

## **DESARROLLO DE UNA LECHE FERMENTADA A PARTIR DE LECHE DE BÚFALA CON ADICIÓN DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* Y *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* (CULTIVO DE BIOYOGUR)**

Carola Iñiguez\*, Tamara Rodríguez, Isbel Martínez, Osmar Hernández, María Nieto y Lisandra Martínez  
Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao km 3 ½, La Habana CP  
19200, Cuba.

E-mail: carolai@iiaa.edu.cu

Recibido: 19-03-2021 / Revisado: 12-04-2021 / Aceptado: 22-04-2021 / Publicado: 30-04-2021

### **RESUMEN**

Se estudió la influencia de tres valores de inoculación del cultivo alternativo de Bioyogur sobre la cinética de fermentación ácido láctica durante la etapa de incubación y sobre el desarrollo de acidez, sabor y textura, de una leche fermentada a partir de leche entera de búfala con un 8 % de azúcar. Definido el nivel de inoculación del cultivo y el de aromatizante mediante la aplicación de la prueba de Friedman, la leche fermentada obtenida fue caracterizada en sus indicadores composicionales, sensoriales, microbiológicos y de viabilidad celular del probiótico. La estimación de la durabilidad del producto se realizó por el método gráfico mediante la distribución de Weibull. Los resultados evidencian la posibilidad de obtener, a partir de leche entera de búfala, 2,5 % de cultivo de Bioyogur, 8 % de azúcar y 0,15 % de emulsión de naranja, un producto con adecuadas características composicionales, sensoriales y microbiológicas. La vida útil del producto envasado en potes de polipropileno de 400 mL y conservados a 4 °C fue de 18 días. El conteo *L acidophilus* resultó superior al mínimo terapéutico que se considera para productos probióticos.

**Palabras clave.** Leche fermentada de leche de búfala *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*.

---

\***Carola Iñiguez-Rojas:** Licenciada en Química. Investigador auxiliar. Dirección de Lácteos. Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Investigador Auxiliar de la Dirección de Lácteos. Ha realizado trabajos relacionados con la química y la bioquímica de la leche, composición y valor nutritivo de leche y sus derivados, caracterización de la leche de búfala y en el desarrollo de leches fermentadas, desarrollo e implantación de técnicas analíticas para la determinación de indicadores de calidad fisicoquímicos de diferentes tipos de leches. Ha impartido cursos de posgrado relacionado con las temáticas de análisis de control físico-químico en leche y derivados.

### **ABSTRACT**

**Developed of fermented milk from buffalo milk with addition of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* (Bioyogur culture)**

The influence of three values of inoculation of the alternative culture of Bioyogur on the lactic acid fermentation kinetics during the incubation stage and on the acidity, flavor and texture development of a fermented milk from whole buffalo milk with an 8% sugar was studied. Defined the level of inoculation of the culture and that of flavoring by applying the Friedman test, the fermented milk was characterized in its compositional, sensory, microbiological and cell viability indicators of the probiotic. The shelf-life was determined by the graphical method using the Weibull distribution. It was concluded the possibility of obtaining from buffalo milk, 2.5% of Bioyogur 8% sugar, 0.15% orange emulsion, a product with adequate compositional, sensory and microbiological characteristics. The shelf life of the product packed in 400 mL polypropylene pots and stored at 4 °C was 18 days. The *L acidophilus* count was higher than the therapeutic minimum considered for probiotic products

**Keywords:** Buffalo fermented milk *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*.

### **INTRODUCCIÓN**

*Lactobacillus acidophilus* es uno de los microorganismos con características probióticas más utilizado en Cuba, ya sea solo o asociado con otras cepas entre las que resalta el *Streptococcus*

*thermophilus*. A dicha asociación, conocida como cultivo de Bioyogur (cocultivo *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*), le son atribuidas las propiedades de mantener el estreñimiento y la diarrea bajo control, contrarrestar la intolerancia a la lactosa por su asociación con lactasa, controlar el colesterol mediante una absorción normal de grasas en la dieta y combatir las infecciones de levadura *Candida* (1, 2).

