Se utilizó como modelo contaminante a *E. coli* HB101, se precultivó en un medio Luria-Bertani (LB) a 37°C por 12h y posteriormente se inoculó en la leche fermentada de la corrida 2 a 7log₁₀ ufc/ml al octavo día.

Se analizó la muestra extraída del matraz en términos de pH y se determinaron las concentraciones

de ácido láctico, ácido acético y lactosa (si fuese necesario) así como las densidades celulares ya sea de las bacterias ácido lácticas ó ácido acéticas. Los datos se obtuvieron justo antes de transferir la leche fermentada al siguiente lote excepto para los datos del lote "0", los cuales se obtuvieron inmediatamente después de que la leche fresca se mezclara con la leche fermentada inoculada. Las concentraciones de ácido láctico, ácido acético y lactosa se determinaron usando el F-kit L-/D-ácido láctico, F-kit ácido acético y F-kit Lactosa (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany), respectivamente. Después de dos semanas para la corrida 2, el cultivo por lote repetido continuó hasta el día 42 para mantener la leche fermentada inoculada y poder utilizarla en un experimento posterior.

Se realizaron tres diferentes experimentos utilizando la leche fermentada obtenida después del día 42 del cultivo por lote repetido de la corrida dos con una mezcla 10v/v% para la leche fermentada inoculada para investigar por qué las densidades de las células de las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas alcanzaron valores constantes cuando se procedió con cultivo por lote repetido. La primera corrida fue el cultivo por lote repetido ordinario (Tabla 1, corrida A), la segunda incluyó ajuste de pH a 6.5 (pH original) después de 6 h de incubación (Tabla 1, corrida B), y la tercera incluyó agitación continua con un agitador magnético (Tabla 1, corrida C). Para todas las corridas, la leche fermentada se inoculó a 20°C por 12 h, y posteriormente se maduró a 8°C en un refrigerador por 12 h.

En la preparación de leche fermentada inoculada con un cultivo iniciador comercial, el pH disminuyó de 6.5 a 5.8, y la leche no solidificó aún después de 24h de incubación a 20°C. Las bacterias ácido lácticas crecieron a un nivel tan alto como 8.5log₁₀ ufc/ml, pero la densidad celular de las bacterias ácido acéticas sólo alcanzaron el orden de 4log₁₀ ufc/ml.

En la Fig. 1 se comparan los tiempos para el cambio del pH y las concentraciones de los ácidos láctico y acético durante el cultivo por lote repetido de la corrida

Tabla 1. Densidades Celulares de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, concentraciones del ácido láctico, ácido acético y lactosa, pHs.

Número de Corrida	pH	Log densidad celular (UCF/ml)		Concentración g/l		
		<i>L. Lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	<i>A. Orientalis</i>	Ácido láctico	Ácido acético	Lactosa
A	4.36	9.14+0.04	8.28+0.05	6.66+0.11	0.86+0.03	38.4+1.92
B	4.59	9.16+0.08	7.49+0.17	11.2+0.41	0.36+0.02	33.8+0.23
C	4.48	9.08+0.01	8.67+0.03	6.09+0.48	0.71+0.01	37.1+1.43

El +SD se muestra para cada promedio (n=3).

1 y 2. El pH para la corrida 2 disminuyó marcadamente para el segundo lote y posteriormente se elevó a aproximadamente 4.3, donde la leche solidificó de manera similar al aceite de cocina, mientras que el pH para la corrida 1 no disminuyó por debajo de 5.5 y la leche no solidificó.

La concentración del ácido láctico en la corrida 1 aumentó a aproximadamente 2g/l al comienzo de la operación y luego se elevó hasta el séptimo lote. En contraste, la concentración de ácido láctico en la corrida 2 disminuyó rápidamente a 8g/l durante los tres primeros lotes, y luego disminuyó ligeramente a aproximadamente 6g/l en las últimas etapas de la operación. No se detectó ácido acético durante la operación de la corrida 1, mientras que en la corrida 2 la concentración del ácido acético aumentó gradualmente después del séptimo lote, en contraste con la disminución de concentración de ácido láctico. Es interesante notar que la concentración de ambos ácidos (láctico y acético) cambió ligeramente conforme el cultivo progresó, aunque el pH permaneció casi constante en la corrida 2.

