

## **Viabilidad de un aislado nativo de *Lactobacillus brevis* en una bebida láctea Fermentada**

Blanca Cecilia Salazar Alzate(1), Olga Inés Montoya Campuzano(2), José Uriel Sepúlveda Valencia(3)

(1) Química Farmacéutica, Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Magíster en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Profesora Asociada Universidad Nacional de Colombia, Docente Ocasional Universidad de Antioquia

(2) Bióloga Ingeniera de Alimentos, Magíster en Ciencias con énfasis en Microbiología, Profesora Asociada Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

(3) Administrador de Empresas, Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología y la Planta de Lácteos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Correspondencia: Blanca Cecilia Salazar A. Email: [bsalazar@unalmed.edu.co](mailto:bsalazar@unalmed.edu.co),  
Dirección: Carrera 75 # 30A-20, Medellín, Colombia

**Titulillo:** Viabilidad *L. brevis* en bebida de avena.

### **Resumen**

En esta investigación se trabajó con un aislado nativo de *Lactobacillus brevis* obtenido de leche fermentada, al cual se le midió la viabilidad en dos bebidas lácteas fermentadas, las cuales se diferenciaban por la presencia de harina de avena al 0.5% p/v como ingrediente prebiótico, con el fin de observar su efecto en la viabilidad del probiótico. Después de elaboradas cada una de las bebidas, se les realizó un seguimiento de pH y %p/v de acidez (expresada como ácido láctico), durante los días 2, 7, 14 y 21 y la prueba de viabilidad en los días 7, 14 y 21. El *Lactobacillus brevis* presentó viabilidad en ambas bebidas, al obtenerse recuentos mayores de  $10^6$  UFC/mL hasta el día 21, encontrándose un aumento en la velocidad de crecimiento del día 7 al 14 en la bebida con avena, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa.

**Palabras clave:** Probióticos, prebióticos, viabilidad, *Lactobacillus brevis*, avena.

## Summary

The objective of this research was to test the viability of a native isolate of *Lactobacillus brevis* in two fermented milky drinks: a drink without prebiotic ingredient and another drink with oat flour (0.5%, p/v) as prebiotic ingredient. The viability of *L. brevis* was tested at 7, 14, and 21 after inoculation. Drink pH and lactic acid concentration was measured as a function of time (2, 7, 14, and 21 days after inoculation). The isolate was viable in both drinks because its counting plates was higher than  $10^6$  CFU/mL until day 21<sup>st</sup>. Between the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day, the rate of growth was higher in the drink that included oat flour, however, at the day 21<sup>st</sup> the colony density was similar in both drinks.

**Key words:** Probiotics, prebiotics, viability, *Lactobacillus brevis*, oat.

**Recibido: 30-05-2005 Aceptado: 17-01-2006**

## Viability of a native isolate of *Lactobacillus brevis* in a fermented milky drink

### Introducción

En la actualidad, los microorganismos probióticos, principalmente Lactobacilos y Bifidobacterias han despertado un gran interés por la importancia que tienen en la salud de las personas que consumen alimentos que contienen estos microorganismos. Se han reportado resultados positivos en la prevención de infecciones quirúrgicas(1) protección contra infecciones respiratorias (2)(3) la producción de sustancias con actividad anticancerígena frente al cáncer de colon (4)(5), disminución en la incidencia del eczema atópico (6)(7) mejoramiento en el sistema inmunológico al promover la barrera de defensa endógena del intestino y desplazar la microbiota patógena gastrointestinal en el consumidor, se utilizan en tratamientos contra infecciones gastrointestinales(8)(9).

Para lograr sus efectos, estos microorganismos deben presentar y mantener, unas características que garanticen su crecimiento y supervivencia en el alimento, como también durante su tránsito a través del estómago e intestino delgado. La primera característica es que sean viables, ésta es la capacidad que tienen los microorganismos probióticos de permanecer vivos, tanto en el alimento como en el intestino del consumidor, por un tiempo determinado. En Colombia, se ha establecido que en bebidas fermentadas este tiempo debe ser mínimo de 21 días (10), el cual depende del método de producción y de la cepa utilizada (11).

