

Modelo de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica en una base probiótica y simbiótica

Sánchez Jáuregui Claudio Esteban ^{a1}; Rosales Medina María Fernanda^b; Bustamante Gavilánez Ana Cristina^a

^a Laboratorio de Biotecnología, UDALAB, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay. Av. 24 de Mayo 7-77 y Hernán Malo. Cuenca – Ecuador.
csanchez@uazuay.edu.ec

^b Laboratorio de Microbiología, UDALAB, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del Azuay. Av. 24 de Mayo 7-77 y Hernán Malo. Cuenca – Ecuador.
mrosales@uazuay.edu.ec

Resumen. El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar una leche fermentada con acidez estandarizada y larga vida a partir de leche con hidrólisis controlada de lactosa por vía enzimática. Empleando cultivos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*. Se evaluó la influencia de los productos de hidrólisis de la lactosa en la formación de ácido láctico durante la fermentación y postfermentación, además se determinaron los indicadores físico-químicos, microbiológicos y los atributos sensoriales de las formulaciones desarrolladas. Se seleccionaron las mejores formulaciones a partir de un diseño experimental de mezclas, para su evaluación en la producción a escala piloto y se evaluó la vida de estante de las leches hidrolizadas fermentadas.

Palabras Clave: postfermentación, probiótico, Lactobacillus, bifidumbacterium.

1 Introducción

La lactosa es un disacárido que no puede asimilarse en su forma natural, es necesario hidrolizarla para poder asimilar los monómeros que se generan: glucosa y galactosa. La capacidad de producir la β -galactosidasa, enzima responsable de la hidrólisis en el intestino delgado, disminuye a medida que el individuo crece, y cuando llega a la edad adulta es probable que haya perdido parcial o totalmente la actividad de hidrólisis en su intestino. Esto provocará que cuando consuma lactosa, ya sea en leche o sus derivados, se presente un cuadro de flatulencia, dolor abdominal y/o diarrea, denominado “intolerancia a la lactosa” (López y col., 1996).

Debido a su importancia tecnológica, la hidrólisis enzimática de la lactosa para la elaboración de productos deslactosados o bajos en lactosa ha sido extensamente estudiada desde diversos puntos de vista. Se han estudiado las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimos, efecto de algunos componentes de la leche sobre su actividad, etc.), sus usos y las fuentes de donde pueden ser obtenidas (Fonseca y col; 2003; Fogler 2001). Desde entonces, se han llevado a cabo relativamente pocas investigaciones para explicar este fenómeno.

Los microorganismos aerobios ocasionan una serie de cambios químicos en la leche en donde los tres componentes más afectados son lactosa, proteínas y grasa. Los carbohidratos son el primer nutriente que metabolizan los microorganismos para

obtener su energía, seguido de proteínas y finalmente lípidos. Los carbohidratos se oxidan con el fin de proporcionar energía, la glucosa es el monosacárido más frecuente en la naturaleza como azúcar libre, para obtener glucosa en la leche el disacárido lactosa es hidrolizado en dos monosacáridos glucosa y galactosa en presencia de la enzima β -galactosidasa.

Se han realizado diversas investigaciones con relación a la hidrólisis enzimática de la lactosa, incluyendo las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimas, efecto de algunos parámetros, etc.), su utilización, y las diferentes fuentes de donde se pueden obtener, que son: hongos como *Aspergillus oryzae* (Park y col., 1987) o *Aspergillus niger* (Jakubowski y col., 1985).

Las características y propiedades de las lactasas varían dependiendo de la fuente, por ejemplo, las de origen fúngico presentan mayor termo-estabilidad que las de levadura y bacterias, y su pH óptimo de actividad cae dentro del rango ácido (4,5-6,5) y temperatura óptima entre 35 y 55°C (García Garibay y Gómez Ruíz, 1996; Jackson y Jelen, 1989; Park y col., 1979). Las lactasas de levadura y bacterias son en general más termolábiles, y su pH óptimo de actividad es cercano al neutro, por lo que se les denomina lactasas neutras. Estas lactasas tienen una temperatura óptima alrededor de 37°C, y muestran una pérdida considerable de actividad a pH 5,3, al elevar la temperatura a 55°C, o bien la pierden completamente a pH 4,5 (Jackson y Jelen, 1989).

En lo referente a las LAB las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más comúnmente reconocidas como probióticos. Las bacterias del ácido láctico, dentro de esta clasificación se encuentran las especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus thermophilus* no se incluyen al género *Bifidobacterium* ya que no produce la fermentación de alimentos y es taxonómicamente diferente. Se trata de una clase de bacterias unidas por una gran variedad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas: fermentadoras no patógenas, no toxigénicas.