Figura 1. Tiempo en que cambia el pH y las concentraciones de ácido láctico (LA) y ácido acético (AA) durante las corridas 1 y 2 del cultivo por repetición.

Los triángulos morados, pH para la corrida 1; triángulos amarillos, pH para la corrida 2; círculos abiertos, ácido láctico para la corrida 1; círculos cerrados, ácido láctico para la corrida 2; cuadros abiertos, ácido acético para la corrida 1; cuadros cerrados, ácido acético para la corrida 2.

El 95% de intervalo de confianza se muestra con una barra de error (n=3).

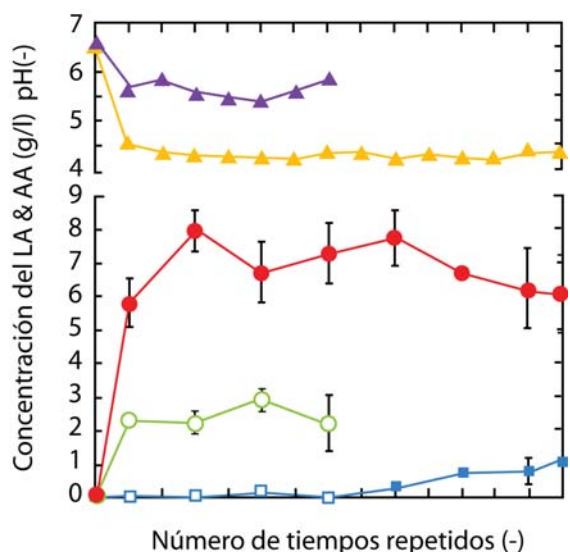


Foto: Larz Flem

El tiempo de cambio de las densidades celulares de cada bacteria durante un cultivo por lote repetido de la corrida 1 y 2 se comparan en la Figura 2. Las densidades celulares iniciales de las bacterias ácido lácticas fueron ligeramente mayores que los valores calculados para esa densidad en la leche fermentada inoculada mencionada anteriormente, $8.5 \log_{10}$ ufc/ml. Esto se puede deber a que la leche fermentada inoculada utilizada para ambas corridas 1 y 2 no fue la misma como se mencionó anteriormente, y la densidad celular en la leche fermentada inoculada tuvo algo de fluctuación, dependiendo de los experimentos.

La densidad de las bacterias ácido lácticas en la corrida 1 fue 1/10 de la de la corrida 2 al comienzo de la incubación y subsecuentemente disminuyó, ej., aproximadamente $0.3 \log_{10}$ ufc/ml menor a la de la corrida 2. La razón por la que la concentración del ácido láctico fue marcadamente más alta en la corrida 2 que en la 1 en vez de ser relativamente baja por la diferencia en la densidad celular de las bacterias ácido láctico entre las 2 corridas (cf. Figs. 1 y 2) puede deberse a que la densidad de las bacterias ácido lácticas en la corrida 2 alcanzaron su valor final antes del final del periodo de incubación, por ej., 12h. El ácido láctico puede producirse aún después de que haya cesado el crecimiento celular, como se demostró en investigaciones previas.

La densidad celular de las bacterias ácido lácticas aumentó gradual y establemente después del segundo lote en la corrida 2. Por el contrario, en la corrida 1, la densidad celular de las bacterias ácido acéticas aumentó en el primer lote, y disminuyó rápidamente

conforme progresó la incubación, y finalmente se volvió menor que el nivel detectable en este estudio, 10 ufc/ml. La densidad celular para cada lote se midió usando una muestra extraída justo antes de que se incubara el siguiente lote excepto en el caso del lote 0; cuando la densidad celular permaneció constante entre los cultivos por lote repetido, entonces los microorganismos crecieron para compensar la dilución con leche fresca. Para las densidades celulares de los lotes 0 y 1 en las corridas 1 y 2, se puede deducir que la velocidad de crecimiento de las bacterias ácido acéticas osciló entre 1 a 2 órdenes de magnitud por día.