Al igual que otras cepas bacterianas al *Lactobacillus acidophilus* se le atribuye además la propiedad de la producción de mucopolisacáridos, relacionados con la modificación, bien sea positiva o negativa, de algunas propiedades de las leches fermentadas entre las que resalta la viscosidad/consistencia de las mismas dada por el tamaño de las moléculas del mucopolisacárido, así como por las interacciones existentes entre las mismas (3, 4).

Considerando lo antes señalado, las ventajas atribuidas a la leche de búfala con respecto a la de vaca, entre las que se pueden mencionar un contenido de colesterol menor (275 mg/100 g de grasa) que el de la leche de vaca (300 mg/100 g de grasa), contenidos más elevados de calcio y fósforo, mejor digestibilidad debido a la producción mayoritaria de  $\beta$ -caseína-A2 (5, 6) comportamiento que la asemeja más a la composición en proteínas de la leche humana su riqueza en componentes mayoritarios, así como la necesidad de incrementar la industrialización y comercialización de derivados lácteos a partir de este tipo de leche, se decidió el desarrollo de una leche fermentada aromatizada a partir de leche de búfala definiendo los niveles de inoculación del cultivo alternativo de Bioyogur y de aromatizante, así como la calidad sensorial, de composición, la calidad microbiológica y la durabilidad de la leche fermentada desarrollada a temperatura de conservación de 4 °C.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del trabajo se usó leche entera de búfala, con adecuadas características composicionales y de calidad microbiológica, cultivo de Bioyogur, conformado por *L. acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* en relación (1:1) con una acidez de 0,85 % expresada en ácido láctico y una viabilidad celular de  $10^9$  ufc/mL, azúcar refino calidad alimentaria y cuya proporción del 8 % fue fijada, atendiendo a los buenos resultados obtenidos en el desarrollo de otras leches fermentadas aromatizadas a partir de leche de búfala (1),

emulsión de naranja proveniente de la Planta de Aromas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia (IIIA).

Para la selección del nivel de inoculación de cultivo entre 2,5 a 3,5 %, superiores a los utilizados en leches fermentadas sin aromatizar (2,0 a 2,5 %), se consideró que la presencia del azúcar en la formulación trae aparejada una cierta inhibición en el desarrollo de los microorganismos que conforman el cultivo iniciador como derivación del incremento de la presión osmótica del medio y los niveles de inoculación recomendados para este tipo de cultivo (7).

Con el propósito de evaluar las características de la fermentación ácido láctica durante la etapa de incubación, a los tres niveles de inóculo en estudio se le realizaron cuatro corridas de 3 L de búfala, con adición del 8 % de azúcar. Para obtener las curvas de fermentación se determinaron en cada corrida los valores de acidez a tiempo cero (recién inoculada) y cada 30 min. El momento seleccionado para la interrupción de la etapa de incubación (fin de la etapa) se consideró a niveles de acidez de 0,45 a 0,50, al ser estos los niveles industrialmente establecidos para dicha etapa en otras leches fermentadas a partir de leche de búfala. Los valores medios de acidez total obtenidos a los diferentes niveles de inoculación se expresaron de forma gráfica contra el tiempo de incubación.

A las 24 h de conservadas a 4 °C las diferentes variantes, se evaluó el desarrollo de la acidez total expresada como porcentaje de ácido láctico (8) y se realizó el análisis sensorial tomando de cada producción ocho muestras representativas las que fueron analizadas a 12 °C, por una comisión de evaluación sensorial integrada por ocho catadores entrenados que evaluaron las características sensoriales fundamentales, sabor y textura con el procedimiento analítico vigente para el control de la calidad sensorial de leches fermentadas mediante el análisis y calificación de los atributos que configuran sus características organolépticas (9). La puntuación promedio asignada por los evaluadores a los atributos que integran el sabor y la textura debe resultar  $\geq 4,0$  para una evaluación cualitativa entre buena y excelente.