En el presente trabajo se determinó la cinética de la fermentación, postfermentación y la vida de estante máxima de una leche fermentada con un cultivo probiótico, constituido de las mezclas de las cepas *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium breve*, partiendo de una leche con hidrólisis controlada de lactosa.

Para el desarrollo de este estudio se planteó la hipótesis de que en la elaboración de leches fermentadas, la hidrólisis controlada previa a la fermentación de la lactosa permitirá desarrollar un proceso fermentativo y postfermentativo con acidez controlada debido a la inhibición enzimática que ejerce la galactosa en el transporte de la lactosa residual, conllevando una disminución del tiempo de fermentación y extensión del tiempo estante del producto (ESL).

1.1 Género *Bifidobacterium* y su acción probiótica

Existen 24 especies de *Bifidobacterium* hasta ahora reconocidas, 9 aisladas de los seres humanos: *Bif. bifidum*, *Bif. longum*, *Bif. infantis*, *Bif. breve*, *Bif. adolescentis*, *Bif. angulatum*, *Bif. catenulatum*, *Bif. pseudocatenulatum* y *Bif. dentium*. Las bifidobacterias tienen ahora una larga historia de uso seguro como complementos dietéticos (*Bif. adolescentis*, *Bif. animalis* / *Bif. lactis*, *Bif. bifidum*, *Bif. breve*, y *Bif. longum* / *infantis*) específicamente tienen estatus GRAS (generalmente considerado como seguro).

Los microorganismos con la mejor oportunidad de pasar por el estómago y el intestino delgado y colonizar el medio son aquellos endógenos o propios de la especie aislada, esto hace que se centre la atención en el género *Bifidobacterium* ya que son extraídos de los animales y los seres humanos.

1.2 Género *Lactobacillus* y su acción probiótica

Este género se encuentra dentro de la clasificación de las LAB, diferenciado por su capacidad de fermentación de los glúcidos pero presentan algunas características comunes. Son Gram-positivas habitualmente inmóviles, no esporuladas, ácido tolerantes, catalasa y oxidasa-negativas, nitrato reductasa negativas. Su capacidad de biosíntesis es débil, lo que explica su incapacidad de síntesis, para diversos aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas y ácidos grasos, pero también su metabolismo fermentativo (los núcleo hemo de las porfirinas), están normalmente desprovistas de citocromos y en consecuencia son incapaces para cualquier respiración aerobia o anaerobia. Por lo tanto estas bacterias micro-aerófilas, son capaces de fermentar en bajas concentraciones de oxígeno.

Se han realizado pocos estudios, algunos de ellos recientes, que confirman que el consumo de *L. rhamnosus* GG reduce la duración de la diarrea, en particular de la gastroenteritis por rotavirus. En la prevención de la infección nosocomial por rotavirus, un estudio doble ciego realizado en niños demostró que una fórmula suplementada con *B. breve* y *L. acidophilus* redujo la incidencia de la diarrea adquirida en los hospitales, en comparación con una formulación estándar. Muy recientemente se ha realizado un estudio multicéntrico en Europa, en el cual se observó que la administración simultánea de una solución hipotónica de rehidratación oral y *Lactobacillus* GG, en niños con diarrea aguda, redujo la duración de la diarrea y la estancia en el hospital (Falk y col; 2008).

1.3 Control de la fermentación y postfermentación

Uno de los problemas durante la fermentación y postfermentación es la falta de control de estos procesos a temperaturas estándares de almacenamiento, transporte, y estante, produciendo la pérdida de viabilidad y bioactividad de las cepas probióticas utilizadas como tales, generando el retorno del mercado a la industria como pérdidas netas a facturación por no cumplir el tiempo mínimo de vida útil.

La hidrólisis de la lactosa en sus dos monosacáridos por la acción de la enzima β -galactosidasa, puede ser una alternativa para resolver este problema de acidificación no controlada en estante bajo condiciones propias, teniendo en cuenta que se podría cuantificar la glucosa y galactosa resultante de este proceso enzimático, la cual puede ser utilizada como fuente energética por las LAB dando como resultado ácido láctico en el proceso.