La diferencia en los cambios de la densidad celular de las bacterias ácido lácticas después del primer lote entre las corridas 1 y 2 se puede explicar con el hecho de que la velocidad de crecimiento fue menor que en la dilución en la corrida 1, mientras que la velocidad de crecimiento fue mayor que en la dilución en la corrida 2.

Los cambios en la población microbiana parece coincidir bien con los cambios característicos en las concentraciones de los ácidos acético y láctico, considerando que el nivel de las bacterias ácido acéticas gradualmente aumentó conforme la incubación progresó en la corrida 2. (cf. Figs. 1 y 2). A pesar de

Figura 2. Tiempo en que cambian las densidades celulares de las bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y *Escherichia coli* HB101 durante el cultivo por lote repetido en las corridas 1 y 2. Círculos rojos, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* para la corrida 1, círculos verdes, *L. lactis* subsp. *cremoris* para la corrida 2; triángulos morados, *Acetobacter orientalis* para la corrida 1; triángulos amarillos, *A. orientalis* para la corrida 2; rombos azules, *E.coli* HB101 para la corrida 2. Intervalo de confianza del 95% se muestra con una barra de error (n=3).

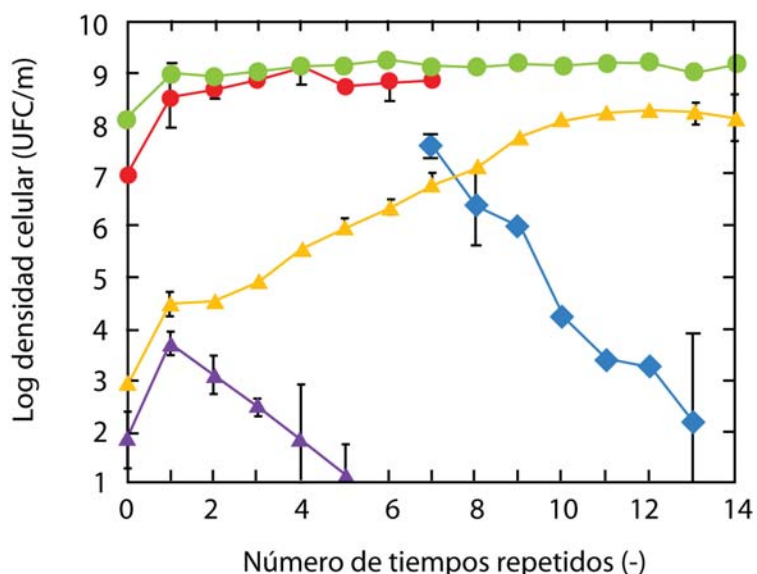


Foto: Lazy Kangaroo

que las concentraciones del ácido acético empezaron a aumentar sólo después del séptimo lote, en donde las bacterias ácido acéticas tenían una densidad celular alta, la concentración del ácido acético pudo aumentar conforme se elevó el número de bacterias ácido acéticas, aún antes del séptimo lote de fermentación. La concentración de ácido acético antes del séptimo lote fue por debajo del nivel de detección de este estudio. Además, se estableció que *E. coli* no fue responsable de la producción de ácido acético en este estudio por conducir la fermentación usando dos tipos de bacterias, a saber, las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, sin añadir *E. coli*. No quedó claro si el ácido láctico se convirtió directamente en ácido acético o no, pero el consumo de ácido láctico y la producción de ácido acético ocurrió simultáneamente, y también ocurrió cuando las bacterias ácido acéticas se incubaron con un reactivo ácido láctico en la mezcla de la leche fresca.

Cuando la densidad celular de las bacterias ácido lácticas dejó de aumentar, las bacterias ácido acéticas continuaron aumentando su número, y su crecimiento selectivo continuó hasta el lote 11 en la corrida 2. Es difícil de explicar la razón de por qué el aumento en el número de bacterias ácido lácticas en una etapa temprana de operación, pero su crecimiento se podría regular por su propia actividad, por ej., un efecto inhibitorio del ácido láctico, un bajo pH asociado con la producción de ácido láctico, o deficiencia en términos de micronutrientes para el crecimiento en leche, ya que la lactosa, que es un macronutriente para las bacterias ácido láctico, permanecieron a un nivel tan alto como aproximadamente 39 g/l aún en el lote 14 del cultivo. De las posibles razones, no se considera un pH bajo la razón por la cual en aumento en la concentración de ácido láctico se detenga a una etapa temprana de

la operación, ya que el ajuste de pH no mejoró el crecimiento de bacterias ácido lácticas en la corrida B, a pesar de que la concentración de ácido láctico aumentó al doble que el usual para cultivos por lote repetido sin ajustar pH en la corrida A (ver Tabla 1).