Una vez definido el porcentaje de inoculación, se procedió a determinar el porcentaje de aromatizante, en este caso emulsión de naranja. Las formulaciones ensayadas

0,15; 0,20 y 0,25 % fueron sometidas a una prueba sensorial de ordenamiento con ocho catadores entrenados, estableciendo un orden ascendente, considerando la tipicidad (calidad e intensidad) del olor y sabor del aromatizante. Durante esta prueba se determinó la suma de rangos y se realizó la comparación estadística mediante la prueba de Friedman para demostrar el reconocimiento de diferencias entre las muestras por los catadores (10).

Con la formulación seleccionada, aplicando la tecnología establecida para la leche fermentada de coágulo se efectuaron cuatro corridas de 30 L de leche. El producto se envasó en potes de polipropileno de 400 mL con tapas. Para la caracterización físicoquímica del producto se determinaron el desarrollo de acidez total (expresada como porcentaje ácido láctico) (8), el contenido en materia grasa y proteínica, así como sólidos totales y cenizas (11), y por diferencia los hidratos de carbono.

Además, se efectuaron el conteo total de microorganismos coliformes (12), hongos y levaduras (13), así como el conteo de células viables *L. acidophilus* (14). La evaluación sensorial global por siete catadores entrenados se realizó por el procedimiento analítico vigente para el control de la calidad sensorial de leches fermentadas mediante el análisis y calificación de los atributos que configuran sus características organolépticas (9). La evaluación se realizó entre 10 y 12 °C.

Para el estudio de durabilidad, cuatro lotes de leche fermentada aromatizada con adecuadas características de composición, calidad higiénica sanitaria y sensorial, envasados en potes de polipropileno de 400 mL fueron conservados a 4 °C.

La calidad del producto durante la conservación fue determinada considerando criterios sensoriales, microbiológicos y de viabilidad celular *L. acidophilus*. Adicionalmente se consideró la determinación del índice de acidez, aunque esta determinación no fue tomada en cuenta para la determinación de la vida útil del producto, puede servir de valiosa información sobre posibles alteraciones en alguna de las características del mismo, relacionada fundamentalmente con la detección de un sabor ácido o la sinéresis.

La comisión encargada de la evaluación sensorial estuvo formada por ocho catadores entrenados en este tipo de producto cada uno de los cuales emitía un criterio

basándose en términos de acepto–rechazo. Se le solicitó a los evaluadores que indicaran en la boleta la causa del rechazo (alteraciones en el sabor, olor, consistencia, entre otras). Los lotes se consideraron rechazados siempre que se alcanzó en el dictamen el número mínimo significativo de juicios fallo (muestras rechazadas) para  $\alpha = 0,1$  dada por una distribución binomial  $p < 0,1$  (15). Por tratarse de un producto perecedero se decidió efectuar las determinaciones de acidez y la evaluación sensorial diariamente.

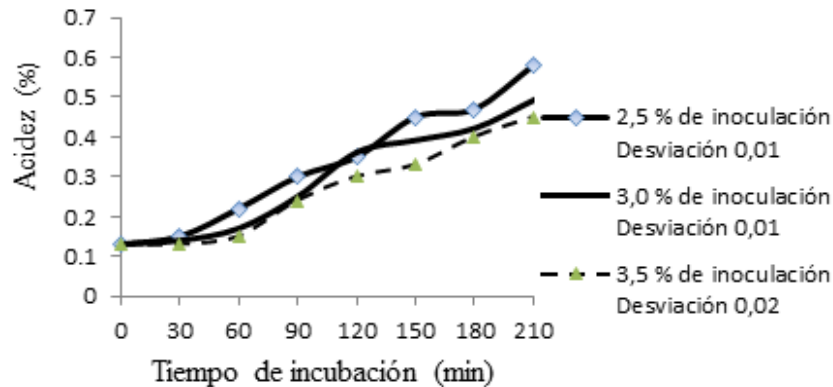
Desde el punto de vista microbiológico, las determinaciones de los indicadores conteo total de microorganismos coliformes, mohos y levaduras, así como la viabilidad celular del microorganismo probiótico, se efectuaron cada 72 h y una vez aparecido algún rechazo, diariamente hasta el fallo. Para la aceptación o rechazo de lote el número de muestras a tomar y los parámetros microbiológicos son los establecidos en la norma cubana correspondiente (16), mientras que la viabilidad celular deberá resultar superior al mínimo terapéutico establecido (17).