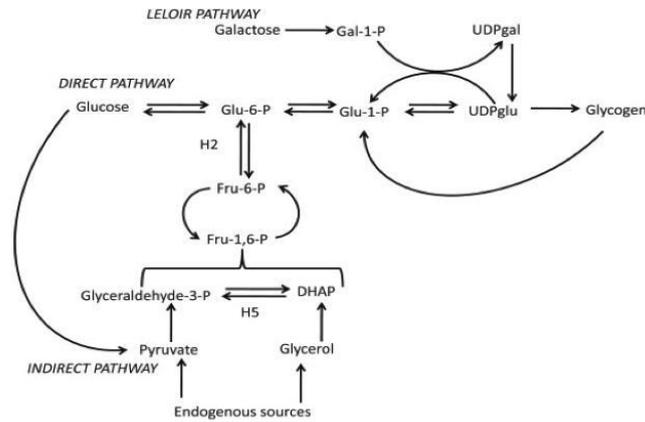


Fig. 1. Ruta indirecta de Leloir de transformación de la glucosa
Fuente: Stephanopoulos G, Aristidou A, Nielsen J. 1998

En este sentido resultaría importante la determinación del porcentaje idóneo de hidrólisis para el control de la fermentación láctica bajo condiciones estándares y a su vez determinar su viabilidad y funcionalidad al fin de vida útil.

Al respecto no se ha encontrado alguna publicación relacionada con la estandarización de la acidez en la fermentación y postfermentación.

1.4 Cinética enzimática

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de reacciones biológicas, su nomenclatura varía de acuerdo a la recomendación de la comisión internacional de enzimas. Este sistema divide a las enzimas en seis clases de acuerdo al tipo de reacción catalizada.

Son capaces de manipular otras moléculas, llamadas sustratos. Un sustrato es el que puede ser capaz de unirse al centro catalítico de las enzimas y que esta a su vez lo reconozca y llegar a transformarse en una serie de pasos determinado mecanismo enzimático. Algunos tipos de enzimas tienen la posibilidad de unir varios sustratos distintos y/o liberar diversos productos.

Las reacciones químicas pueden clasificarse de diferentes maneras, una de ellas es una base cinética, es decir por el orden de reacción, aquí podemos encontrar reacciones de orden cero, primer, segundo y tercer orden según como resulte influida la velocidad de reacción por la concentración de los reaccionantes bajo un conjunto de condiciones determinado.

1.5 Obtención del k_m y la $V_{\text{máx.}}$

La velocidad de reacción que se obtiene a esa alta concentración de sustrato se define como la velocidad máxima ($V_{\text{máx.}}$) de la reacción enzimática bajo las condiciones especificadas. La concentración de sustrato $[S]$, a la semivelocidad máxima de reacción ($\frac{1}{2} V$) se puede determinar de la figura 4 y representa la constante de Michaelis o k_m , la cual es una característica para cada enzima. La inversa de k_m , o $1/k_m$, mide la afinidad de la enzima por el sustrato. Mientras más pequeño sea el valor de k_m , mayor será la afinidad de la enzima por el sustrato.

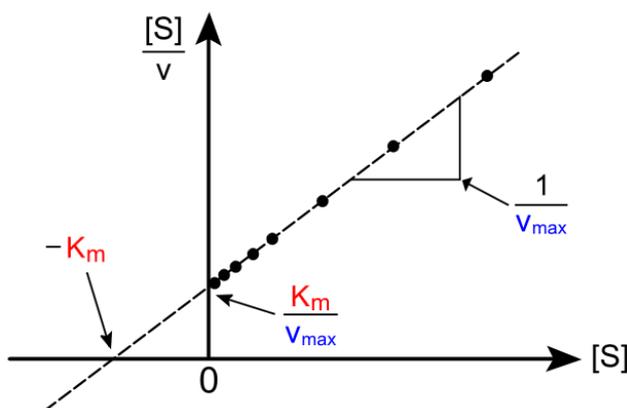


Fig. 2. Cinética enzimática
Fuente: Hanes and Woolf, 1932 (Wikipedia, 2010)

2 Metodología

El trabajo de experimentación se llevó a cabo en los laboratorios certificados de química, microbiología y biotecnología de UDALAB y el laboratorio de procesamiento de lácteos de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

La leche para realizar este trabajo fue recolectada en una hacienda ganadera ubicada en la parroquia Victoria del Portete del Cantón Cuenca.

En las mismas se realizaron análisis de control de acuerdo a lo indicado en la norma técnica ecuatoriana INEN 9:2012 para leche cruda, los cuales se realizaron en los laboratorios de química UDALAB de la Facultad de Ciencia y Tecnología - Universidad del Azuay.

2.1 Tratamiento Térmico de la Materia Prima

Una vez realizados los análisis de control en la leche cruda, esta fue sometida a diferentes tratamientos térmicos, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Temperatura y tiempo de proceso térmico

Leche 1	Leche 2	Leche 3
72°C por 15 seg.	85°C por 30 min.	90°C por 5 min.

Para cada análisis de hidrólisis se recolectaron tres muestras de cada una de las leches tratadas.

