



Aislamiento y selección de bacterias ácido láctica con potencial probiótico a partir de leche cruda de cabra

Isolation and selection of lactic acid bacteria with probiotic potential from raw goat milk

Rubén Contreras de la Hoz

rucohoz@gmail.com, SICAAG - Semillero de Investigación de Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira, Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Lilia Corrales

lcorralesl@sena.edu.co, Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Socorro Sánchez

sokozanfa2015@gmail.com, Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Aline Melo Henríquez

ameloh@misena.edu.co, Grupo de Investigación SENA GAIRA – INSEGAIRA, Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Colombia

Resumen

En esta investigación se muestra el proceso detallado elegido para aislar y seleccionar bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico, a partir de un nicho ecológico típico como es la leche caprina. En la cual se aislaron 5 cepas, siendo estas las que presentaron las características más cercanas a este grupo de bacterias, posterior a esto se pasaron a realizar distintas pruebas de seguridad, con el objetivo de evaluar su potencial probiótico, las cuales son: Actividad acidificante, Producción de CO₂, Producción de aromas en leche, Capacidad de inhibición de patógenos, Resistencia a la acidez gástrica y actividad hemolítica. Obteniendo como resultado de estas 5 cepas solo 2 con potencial probiótico. Con nuestra investigación observamos que la leche de cabra se puede utilizar en la fabricación de una amplia variedad de productos lácteos, también se puede usar como vehículo para componentes funcionales como sustancias “prebióticas o bacterias probióticas”. Sin embargo, en esta los probióticos/prebióticos, sigue siendo mínimamente explorados, con respecto a los aspectos funcionales de los productos lácteos derivados de la leche de cabra.

Palabras claves. Alimento funcional, Bacterias ácido-lácticas, Microflora, Probiótico.

Abstract

This research shows the detailed process chosen to isolate and select lactic acid bacteria with probiotic potential, from a typical ecological niche such as goat milk. In which 5 strains were isolated, these being the ones that appeared the closest characteristics to this group of bacteria, after this, different safety tests were carried out, with the aim of evaluating their probiotic potential, which are: Acidifying activity, CO₂ production, Milk aroma production, Pathogen inhibition capacity, Resistance to gastric acidity and haemolytic activity. Obtaining as a result of these 5 strains only 2 with probiotic potential. With our research we observed that goat milk can be used in the manufacture of a wide variety of dairy products, it can also be used as a vehicle for functional components such as “prebiotic substances or probiotic bacteria”. However, in these probiotics/prebiotics, it is still minimally explored, regarding the functional aspects of dairy products derived from goat's milk.

Keywords: Functional food, Lactic acid bacteria, Microflora, Prebiotic.

Introducción

Considerando las nuevas tendencias de alimentación a nivel mundial, en los últimos años se observa un interés acentuado en los consumidores hacia ciertos productos que nutren y aportan a la salud y a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones son los patrones que generan una nueva área en el desarrollo de la ciencia y la nutrición que corresponde a la de los alimentos funcionales en los cuales se encuentran los “probióticos”. La falta de interés en la población nacional por la leche caprina y sus productos lácteos, por desconocer los beneficios nutricionales que ofrecen estos productos. A pesar de la composición similar a la leche de vaca con respecto a la concentración de proteínas, grasas y lactosa, existen diferencias entre ellas que afectan su digestibilidad y su valor nutricional. Las diferencias entre la composición de aminoácidos, la estructura secundaria de las proteínas y las propiedades químicas de la leche caprina ayudan a reducir su potencial alergénico en comparación con la leche de vaca (Clark & García, 2017).

En los Estados Unidos y en otros países desarrollados, la leche caprina es consumida principalmente, por personas con intolerancia a la leche de vaca o que padecen trastornos digestivos (Pulina *et al.*, 2018). Las demandas del mercado de consumo han llevado a la industria láctea a desarrollar productos destinados a proporcionar componentes funcionales, como la adición de sustancias prebióticas o bacterias probióticas (Shori, 2015). La Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos también ha revisado el concepto de prebiótico, la definición más reciente lo considera como un sustrato utilizado selectivamente por los microorganismos huésped que confieren beneficios para la salud (Gibson *et al.*, 2017). Los alimentos funcionales que contienen prebióticos y probióticos han despertado el interés de la industria láctea por razones económicas y por la evidencia científica relacionada con sus beneficios positivos para la salud (Balthazar *et al.*, 2017). Por lo tanto, la combinación de leche de caprinos e ingredientes funcionales es una de las áreas de investigación más prometedoras para la industria láctea moderna.