Para la estimación de la durabilidad se asumió que el tiempo de vida útil de la leche fermentada se distribuye probabilísticamente de acuerdo a la Ley de Weibull. Para su ajuste fue utilizada la técnica de riesgo para datos incompletos de fallo (18) admitiendo 5 % de unidades defectuosas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Fig. 1 presenta la cinética de acidificación del cultivo de Bioyogur a los diferentes porcentajes de inoculación. Se puede apreciar como a medida que transcurre el tiempo de coagulación aumenta la acidez, comportamiento lógico pues, al no estar presentes en el medio sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano, hay una producción importante del producto mayoritario del metabolismo fermentativo de esta bacteria, el ácido láctico, lo que se traduce en un incremento en la acidez.

Se aprecia además, en la medida que aumenta el porcentaje de cultivo, un aumento en el tiempo de coagulación ya que el momento seleccionado para considerar finalizada la etapa de incubación (0,45 a 0,50 % de acidez) se alcanzó a valores de inoculación del 2,5 % entre los 150 y los 180 min, mientras que a valores de inoculación del 3,0 y 3,5 % se necesitaron entre 180 a 210 min. El menor poder acidificante del cultivo



**Fig. 1. Cinética de acidificación del cultivo Bioyogur a los diferentes niveles de inoculación.**

alternativo de Bioyogur al 3,0 y 3,5 % de inoculación, pudiera relacionarse con una mayor fragmentación o hidrólisis de las proteínas durante la etapa de incubación en sus respectivos aminoácidos (proteólisis), lo que provocaría cierto efecto tampón, y por consiguiente determinada inhibición en el desarrollo de la acidez (2).

A las 24 h de producidas las leches fermentadas y para los tres niveles de inóculo ensayados, los niveles de acidez desarrollados cumplimentaron los valores especificados en la correspondiente norma de calidad (18).

Aunque en la característica sabor, las puntuaciones alcanzadas resultaron satisfactorias ( $> 4$  para una evaluación cualitativa del producto de buena a muy buena) para los tres niveles de inóculo en estudio, se observaron valores menores a cuatro puntos en la característica textura, a valores de inoculación de 3,0 y 3,5 %. De forma general, los catadores manifestaron a estos niveles de inoculación una afectación en la consistencia de la leche fermentada al evaluar este atributo sensorial de marcado, como probable derivación de que estos niveles de cultivo indujeron una mayor producción de mucopolisacáridos que motivaron un incremento en la consistencia de las leches fermentadas que influyó negativamente en la calidad sensorial de las mismas (3, 7). Considerando que el momento seleccionado para considerar finalizada la etapa de incubación se alcanzó entre los 150 y los 180 min, a niveles de inoculación del cultivo del 2,5 % necesitando los valores de inoculación del 3,0 y 3,5 % entre 180 a 210 min y que solo al nivel más bajo de inoculación la puntuación de la característica textura cumplimentó la restricción impuesta, se decidió la selección del 2,5 % de inoculación para las posteriores etapas del trabajo.