2.2 Inoculación de la enzima

Luego de ser sometidas a los diferentes tratamientos térmicos, las muestras de leche fueron almacenadas en refrigeración a una temperatura de 4°C, posteriormente se inocularon cada una de las muestras con la enzima comercial β -galactosidasa a diferentes tiempos y temperaturas.

Tabla 2. Temperatura y tiempo de inoculación de la enzima β -galactosidasa

Temperatura	Tiempo de Inoculación
4°C	12 horas
32°C	2 horas
50°C	0,5 horas

La cantidad de enzima estuvo en función del volumen de leche utilizado en cada muestra, para ello nos basamos en la tabla 3 de dosis estimada de lactasa.

Tabla 3. Dosis estimada de Lactasa

Dosis de ha-lactase (ml/L)	Tiempo de reacción (horas)	Temperatura de reacción (oC)	Grado de hidrólisis (%)
0,3 - 0,5	10	5	20
0,5 - 0,8	4	30	50
2,9 - 4,4	1	40	80

2.3 Análisis de muestras hidrolizadas

2.3.1 Determinación del Porcentaje de Hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó mediante el análisis de descenso en el punto crioscópico.

Este método se fundamenta en la disminución del punto de congelación, el momento que ocurre la hidrólisis de la lactosa, se forman glucosa y galactosa incrementando el contenido de solutos en la solución.

Para este método se utilizó un crioscopio (Funke Gerber, modelo Cryostar I) previamente calibrado, en la que para cada una de las muestras resultantes del proceso de hidrólisis se realizaron lecturas por duplicado para minimizar el porcentaje de error en el resultado de cada una de ellas. El porcentaje de hidrólisis alcanzada se obtuvo a partir de la fórmula 1.

$$\% \text{ Hidrólisis Alcanzada} = 350,77 * (\text{Crioscopía Final}) - \frac{(\text{Crioscopía Inicial})}{0,00285} \quad (1)$$

2.3.2 Cuantificación del Contenido de Lactosa

Para cuantificar el contenido de lactosa se tomó como referencia la Norma Mexicana, NMX-F-219-1972. Para calcular el porcentaje de lactosa se utilizó la siguiente formula (2):

$$\text{mg de Cu}_2\text{O} = \text{volumen titulante} \times 0,1\text{N} \times 63,54 \quad (2)$$

Tabla 4. Equivalencias

1 mol lactosa	4 moles de ácido láctico
360,64 g de lactosa	360,4 g de ácido láctico
69,5 mg de lactosa	50 mg de glucosa
	7,0 mg de galactosa

2.3.3 Formulación de la leche fermentada

Para poder realizar los experimentos respectivos, se formuló una base láctea que contenía: inulina (3 g/L), carragenato (1,5 g/L), citrato de potasio (3 g/L) y politrifosfato de sodio (0,2 g/L)

2.3.4 Diseño Experimental

Como se ha destacado anteriormente, lo que se pretende encontrar es la mejor interacción para la funcionalidad probiótica de un producto fermentado mediante un diseño experimental, en este caso se eligió un diseño centroide simplex aumentado (diseño de mezclas) con 6 puntos espaciados en el perímetro, un adicional de 3 puntos axiales localizados en el interior a medio camino entre el centroide y los vértices y 1 punto en el centro.

Aplica una metodología de planeación y análisis que asegura obtener conocimiento, cuenta con q componentes o ingredientes y cada tratamiento en el experimento consiste en una combinación particular o mezcla de dichos ingredientes, las proporciones en las que participan los componentes de la mezcla deben satisfacer dos restricciones:

$$0 \leq x_i \leq 1, \text{ para cada componente } i;$$

La primera indica que las proporciones tienen que ser cantidades entre cero y uno, y la segunda condiciona a que las q proporciones sumen siempre la unidad, lo cual causa que los niveles de los componentes x_i no sean independientes entre sí (Gutiérrez, 2008).

2.3.5 Desarrollo experimental

Las variables identificadas para realizar las pruebas determinadas en el diseño experimental, fueron tres tipos de bacterias conocidas por sus propiedades probióticas, estas bacterias se tomaron del cepario de microorganismos ATCC del laboratorio de microbiología de UDALAB.

Estas bacterias son: *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) y *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469).

Se determinaron las variables para el diseño de mezclas, se procedió a establecer la distribución de las variables para los experimentos, y las mismas quedaron como se presentan en la tabla 5.