El número de bacterias ácido acéticas también dejó de aumentar y se estabilizó a aproximadamente $8 \log_{10}$ ufc/ml en etapas posteriores de la operación en la corrida 2. Existen algunas explicaciones de por qué deja de aumentar el número de bacterias ácido acéticas, pero el bajo pH no es importante en este caso. De hecho, ajustar el pH, particularmente en este caso en el que el pH se elevó a cerca del valor neutral, puede ser lo que inhibió a las bacterias ácido acéticas. La densidad celular de las bacterias ácido acéticas en la corrida B fue menor que en la corrida A. El pH óptimo para el género *Acetobacter* está en el rango de 5.4-6.3. El crecimiento ocurre a pHs 4.0-4.5; hay un ligero crecimiento a pHs 7-8 (10); *Acetobacter* prefiere un pH relativamente bajo para su desarrollo. Una de las posibles explicaciones del cese de desarrollo de las bacterias ácido acéticas es el almacenamiento de oxígeno causado por el aumento en la densidad de las bacterias ácido acéticas en la leche fermentada. La agitación continua fue por tanto utilizada en la corrida C para proveer de más oxígeno que en la fermentación estática de la corrida A, y fue demostrado que el desarrollo de bacterias ácido acéticas se mejoró en la corrida C, siendo 2.5 veces mayor en la corrida C ($8.67 \log_{10}$) que en la corrida A ($8.28 \log_{10}$), aunque las concentraciones del ácido acético en ambas corridas fue similar (ver Tabla 1).

La estabilidad de la microflora de la leche fermentada se determinó también inoculando a la leche con *E. coli* HB101, cuya densidad celular disminuyó en casi una orden de magnitud por día durante el cultivo por lote repetido (ver Fig.2). Esta disminución en la densidad celular se pudo deber a la dilución asociada con el cultivo por lote repetido en la corrida 2. La supervivencia de *E. coli* en alimentos ácidos se ha documentado ampliamente en la literatura, y se ha indicado que la supervivencia depende de las condiciones como el pH, temperatura y tipos de microorganismos coexistentes. Se ha reportado que las bacterias vivas en el yogurt en cantidades de aproximadamente 10^8 a 10^9 y un pH cerca de 4.5 son necesarios para la actividad bactericida del yogurt hacia *E. coli*. Al comienzo de este estudio, se esperaba que *E. coli* no se eliminó pero se

inhibió bajo las condiciones de incubación y tendió a diluirse con el cultivo por lote repetido.

La diferencia en el cambio de la densidad celular de *E. coli* pudo adquirirse por la diferencia en los tipos de microorganismos contenidos en la leche fermentada presente y yogurt (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). Los resultados mencionados anteriormente sugieren la seguridad de cultivos por lote repetido usados para producir leche fermentada en los hogares. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones sobre los factores como los efectos de la temperatura, periodo de incubación, tipos y concentraciones de posibles contaminantes para determinar la estabilidad de la leche fermentada producida individualmente en los hogares.

Fuente:

Journal of Bioscience and Bioengineering
Vol. 105. No. 1, 73-76. 2008
Society for Biotechnology, Japan.

Traducido por: I.A. Violeta Morales Vértiz

EMPAQUE AL VACÍO



EL EMPAQUE INTELIGENTE



- Empacadoras al vacío
- Tánques y túneles de encogimiento
- Bolsas laminadas y termoencogibles
- Bolsas para pasteurizado y cocción
- Película cubre hueso



Super 42



Extra 52



Supra 260

CARNOTEX, S.A. de C.V.
Dr. Federico Sotelo s/n
Microparque Industrial; Hermosillo, Sonora
Tel. (662) 261 79 99, Fax (662) 261 84 78
www.empaquealvacio.com



TECNOLOGÍA CÁRNICA