Por todo lo anterior se buscó aislar y seleccionar bacterias ácido lácticas a partir de la leche caprina con el objetivo de evaluar su potencial probiótico, en los laboratorios del Centro Acuícola y Agroindustrial de Gaira - CAAG – SENA Magdalena y de esta forma contribuir en insumos para la fabricación de una amplia variedad de productos lácteos saludables.

Metodología

Esta fue de tipo experimental con un enfoque mixto, donde se buscó de forma rigurosa obtener las cepas de bacterias ácido-lácticas con mayor potencial probiótico. Para esta se tomaron muestras de leche de cabra criollas provenientes de la unidad ovino caprino del CAAG. Primero se realizó la determinación de los parámetros fisicoquímicos de esta; donde se le determinó pH con la ayuda de un pHmetro, densidad por el método de gravimetría y lactodensímetro, acidez por titulación, cenizas mediante el método de calcinación en mufla, grasas mediante el método de Soxhlet, proteínas mediante el método de Kjeldahl y grados brix con la ayuda de un refractómetro.

Segundo se realizó el aislamiento de las bacterias ácido-lácticas; mediante la técnica de diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) sembradas por duplicado, por la técnica de superficie en placa en medio agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), se incubaron de 24 a 48 horas a una temperatura de 35 °C en condiciones de anaerobiosis, una vez se evidencio el crecimiento se seleccionaron diferentes colonias por cada dilución con el fin de purificar las colonias más diferenciadas, posterior a esto fueron sembradas nuevamente en agar MRS por la técnica de estría cruzada y por ultimo fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 35 °C por 24 horas; a cada una de las colonias aisladas y purificadas se le realizó la prueba de tinción Gram propuesta por (Cristian Gram) para seleccionar las bacterias Gram positivas; así como también la prueba de la catalasa y oxidasa, con el fin de obtener bacterias catalasa y oxidasa negativa característica propia de las BAL, las cepas que cumplieron con estas características fueron seleccionadas y conservadas en caldo MRS en congelación a -20 °C, para posteriormente ser sometidas a pruebas de seguridad que puedan garantizar su potencial probiótico.

Se realizó la prueba de actividad acidificante para esta se empleó como medio de crecimiento leche ultra-pasteurizada (UHT) en frascos de 50 ml, después se le inoculó 1% v/v (0.50 ml) de las cepas reactivadas y se incubó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. La acidez se determinó a las 0, 6, 12 y 24 horas de incubación, por triplicado para cada cepa.

El ácido láctico se determinó por medio de titulación con NaOH al 1N y fenolftaleína como indicador, además se evaluó el aroma producido de manera organoléptica, seleccionando las que presentaron aromas típicos a lácteos fermentado, prueba de producción de CO₂ para esta se utilizaron tubos Pyrex con 5 ml de caldo MRS estéril y campanas Durham a los cuales se le inocularon 1% v/v de las cepas previamente reactivadas y se incubaron en las mismas condiciones anteriormente citadas, además este procedimiento se realizó por triplicado para cada cepa, prueba para determinar la capacidad de inhibición de

patógenos en esta se utilizaron como microorganismos de prueba *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, para realizar esta prueba se cultivaron cada una de las cepas ensayadas en caldo MRS estéril, sin agitación por 24 horas en anaerobiosis.