Una vez realizadas las mezclas de las bacterias probióticas en la leche preparada y pasteurizada, se determinó su rendimiento dependiente del crecimiento bacteriano los cuales se encontraban dentro de lo estipulado por la NTE INEN 2395:2011, la cual indica que el mínimo que puede haber de bacterias probióticas es de 10^6 (6 log) UFC/gramo de producto. Se realizaron pruebas de capacidad probiótica, a través de análisis in vitro en el laboratorio de microbiología, estas pruebas fueron: tolerancia al ácido, tolerancia a las sales biliares y actividad antipatógena.

Tabla 5. Diseño experimental de mezclas con las variables identificadas de las BAL

	X1	X2	X3	Rendimiento	Catación del producto final
Número de experimento	<i>Bifidumbacterium breve</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Log UFC/gramo	% de aceptación
1	1	0	0	9,8	71
2	0	1	0	8,3	68
3	0	0	1	8,5	57
4	1/2	1/2	0	7	77
5	1/2	0	1/2	7	80
6	0	1/2	1/2	7,6	77
7	1/3	1/3	1/3	7,5	78
8	1/6	1/6	2/3	7,3	79
9	1/6	2/3	1/6	7	79
10	2/3	1/6	1/6	7,3	82

Para determinar el o los experimentos que serían aceptados, se requirió de un grupo de catadores semientrenados para realizar las pruebas sensoriales. Para esto se aplicó una escala hedónica de 4 a 1, para medir el grado de satisfacción de los catadores en cuanto a aspecto, olor y sabor del producto. De este panel de catación se pudo determinar que los experimentos 5 y 10 fueron los aceptados.

3. Resultados y discusión

En la determinación del mejor proceso de hidrólisis enzimática se realizaron varias pruebas a diferentes temperaturas de pasteurización, ver tabla 1. Los experimentos de hidrólisis se realizaron de acuerdo a lo descrito en la tabla 2. Las dosis de la enzima β -galactosidasa estuvieron en función de lo recomendado por el proveedor, ver tabla 3.

Entre los tres sustratos lácteos se consideró de acuerdo a los resultados obtenidos, que el tratamiento previo de 72°C por 15 segundos fue en el que mejor proceso de hidrólisis se obtuvo.

De los datos obtenidos en la hidrólisis de la leche en el primer tratamiento se realizaron regresiones lineales para las diferentes temperaturas y sus resultados en horas.

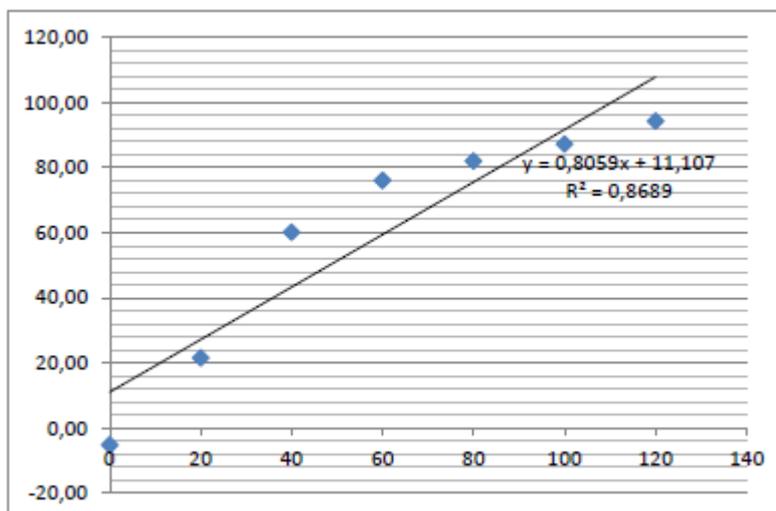


Fig. 3: Hidrólisis de lactosa a temperatura de 32°C por 2 horas.

Una vez realizados todos los tratamientos enzimáticos a diferentes tiempos y temperaturas en el sustrato 1, se tiene que el mejor proceso se dió a un tiempo de 2 horas y 32oC y 0,2 mL de inóculo de enzima, dando como resultado un 94% de hidrólisis y por lo tanto la mejor respuesta posible. Comparando con datos obtenidos por otros autores, incluida la empresa Hansen, productora y comercializadora de la enzima lactasa, a una temperatura de 50oC se obtiene un porcentaje de actividad relativa cercana al 100%. Revisando los resultados obtenidos se observó que a 50oC por 30 minutos se obtiene una hidrólisis cercana al 100% pero con el inconveniente de que la leche se oscurece ligeramente debido a las reacciones de Maillard. Incluso a la temperatura de 32oC se requirió de menor cantidad de inóculo de la enzima, siendo totalmente efectiva.

Tabla 6. Resumen de tiempo, temperatura, cantidad de enzima utilizada y resultados del % de hidrólisis en el primer sustrato.