Los resultados en la selección del nivel de emulsión de naranja, tomando en consideración el número de catadores, los niveles de emulsión y el riesgo escogido  $F$  [ $F$  calculada (8,85  $>$   $F$  crítica (6,25))] de la prueba de Friedman, demostraron para 95 % de probabilidad y  $\alpha = 0,05$ , que existieron diferencias consistentes entre las sumas de rango y por ende, hubo diferencias entre las muestras. Mediante el cálculo de la diferencia mínima significativa para tres muestras y ocho evaluadores se logró concluir que la muestra diferente es la que considera una proporción de emulsión de naranja de 0,15 %. De forma general, a los valores medio y alto de la emulsión, los evaluadores detectaron un sabor amargo, y un olor intenso como probable derivación de una proporción excesiva de la dosis de emulsión que provocó una afectación importante en las puntuaciones asignadas y por consiguiente en su calidad sensorial.

La Tabla 1 muestra las características composicionales y la evaluación sensorial de la leche fermentada desarrollada. La composición en materia proteínica, materia grasa y cenizas se corresponde con la proporción de leche en la formulación final. El contenido en hidratos de carbono está en correspondencia con el de la lactosa que aporta la leche y el porcentaje de azúcar añadido en 8 %. La puntuación alcanzada en la evaluación sensorial global al resultar superior a los 19 puntos permite una evaluación cualitativa de excelente.

La Tabla 2 informa los resultados microbiológicos de la leche fermentada probiótica. Los indicadores microbiológicos resultan en concordancia con las especificaciones establecidas (18), para un máximo de microorganismos coliformes de  $10^2$  ufc/g y  $5 \times 10^2$  ufc/g

**Tabla 1. Características de la leche fermentada desarrollada**

| Constituyente                 | Valor (desviación estándar) |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Humedad (g/100 g)             | 77,6 (0,06)                 |
| Proteínas (g/100 g)           | 3,9 (0,03)                  |
| Grasa (g/100 g)               | 5,8 (0,04)                  |
| Hidratos de carbono (g/100 g) | 12,1 (0,01)                 |
| Cenizas (g/100 g)             | 0,6 (0,02)                  |
| Energía (kJ/100 g)            | 478                         |
| Evaluación sensorial          |                             |
| Puntuación                    | 19,7                        |

**Tabla 2 Resultados de los conteos microbiológicos**

| Indicador                   | Valor               |
|-----------------------------|---------------------|
| Coliformes (ufc/g)          | < 10                |
| Hongos filamentosos (ufc/g) | < 10                |
| Levaduras (ufc/g)           | < 10                |
| Viabilidad celular (ufc/g)  | 7 x 10 <sup>9</sup> |

para mohos y levaduras. El conteo en células viables, *L. acidophilus* al resultar superior al mínimo terapéutico de 10<sup>7</sup> establecido (17) demuestra que el probiótico aporta sus propiedades dieto terapéuticas con las ventajas que esto presupone.

De forma general, en la medida en que transcurrió el estudio de durabilidad, y en todos los lotes en análisis, algunos catadores comenzaron a detectar un sabor ácido en el producto que se fue intensificando en la medida que el estudio avanzó. Como resultado de este incremento en la acidez, se detectó además la sinéresis por los evaluadores, ambas afectaciones provocaron el rechazo de los lotes y la conclusión del estudio de durabilidad. El incremento de la acidez de la leche fermentada pudiera relacionarse con el hecho de que las bacterias ácido lácticas, aunque más lentamente, continúen su actividad metabólica a pesar de la baja temperatura de conservación 4 °C, produciendo ácido láctico con la consecuente acidificación del medio. La detección del sabor ácido resultó en concordancia con los valores de acidez como ácido láctico determinados al finalizar el estudio de durabilidad de 1,30 % que resulta muy superior al máximo establecido (18).

La durabilidad estimada para el producto conservado a 4 °C, y envasado en potes de polipropileno de 400 mL de capacidad seleccionando el límite inferior del percentil del 5 % fue establecida en 18 días, resultados similares a los obtenidos en estudios de durabilidad de leches fermentadas (17, 19).