Además de garantizar su viabilidad, ellos deben tolerar un pH=2 y la acción de proteasas del estómago, sobrevivir y crecer en presencia de sales biliares (11)(12), para luego adherirse a la mucosa intestinal y de esta manera estimular el sistema inmunológico; ésta capacidad de adherirse es un prerrequisito para la colonización del intestino, porque es en la pared intestinal donde el microorganismo va a competir con la microbiota patógena por nutrientes y espacio físico, como también la inhibición de la proliferación en las células cancerígenas Caco- 2 (11)(13)(14).

Se ha encontrado que los prebióticos son la fuente de carbono y de energía de los probióticos por ser carbohidratos de cadena corta, algunas veces reconocidos como oligosacáridos, no digeribles por las enzimas del epitelio intestinal o de las glándulas anexas debido a su estructura química, y llegan al intestino grueso donde alcanzan a

estar disponibles para la fermentación por las bacterias sacarolíticas, que son especialmente Lactobacilos y Bifidobacterias, dando origen a compuestos que ejercen efectos funcionales sobre la mucosa del tubo digestivo (15). Algunos fructooligosacáridos, isomaltooligosacáridos, oligomato, palatinosa, polidextrosa, polidextrina, raftilina, presentes en: soya, avena, cebolla, ajo, banano, puerros, derivados del trigo, achicoria, espárrago, alcachofa entre otro, se les considera prebióticos. (16)

Cuando se incorporan a la dieta en cantidades determinadas, alteran la microbiota intestinal disminuyendo los recuentos de coliformes, bacteroides y cocos, y aumentando las bacterias probióticas hasta en diez veces, además, modifican la actividad metabólica del colon, logrando una disminución del pH y un incremento en el contenido fecal de ácidos grasos de cadena corta como el acético, propiónico y butírico. El butirato aumenta el grosor de la pared del colon e intestino delgado, estimula el crecimiento de la mucosa del colon y aumenta su flujo sanguíneo, inhibe el crecimiento de líneas tumorales epiteliales de origen colónico, induce la diferenciación de sus células y la apoptosis, entre otros (15)(16)

En estudios hechos en simuladores del intestino humano, utilizando como sustrato productos de avena fermentados, se encontró que tanto los lactobacilos como las bifidobacterias colonizaron y se mantuvieron por varias semanas; y en el caso de estas últimas se incrementó la producción de los ácidos: acético, propiónico y butírico, lo que incide sobre la implantación de probióticos e inhibe el crecimiento de otro tipo de microorganismos (13)(17)(18).

Por todos los beneficios anteriormente mencionados y por el poco estudio reportado de la especie *Lactobacillus brevis* en el ámbito internacional y nacional, se planteó como objetivo, estudiar la viabilidad de este aislado nativo en dos bebidas de leche fermentada con avena como prebiótico y sin prebiótico y además comparar la incidencia en esta viabilidad. Se escogió la avena como prebiótico porque es un alimento de fácil acceso para grupos poblacionales de escasos recursos, además de presentar un sabor agradable para niños y adultos.

## **Materiales y Metodos.**

Se trabajó con un aislado nativo proveniente de leche cruda fermentada, que presentó características bioquímicas similares en un 96.3% a *Lactobacillus brevis* cuando se le realizó la prueba en un kit API 50 CHL Medium Ref. 50410. Además, mostró resistencia a pH=2 y sales biliares 0.3% p/v, dos condiciones importantes en los microorganismos probióticos. Todos los ensayos se hicieron por cuadruplicado

## **Preparación de la muestra**

Se tomó 1mL de un cultivo de *Lactobacillus brevis*, a una concentración de  $27 \times 10^8$  UFC/mL según la escala de Mac Farland inoculado en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) Marca Merck Ref.1.10661 y se adicionó a 9mL de leche pasteurizada, se dejó incubando bajo condiciones de anaerobiosis a 37 °C por 48 horas. Se hizo un proceso de adaptación del inóculo hasta completar 1 Litro de la bebida y se dejó en fermentación a una temperatura de 37° C hasta obtener una acidez entre 0.4 y 0.5% p/v expresada como ácido láctico. La bebida con prebiótico tuvo el mismo

procedimiento, pero adicionalmente, se agregó harina de avena a una concentración de 0.5% p/v.

Después de alcanzar el % de acidez en ambas bebidas, se almacenaron a 4° C, por 24 horas. Se envasaron en frascos de vidrio, y se les hizo un seguimiento de pH y % acidez los días 2, 7, 14 y 21 y recuento de UFC/mL *Lactobacillus brevis*, los días 7, 14 y 21.