Tiempo	Temperatura	mL enzima	% hidrólisis
12 h	4oC	0,37	79,5
2h	32oC	0,2	94,3
0,5h	50oC	2,05	93,9

Comparando los diferentes tratamientos de hidrólisis enzimática, se determinó que el mejor proceso es a 32°C por 2 horas o 120 minutos.

De los experimentos que se realizaron con el diseño de mezclas para adicionar las bacterias lácticas y elaborar yogurt, se realizaron determinaciones del REP por duplicado de los experimentos seleccionados por el panel de catación, los cuales fueron los experimentos 5 y 10. En estos experimentos se obtuvieron recuentos en placa (REP) de las bacterias probióticas mayores a 6.6 Log UFC/gramo, como indica la norma técnica ecuatoriana.

Se determinó la capacidad probiótica de las bacterias lácticas adicionadas en el sustrato y que fueron las responsables de producir el yogurt en la leche hidrolizada.

Una de las primeras pruebas fue la tolerancia al ácido, en el cual se probó la capacidad de las bacterias de soportar situaciones extremas como pH bajo y se probó el crecimiento en medios de cultivo con ácido láctico.

Tabla 7: Resultados de la tolerancia al ácido

pH de medio de cultivo MRS adicionado HCl 6M	<i>Lb. acidophilus</i> (log UFC/gramo)	<i>Lb. rhamnosus</i> (log UFC/gramo)	<i>B. breve</i> (log UFC/gramo)	Mezcla de bacterias BAL (log UFC/gramo)
0	8,69	8,58	8,42	7,59
2	<1	<1	<1	<1
%	0	0	0	0
2,5	1,5	<1	1,1	1,36
3	17,2612	0	13,064	17,918
%	2	<1	3	5,2
	23,0149	0	35,629	68,511

Las mezclas de las BAL dieron mejores resultados al encontrarse un porcentaje de supervivencia del 68%.

En la tolerancia a la bilis, las pruebas se realizaron en un medio de cultivo que contiene bilis de buey desecada, en la misma se probó la resistencia o sensibilidad de las bacterias BAL a mantenerse en este tipo de ambientes, propio del sistema digestivo.

Tabla 8: Resultados de la tolerancia a las sales biliares 0.3%

	<i>Lb. acidophilus</i> (log UFC/gramo)	<i>Lb. rhamnosus</i> (log UFC/gramo)	<i>B. breve</i> (log UFC/gramo)	Mezcla de bacterias BAL (log UFC/gramo)
Inicial	8,2	8,32	8,41	7,6
Final	3,45	3,15	4,8	5,42
%	42,073	38,414	58,536	66,097

En cuanto a la actividad antipatógena, se determinó que los halos de inhibición de las mezclas de bacterias estaban en el orden de los 17 mm en las mezclas de bacterias BAL sobre *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, no siendo efectivos contra *Salmonella*, lo cual demuestra que debido a las bacteriocinas que producen las BAL, inhiben el crecimiento de patógenos in vitro.

En los productos obtenidos en los experimentos 5 y 10, se realizaron análisis de acidez, para determinar el tiempo de vida útil. Comercialmente un yogurt tiene una vida de estante de 30 días, tiempo en el cual se asume que existen cambios considerables como el aumento de acidez, en el caso de los experimentos 5 y 10, la acidez se mantuvo constante desde la hora 3 hasta la semana 4, que se encontró en 90oD.

De acuerdo a Serras, et al. (2008), la actividad de las bacterias ácido lácticas que están presentes en el yogur es muy baja a temperaturas de refrigeración, pero aún siguen vivas y continúan transformando la lactosa en ácido láctico, lo que provoca una disminución del pH y un aumento de la acidez (se estima que tras unas 4-7 semanas, el aumento de la acidez es del orden del 0,2%). Sin embargo, en el producto elaborado en los experimentos, debido a que el sustrato contiene muy poca lactosa, por la hidrólisis previa, no se da la producción de ácido láctico en este tiempo, debido a que se forma en mínimas cantidades que no afectan al producto en la vida de anaquel y que podría llegar a ser consumido por más tiempo.

Con los experimentos 5 y 10 se realizaron pruebas sensoriales con un panel semientrenado, y se evaluó el producto durante las 4 semanas que duró el estudio. Corroborando lo expresado en la curva de acidificación, ya que el producto se mantuvo estable por encima de las 4 semanas.

Al ser un producto hidrolizado, la cantidad de lactosa presente es mínima en relación con un yogurt en el que no hubo este tratamiento previo, por lo tanto este tipo de alimentos tienden a tener un tiempo de vida de anaquel más largo, debido a que las rutas metabólicas (la glucosa vía glucólisis y la galactosa por la ruta de Leloir o la ruta de la tagatosa-6-fosfato) utilizada por las bacterias lácticas no provocan una acidez rápidamente, que es la que produce el deterioro sensorial que no gusta al consumidor.