## CONCLUSIONES

Es posible obtener una leche fermentada aromatizada a partir de leche entera de búfala por adición de 2,5 % de cultivo alternativo de Bioyogur, 0,15 % de emulsión de naranja y 8 % de azúcar, con adecuadas características sensoriales, composicionales y de calidad higiénico sanitaria. La vida útil de la leche fermentada en envases de polipropileno de 400 mL de capacidad conservada a 4 °C fue de 18 días, durante ese período el conteo *L. acidophilus* se mantuvo en el orden de 10<sup>8</sup> ufc/mL (superior al mínimo terapéutico establecido de 10<sup>7</sup>) lo que demuestra que el cultivo probiótico aporta sus propiedades dieto terapéuticas con las ventajas que esto presupone.

## REFERENCIAS

1. Iñiguez C, Rodríguez T, Valdés M. Utilización de cultivos probióticos en leche fermentada de búfala. Actas en: Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICTA 13); 2016 Jun 6-10; La Habana, Cuba. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; 2016. pp. 715-22.
2. FAO Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales (Internet). Disponible en: [www.fao.org/3/a-a0512s.pdf](http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf) 2006. Acceso 19 enero 2019.
3. Jiménez M. Efecto de la temperatura y la fuente de carbono sobre las propiedades fisicoquímicas del yogur elaborado con cepas productoras de ex polisacáridos (tesis de maestría). Veracruz: Universidad Veracruzana. Disponible en <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/tesis-ca-Beatrizbv-14012015>. Acceso 19 agosto 2019.
4. Martínez-Sánchez J. Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos (Memoria tesis doctoral) Oviedo: Universidad de Oviedo. Disponible en <https://digital.csic.es/bitstream/>. Acceso julio 2019.
5. Patiño M. La leche de búfala contra la leche de vaca (Internet) Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar/informacion-tecnicas-de-razas-de-bufalos-53-leche](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion-tecnicas-de-razas-de-bufalos-53-leche). Acceso mayo de 2017.
6. González K. ¿Sabías que existen dos tipos de leche y que estas pueden afectar de manera distinta tu salud? (Internet). Disponible en: [zoovetempasion.com/ganaderia/tipos-de-leche/](http://zoovetempasion.com/ganaderia/tipos-de-leche/). Acceso julio de 2019.
7. Marín B. Manual Práctico de Lactología. México: Universidad Autónoma de Méjico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2015.
8. NC ISO11869. Determinación de acidez titulable. Método potenciométrico. Cuba; 2006.
9. Instrucción S.C.C 2.13.01.01-1. Procedimiento analítico de evaluación sensorial. Procedimiento analítico general para productos de la industria láctea cubana. Cuba; 2006.
10. NC ISO 8587. Análisis sensorial — Metodología — Ordenamiento. Cuba; 2008
11. AOAC Official Methods *Official Methods of Analysis*. Ed 20<sup>th</sup>, Arlington, VA, 2016
12. NC-ISO 4832. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía General para la enumeración de los coliformes. Técnica de placa vertida. Cuba; 2013.
13. NC: 1004. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía General para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica a 25 °C. Cuba; 2014.
14. NC-ISO 7889. Enumeración de microorganismos característicos y la viabilidad celular. Cuba; 2009.
15. Cantillo J, Fernández C, Núñez de Villavicencio M. Durabilidad de los Alimentos. Método de Estimación. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia; 1994.
16. NC 585. Contaminantes microbiológicos en alimentos — Requisitos sanitarios. Cuba; 2017.
17. García H, Paz T, Tejedor, R Rodríguez O. Lactobacilos probióticos en una leche fermentada. *Alimentaria* 2004; (359):54-8.
18. Codex Stan 243. Norma del CODEX para leches fermentadas. 2003.
19. M'Boumba A, Iñiguez C. Desarrollo de una leche fermentada a partir de leche semidescremada de búfala, con adición de cultivo de *Lactobacillus acidophilus*. *Alimentaria* 2014; (241):54-8.