

Bebida de suero fermentado con la adición de jugo de sábila (*Aloe vera* L.) y pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth) con características probióticas

Whey fermented drink with the addition of sabila juice (*Aloe vera* L.) and blackberry pulp (*Rubus glaucus* Benth) with characteristic probiotics

MSc. Diómedes Rodríguez Villacis^{1*}

Dr.C. José Luis Rodríguez Sánchez²

Dr.C. Aldo Hernández Monzón³.

¹Escuela Superior Politécnica de Litoral. Campus "Gustavo Galindo", Guayaquil, Ecuador.

²Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana, Cuba.

³Instituto de Farmacia de Alimentos, La Habana, Cuba.

*Autor para correspondencia. Correo: dhernanrodriguezv@gmail.com

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar una bebida de suero fermentado con la adición de jugo de sábila (*Aloe vera* L.) y pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth) con características probióticas y buena aceptabilidad. Las materias primas fueron suero dulce, pulpa de mora, jugo de sábila todos pasteurizados, suero en polvo, edulcorante sucralosa y steviosida en relación 1:1 y cultivos lácticos probióticos concentrados liofilizados. Las formulaciones de la bebida se obtuvieron mediante un diseño Superficie de Respuesta tipo Box Benhken, las variables independientes fueron dosis de jugo de sábila (7 a 15 %), dosis de pulpa de mora (6 a 12 %) y dosis de cultivo (2,5 a 5 %) y las variables de respuesta estabilidad a la sedimentación, viscosidad, viabilidad de los microorganismos probióticos y aceptabilidad. Las formulaciones fueron estandarizadas a $9 \pm 0,1$ % de sólidos totales lácteos con suero en polvo. La

fermentación se realizó con la mezcla de suero y jugo de sábila según diseño a 40 ± 1 °C, una vez terminada se incorporó la pulpa de mora a 20 °C. A la bebida fermentada se le determinaron acidez, pH y viscosidad según normas ecuatorianas, viabilidad y aceptabilidad. A la bebida seleccionada se le realizó prueba de barrera gástrica *in vitro*, actividad antimicrobiana y aceptabilidad poblacional. La bebida obtenida presentó una aceptabilidad de “me gusta”, una viabilidad de los microorganismos probióticos por encima de 10^9 ufc/g con resistencia a la barrera gástrica y con actividad antimicrobiana que permite clasificarla como bebida fermentada probiótica.

Palabras clave: suero lácteo; jugo de sábila; pulpa de mora; bebida de suero fermentado

ABSTRACT

This work had as objective to develop whey fermented drink with the addition of sabila juice (*Aloe vera* L.) and blackberry pulp (*Rubus glaucus* Benth) with probiotics characteristics and good acceptability. The raw materials were sweet whey, blackberry pulp, sabila juice all pasteurized, powdered whey, artificial sweetener sucralose and steviosida in relationship 1:1 and probiotic cultures concentrated lyophilized dairy. The drink formulations were obtained by means of a design Surface of Answer type Box Benhken, the independent variables were dose of sabila juice (7 to 15 %), dose blackberry pulp (6 to 12 %) and cultures dose (2.5 to 5%) and the variables of answer stability to the sedimentation, viscosity, viability of the microorganisms probiotics and acceptability. The formulations were standardized to $9 \pm 0.1\%$ of dairy total solids with powdered whey. The fermentation was carried out with the mixture of whey and sabila juice according to design to $40 \pm 1^\circ\text{C}$, once finished it was incorporated the blackberry pulp to 20°C . To the fermented drink it was determined acidity, pH and viscosity according to Ecuadorians norms, viability and acceptability. To the selected drink it was carried out test of gastric barrier *in vitro*, antimicrobial activity and population acceptability. The obtained drink presented an acceptability of “like it”, the viability microorganism’s probiotics above 10^9 cfu/g, resistance to the gastric barrier and with antimicrobial activity that allows classifying it as probiotic fermented drink.