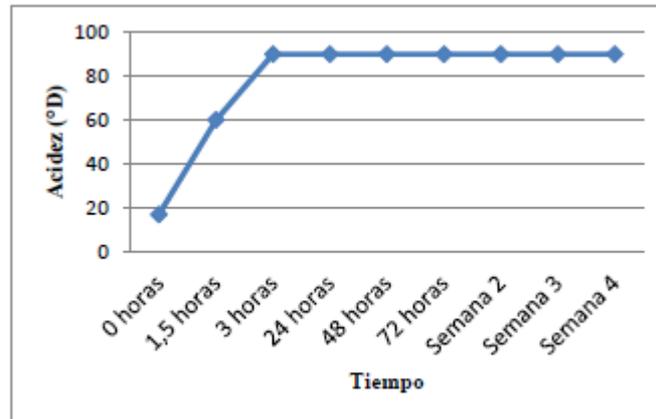


Fig. 4: Curva de Acidificación en función del tiempo de almacenamiento

A las diferentes temperaturas y tiempo de tratamiento se obtuvieron substratos hidrolizados en un buen porcentaje, pero a 4°C por 12 horas se obtuvo 79% de hidrólisis, que aunque es una buena cantidad de producto hidrolizado, no satisfacía las expectativas que se tenían para realizar las fermentaciones ya que seguía habiendo una buena cantidad de lactosa. Además es tiempo de hidrólisis es muy extenso y podría provocar un incremento de la flora de los psicrotrofos, llegando a desnaturalizar la proteína o desestabilizarla para los futuros procesos fermentativos. Aunque la enzima a temperaturas de 5°C por 24 horas utilizando diferentes dosis es muy utilizado a nivel industrial para procesos no constantes y fluctúan por determinados factores y no aseguran un porcentaje definido de hidrólisis, y este trabajado ha logrado demostrar que es factible de realizarlo en procesos industriales tan complejos como lo es el control de las curvas de fermentación en leches hidrolizadas fermentadas probióticas.

4. Conclusiones

Una vez obtenidos los resultados se determinó que la muestra con mayor porcentaje de hidrólisis fue la muestra sometida una temperatura de 32°C por un lapso de dos horas (Temperatura de pasteurización previa de 72°C por 15 segundos), se realizaron diferentes repeticiones y se hizo un promedio para disminuir el error en los resultados obtenidos; Además se cuantificó el contenido de lactosa glucosa y galactosa generado durante esta etapa, hay que recalcar que en nuestro país no existen técnicas ni normativas que regulen estos procesos en las industrias, razón por la que se tomó como referencia la norma Mexicana para determinación de lactosa.

A partir de esta muestra se elaboraron diferentes pruebas de formulación de yogur, simultáneamente a estas se realizaron análisis microbiológico tanto para control y de viabilidad de crecimiento de cepas, de lo cual se obtuvieron resultados favorables en

los dos tipos de análisis, cumpliendo con la normativa INEN para leches fermentadas en nuestro país.

También se llevó un control para evaluar la calidad del producto, se hizo un seguimiento de la de acidez que presentaba el mismo, estos resultados se pueden observar en el gráfico de la curva de acidificación, aquí podemos observar que el producto al cumplir con su proceso de fermentación llega a una acidez máxima y no existe una variación de acidez al transcurrir del tiempo, tecnológicamente estos puntos permitirán prolongar la vida útil del producto; Estos resultados se complementaron con la evaluación sensorial con un panel semientrenado, de lo cual se obtuvo una aceptación muy positiva del producto.

Para finalizar, este producto al tener un proceso de elaboración estandarizado y contener cepas probióticas viables puede ser considerado como un producto funcional, debido al gran aporte nutricional que brinda a su consumidor, esta razón puede hacer al mismo objeto de una investigación más completa, basado en otras condiciones más controladas como podrían ser temperatura de almacenamiento, tipo de envases y otros parámetros que puedan influir sobre la calidad del mismo, incluso se podría realizar estudios de intervención en personas que presenten cualquier tipo de intolerancia a la lactosa.