Las bacterias patógenas se sembraron en Agar Nutritivo. La actividad antimicrobiana se determinó con la técnica de difusión en agar, utilizando discos impregnados con las cepas aisladas en las cajas inoculadas con los microorganismos patógenos y se incubaron en anaerobiosis de 24 a 48 horas a 35°C, por último se midió el diámetro de los halos de inhibición en centímetros, prueba para determinar la resistencia a la acidez gástrica; para evaluar la capacidad de las cepas aisladas a sobrevivir en este medio, se ajustó una solución de caldo MRS a un pH de 2.5 utilizando HCL al 2N, sometiéndolas a esta acidez durante 24 horas. El resultado de esta prueba se determinó por el incremento de la turbidez del medio, prueba para la evaluación de la actividad hemolítica en esta se tomó la suspensión celular preparada de cada cepa, después fue inoculada por estría sobre agar sangre con un asa de argolla y se incubaron en dos condiciones, unas en anaerobiosis y otra en condiciones aerobias, todas las cepas fueron sembradas por triplicado y después del tiempo de incubación, se realizó la interpretación del tipo de hemólisis observado, basándonos en cada uno de los tipos de hemólisis como betahemolíticas, alfa hemolíticas, o gamma hemolíticas (Galarza & Johanna, 2012).

Por último se determinó la resistencia a antibióticos en esta se utilizó la técnica de difusión en placa sobre agar MRS. Luego se inoculó en profundidad cada cepa de forma rigurosa a una concentración de 10⁸ UFC, esta cantidad se ajustó con la ayuda de la cámara de Neubauer y una vez el medio se solidificó se colocaron los discos que contenían los antibióticos a evaluar, estos fueron Penicilina, Ampicilina y Tetraciclina (Jiménez, 2012).

Resultados

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la caracterización físico-química de la leche de cabra, con el objetivo de determinar la calidad de esta, lo cual demuestra que en comparación con la leche de vaca no es tanta la diferencia, pero en cuanto a la fracción de los componentes grasos esta se diferencia de la de vaca, ya que es uno de los factores más claves que le aporta el gran valor nutritivo y esto es debido a que la hace más digestible para nosotros los humanos (Verruck et al., 2019). Por lo tanto, estos resultados son de vital importancia, ya que nos pueden contribuir al desarrollo de productos lácteos funcionales, por lo que esta leche es una mejor matriz para las bacterias probióticas.

Tabla 1. Resultados físico-químicos

Análisis	Unidades	Método	Referencia (Ntc 399 Leche Cruda)	Resultado
Humedad, % fracción m/m	%	Gravimétrico	-	86,24
Ceniza, % fracción m/m	%	Incineración 550°C	-	1,32%
Acidez Titulable expresada como ácido láctico % m/m	%	Volumétrico	0,13 – 0,17	0,14%
GRASA, % fracción m/v	%	Soxhlet	Mín. 3,0	3,45%
pH	-	Potenciométrico	-	6,7
Índice crioscópico	° C	Cálculo matemático	Min (- 0,530 °C) Max (0,510°C)	- 0,518°C
DENSIDAD g/ml	g/ml	Gravimétrico	1,030- 1,033	1,038
SÓLIDOS TOTALES, % Fracción m/m	%	Cálculo matemático	Mín. 11,3	15,94
SÓLIDOS NO GRASOS (extracto seco desengrasado), % fracción m/m	%	Cálculo matemático	Mín. 8,3	8,98
PROTEÍNA % fracción m/m	%	Kjeldahl	Mín. 2,9	3,6
Lactosa % fracción m/m	%	Cálculo matemático	-	4,01

Fuente. Elaboración propia, 2019

Para la identificación de las cepas que presentan de bacterias ácido-lácticas por morfología celular y actividad catalasa oxidasa, también se representa la producción tanto de aromas como de CO₂ en leche estéril, todas estas pruebas se hicieron la finalidad de ir seleccionando aquellas cepas que presentan características propias de las BAL, que posterior a esto van a pasar por pruebas de seguridad aun mas específicas que nos garantizan el potencial probiótico de cada una de las cepas seleccionadas (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Morfología celular, actividad Catalasa y Oxidasa y producción de aromas y CO₂

# Cepa	Código	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	Producción de CO ₂	Producción aromas en leche
1	LC01A	Bacilos (+)	N	N	Presente	Presente
2	LC01B	Cocos (+)	N	N	Ausente	Ausente
3	LC01C	Bacilos (+)	N	N	Ausente	Presente
4	LC02A	Bacilos (+)	N	N	Presente	Presente
5	LC02B	Bacilos (+)	N	N	Presente	Presente

Fuente. Elaboración propia, 2019.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la actividad acidificante de las cepas, esta se determinó en un rango de horas que iban de 0, 6, 12, 24 horas, con el objetivo de determinar el porcentaje de ácido láctico producido por cada cepa.