La acidez se determinó por titulación ácido base reportando como % de acidez, el volumen de NaOH.

### **Análisis estadístico**

A los datos obtenidos en la medición de pH, % acidez, y el recuento de UFC/mL de *Lactobacillus brevis* realizados a los dos tratamientos, se les aplicó la prueba t-student, para evaluar si había diferencia estadísticamente significativa para los dos tratamientos [Tablas 1,2](#) y [Figura 1](#).

**TABLA 1.** Comparación de medias para pH

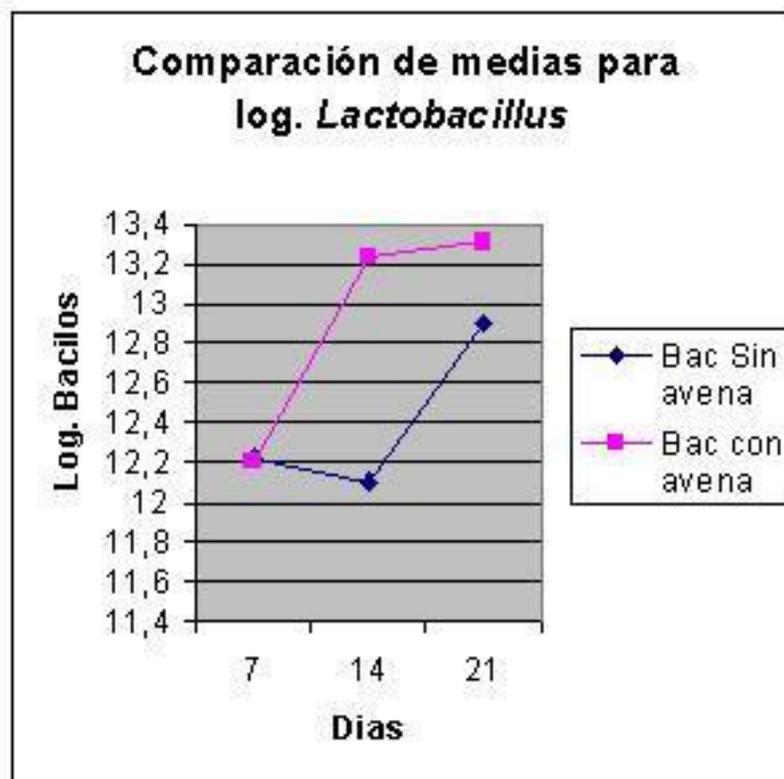
<b>DÍA</b>	<b>SIN AVENA</b>	<b>CON AVENA</b>	<b>Tc</b>	<b>p (VALOR)</b>
<b>2</b>	5.14	5.14	0	1.0
<b>7</b>	4.39	4.44	-1.61	0.159
<b>14</b>	4.37	4.38	-0.70	0.510
<b>21</b>	4.38	4.34	5.28	0.0019 **

**\*\* DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA**

**TABLA 2.** Comparación de medias para Acidez

DÍAS	SIN AVENA	CON AVENA	Tc	p (VALOR)
2	0.572	0.572	0	1.0
7	0.727	0.720	1.19	0.278
14	0.818	0.875	-6.38	0.00070 **
21	0.77	0.91	-12.12	0.000019 **

\*\* DIFERENCIA ALTAMENTE SIGNIFICATIVA



### Resultados

En la [Tablas 1](#) se puede observar que el pH en el día dos, es igual en los dos tratamientos y empieza a descender rápidamente para estabilizarse a partir del día 7, y con la prueba t se aprecia una diferencia altamente significativa en los dos tratamientos para el día 21 ( $p < 0.05$ ). En la [tabla 2](#), se puede evidenciar un aumento

hasta el día 14 y luego trata de estabilizarse; la prueba t muestra una diferencia altamente significativa para los días 14 y 21 ( $p < 0.05$ ).

En la [Tabla 3](#) y en la [Figura 1](#), se puede observar el incremento en el recuento del microorganismo, en ambas bebidas, sin embargo, en la bebida con la avena el crecimiento fue más rápido. Aunque, al aplicar la prueba t-student, al recuento en Log de *Lactobacillus*, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tratamientos, teniendo en cuenta que se partió de un inóculo de  $27 \times 10^8$  UFC / mL de *Lactobacillus brevis*.