Referencias

1. Adams Martin R. & Robert Nout M. J. Fermentation and Food Safety. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg (2001)
2. Anzaldúa – Morales, A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acribia, Zaragoza (2005)
3. AOAC INTERNATIONAL, Official Methods of Analysis, 16th Ed., 4th Revision. Gaithersburg, MD, methods 896.01, 984.15, 930.28 and 972.16. (1998)
4. Bao, Y; Zhang, Y; Liu, Y; Wang, S; Dong, X; Wang, Y; Zhang, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* 21(5): 695-701 (2010)
5. Brummer Y, Cui S W. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. Taylor and Francis Group, Boca Ratón (2005)
6. Cabezón Palominos P. Adición de depas lácticas probióticas en leche en polvo 26% MG (Tesis inédita de maestría). Universidad Austral de Chile. (2010)
7. CHR- HANSEN. Ha – Lactase. Información del producto lactasa líquida. CHR- HANSEN S. A. (2009)
8. Collado Amores, M C. Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico (Tesis doctoral). Universidad Politécnica De Valencia (2004)
9. Cueto C. y Aragón S. Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol in vitro. *Scientia Agropecuaria* 1, 45 – 50 (2012)
10. Ehrenpreis E. Lactose Intolerance: Definition, Clinical Features and Treatment. *Practical Gastroenterology*. Vol.XXIII No.4, 157-159 (1999)

11. Escobar LF., Rojas C A., Giraldo G A, Padilla Sanabria L. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. Rev. Invest. Univ. Quindío (20): 42 – 49 (2010)
12. García C A., Arrázola G S, Durango A M. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. Temas Agrarios - Vol. 15:(2), 9 – 26 (2010)
13. Guo, X. H.; Kim, J. M.; Nam, H. M.; Park, S.Y. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. Anaerobe 16(4): 321-326 (2010)
14. Juca C, A. Pérez, P. Determinación de lactosa en leche deslactosada y su comparación con la fórmula aplicada en la empresa de lácteos San Antonio (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca (2010)
15. Kaur N, Gupta Ak. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Journal of Biosciences 27(7):703-714 (2002)
16. Kolida S, Gibson Gr. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. Journal of Nutrition 137(11 Suppl):2503S-2506S (2007)
17. Kouaouci, R. Analytical methods for lactose quantification in milk and milk products. Canada. IDF (2007)
18. Langlands SJ, Hopkins MJ, Coleman NY, Cummings JH. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. Gut 53 (11): 1610-1616 (2004)
19. Llamosas C J. Principios bioactivos de la leche. División Alimentos Corporación Gloria (2011)
20. Mathews, C.K., Van Holden, K.E., Ahern, K. G. Bioquímica. Pearson Educación. Madrid (2002)
21. Mogrovejo K., Urgiles G. Optimización de las condiciones de hidrólisis utilizando b-galactosidasa inmovilizada por atrapamiento y determinación de lactosa residual (Tesis de pregrado). Universidad del Azuay. (2009)
22. Mozzi F, Raya R R, Vignolo G M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications. Blackwell Publishing, Iowa (2010).
23. Acumedia. Lactobacilli – MRS Broth. NEOGEN (2011)
24. Niness KR. Inulin and oligofructose: What are they? Journal of Nutrition 129 (7): 1402S-1406S (1999)
25. Paniagua Díaz H. Manual de elaboración de los productos lácteos en la empresa Chelmar S.A. de C. V. En Saltillo, Coahuila. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (2008)
26. Polvorosa Montes A. Mesa Redonda: Alimentos Funcionales Oligosacáridos Prebióticos. División de Nutrición Infantil. Nutricia (2002).
27. Probióticos y prebióticos. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. WGO Practice Guideline (2011)
28. Roberfroid M. Introducing inulin-type fructans. British Journal of Nutrition 93(Suppl 1): S13-25 (2005)
29. Schlimme E. La leche y sus componentes propiedades químicas y físicas. Editorial Acribia. Zaragoza (2002)
30. Serra, M.; Trujillo, A.J.; Pereda, J.; Guamis, B. Y Ferragut, V. Quantification of lipolysis and lipid oxidation during cold storage of yogurts produced from

- milk treated by ultra-high pressure homogenization. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 99–104 (2008)
31. Smit Gerrit. *Dairy processing improving quality*. Woodhead Publishing Limited. England (2003)
 32. Spencer John F. T., Ragout De Spencer A L. *Food Microbiology Protocols*. Springer. Totowa (2001).
 33. Tamime A.Y. Robinson R. K. *Yoghurt. Science and Technology*. Second edition. Woodhead Publishing Limited Abington Hall. Abington (1999)
 34. Usme P, Jaramillo DM, Álvarez F. *Microencapsulación de la lactasa como estrategia para mejorar la estabilidad y la aplicación en la industria de alimentos*. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas (2013)
 35. Yanahira S, Kobayashi T, Suguri T. Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* β -galactosidase. *Biosci Biotechnol Biochem*. 59(6):1021-6 (1995)