Tabla 3. Actividad acidificante. Acidez expresada como ácido láctico % m/m

# Cepa	Código	0 h	6 h	12 h	24 h
1	LC01A	0.15	0.34	0.57	0.73
2	LC01B	0.14	0.24	0.33	0.39
3	LC01C	0.17	0.31	0.48	0.67
4	LC02A	0.19	0.41	0.53	0.78
5	LC02B	0.16	0.35	0.46	0.69

Fuente. Elaboración propia, 2019

Los resultados de la evaluación y selección del potencial probiótico de las cepas aisladas a partir de las pruebas de seguridad a las cuales se sometieron con el objetivo de escoger a las cepas más resistente a estas se evidencian en la Tabla 4; en esta tabla se buscó determinar el mayor porcentaje de potencial probiótico por cada cepa a través de una tabla descrita por (Tambekar & Bhutada, 2010). Con la finalidad de obtener los resultados de esta operación, por lo que a cada una de las pruebas realizadas se les asignó un puntaje máximo por condición de (0 a 1) y dependiendo de la actividad de cada cepa, se halló el puntaje máximo posible, el cual fue de 8, a partir de este valor se pasó a una ecuación matemática que nos ayudó a determinar el porcentaje por cada cepa.

Tabla 4. Selección del potencial probiótico según la asignación del puntaje correspondiente a la condición

Condición para evaluar	#	Código de cepas	Resistencia a pH 2.5	Resistencia a sales biliares a 0.3%	Hemólisis	Actividad antimicrobiana. <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	Resistencia a antibióticos (P), (AM) y (TE)	Puntaje total	Potencial probiótico %
Indicación	1	LC01A	0	0	0	0 - 1	0 - 0 - 1	2	25
	2	LC01B	0	0	0	0 - 0	0 - 1 - 0	0	12.5
	3	LC01C	1	1	1	1 - 1	1 - 1 - 0	7	87.5
	4	LC02A	1	1	1	1 - 1	0 - 1 - 1	7	87.5
	5	LC02B	0	1	0	1 - 0	0 - 1 - 0	3	37.5

Fuente. Elaboración propia, 2019 a partir (Tambekar & Bhutada, 2010).

Conclusiones

A través de este trabajo, se pudo comprobar que si es posible aislar bacterias ácido lácticas con potencial probiótico, a partir de la leche cruda de caprinos, en donde se logró aislar 5 cepas, siendo solo 2 las que se pudieron comprobar hasta el momento su actividad probiótica. Todo este nuevo conocimiento apunta a nuevas posibilidades para mejorar la calidad de los productos alimenticios elaborados en la Unidad Productiva Agroindustrial del CAAG, mediante la incorporación de nuevos ingredientes alternativos como lo son los microorganismos.

ismos probióticos. Sin embargo, cualquier aporte tecnológico debe someterse primero a estudio preliminar tanto técnico como económico para garantizar su viabilidad.

Referencias

- Balthazar, C. F., Pimentel, T. C., Ferrão, L. L., Almada, C. N., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A. M., Nascimento, J. S., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Sant'Ana, A. S., Granato, D., & Cruz, A. G. (2017). Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 247–262. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>
- Clark, S., & García, M. B. M. (2017). A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10026–10044. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13287>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D. L., Francesconi, A. H. D., & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6715–6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>
- Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.010>
- Tambekar, D. H., & Bhutada, S. A. (2010). An evaluation of probiotic potential of lactobacillus sp. From milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. 2, 82–88.
- Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. (2019). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products develop-

ment and its implications on human health. *Journal of Functional Foods*, 52, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.017>