**TABLA 3.** Recuento Promedio de UFC/mL de  
*Lactobacillus brevis*

DÍAS	SIN AVENA	CON AVENA
7	$1.689 \times 10^{12}$	$1.615 \times 10^{12}$
14	$2.5125 \times 10^{12}$	$3.8 \times 10^{13}$
21	$1.044 \times 10^{13}$	$4.28 \times 10^{13}$

### Discusión

El aumento en el recuento microbiano, influyó en la disminución del pH y en el incremento de la acidez, debido a la fermentación que realizan los *Lactobacillus*, sobre los oligosacáridos presentes en la avena produciéndose una mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta, razón por la cual hubo diferencias significativas. (15)(16)(17)

Aunque, no se encontró efecto significativo de la avena sobre la viabilidad del *Lactobacillus brevis*, se presentó un aumento más rápido en el recuento de éstos, porque el prebiótico es una fuente de carbono y de energía para su crecimiento, estos resultados son similares a los obtenidos por Jaskari, J. et al. (18)

El microorganismo cumple con el requisito de viabilidad al presentar recuentos mayores de  $10^6$  durante los 21 días de seguimiento. (10)

### Conclusiones

El aislado nativo de leche fermentada, identificado como *Lactobacillus brevis*, y utilizado para elaborar una bebida fermentada sin y con avena como ingrediente prebiótico, presentó viabilidad en ambas bebidas, al permanecer con un recuento mayor de  $10^6$  UFC/mL durante 21 días de seguimiento. No hubo efecto de la avena en el recuento microbiano aunque, esta influyó positivamente en la velocidad de su crecimiento

## Referencias

1. Strauss E. Fighting bacterial fire with bacterial fire. *Science* 2000; 290: 2231-3. [ [Links](#) ]
2. Hatakka K, Sauilahti E, Ponka A, Meurman J, Poussa T, Nase L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *British Medical Journal* 2001 Jun 2; 322: 1327-40. [ [Links](#) ]
3. Alvarez S, Herrero C, Bru E, Perdigon. Effect of *Lactobacillus casei* and yogurth administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. *J Food Prot* 2001; 64(11):1768-74 [ [Links](#) ]
4. Marteau P, De Vresse M, Cellier J, Christophe, Schrezenmeir. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 Suppl: 430-6. [ [Links](#) ]
5. Wolloswski I, Rechkemmer G, Pool B. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;73 Suppl: 451-54. [ [Links](#) ]
6. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isoulari E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001 April 7; 357:1076-9 [ [Links](#) ]
7. Isoulari E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salmein S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin. Exp. Allergy* 2000; 30(11):1604-10. [ [Links](#) ]
8. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt C. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002 June 8; 324:1361 [ [Links](#) ]
9. Jenkins B, Holsten S, Bengmark S, Martindale R. Probiotics: A Practical Review of Their Role in Specific Clinical Scenarios. *Nutr Clin Pract* 2005; 20 (2): 262-70 [ [Links](#) ]
10. Ministerio de Salud. Artículo 10 de la Resolución 2310 de 1986 de las clases de leches fermentadas. [ [Links](#) ]
11. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isoulari E, Salmein S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 Suppl: 393- 8. [ [Links](#) ]
12. Jacobsen C.N, Nielsen V, Rosenfeldt E, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4949- 56. [ [Links](#) ]
13. Alander M, Satoraki R, Korpela R. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus GG*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 351-4. [ [Links](#) ]

14. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. Am J Clin Nutr 2001; 73 Suppl: 399- 405. [ [Links](#) ]

15. Brunser O. Prebióticos, su significado para la salud humana. Unidad de Gastroenterología. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Universidad de Chile 2001. Pag. 17. [ [Links](#) ]

16. Cummings H, MacFarlane G, Hans E. Prebiotic digestion and fermentation. Am J Clin Nutr 2001; 73 Suppl: 415-20. [ [Links](#) ]

17. Kontula P, Jaskari J, Nollet L. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota. Appl Microbiol Biotechnol 1998; 50: 246-52. [ [Links](#) ]

18. Jaskari J, Kontula P, Siitonen A.. Oat  $\beta$ -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. Appl Microbiol Biotechnol 1998 ; 49:175-81.