Keywords: sweet whey; sabila juice; blackberry pulp; whey fermented drink.

Recibido: 8/09/2018

Introducción

En la actualidad se han desarrollado e incrementado las bebidas de lactosuero fermentado como nuevos productos en aras de aprovechar al máximo todas las bondades de este coproducto de la industria y los beneficios que aportan los cultivos probióticos en los productos lácteos.

La definición de probiótico ha evolucionado notablemente, de forma que según la FAO, son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas. ⁽¹⁾ A menudo el término se usa erróneamente para referirse a organismos comensales habituales sin sustentar sus beneficios en la salud o falsamente se limita a bacterias de origen humano. ⁽²⁾ Los efectos beneficiosos deben demostrarse en animales y humanos. ⁽³⁾

El mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos en un producto probiótico durante toda la vida útil es imprescindible porque condiciona su actividad. El número de células viables en bebidas fermentadas al final de su vida útil debe ser de al menos 10^7 ufc/g. ⁽⁴⁾

Las bebidas de suero fermentado presentan buenas características sensoriales y una vida de almacenamiento más larga que las bebidas refrescantes de suero aromatizado, además de combinar el alto valor nutricional y terapéutico.

En la elaboración de bebidas fermentadas a partir de lactosuero dulce reportaron las principales características físicas, químicas, sensoriales, nutricionales, entre ellas una acidez titulable de 0,70 % de ácido láctico a las 24 h de inoculación, con buena calidad microbiológica y una aceptación de me gusta mucho, pero con una estabilidad de solo siete días. ⁽⁵⁾ Por otro lado otros autores desarrollaron una bebida de suero fermentado con buena aceptabilidad que la catalogaron de saludable por la presencia de los cultivos probióticos *L. rhamnosus*, *B. Bifidum* y *Propionibacterium freudenreichii ssp Shermanii*. ⁽⁶⁾

También se han obtenido productos de suero fermentado haciendo uso de *L. casei*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* donde se evaluó la viabilidad de los cultivos a pH similares a los de la barrera gástrica con resultados favorables, estas bebidas fueron saborizadas con pulpa de maracuyá (11 °Brix) y estabilizadas con carboximetil

celulosa al 0,1 % con una aceptación de me gusta y la estabilidad durante el almacenamiento fue hasta los 21 días. ⁽⁷⁾

También se han desarrollado bebidas de suero fermentado con la adición de sacarosa y dietéticas haciendo uso de aspartame, como estabilizador utilizaron la goma guar entre 0,25 y 0,35 % y fuente de fibra dietética avena en dosis de 7 g/L de bebida con una adecuada viscosidad, estabilidad y aceptabilidad de me gusta. ⁽⁸⁾

Los microorganismos que se han utilizado con más frecuencia como cultivos pertenecen al grupo conocido genéricamente como bacterias ácido lácticas. Entre estas bacterias se encuentran *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y también la inclusión de las bacterias intestinales *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* para la elaboración de leches y bebidas lácteas fermentadas.

La bacteria *L. bulgaricus* es homofermentativa, su temperatura óptima para su desarrollo se encuentra entre 45 a 50 °C, tiene buena capacidad de fermentar la lactosa, estimula el crecimiento de bifidobacterias y produce efecto barrera en la translocación de *E. coli*. ⁽⁹⁾

La bacteria *S. thermophilus* es homofermentativa, termorresistente y se desarrolla entre 37 a 40 °C, pero puede resistir temperaturas de 50 a 65 °C por 30 min; ⁽¹⁰⁾ como beneficios presenta buena capacidad de fermentar la lactosa, se reproduce en el tracto gastrointestinal y controla la colonización por *Helicobacter pylori*. ⁽⁹⁾

Entre los beneficios que presenta la bacteria *L. acidophilus* se encuentran el equilibrio de la microbiota intestinal, efecto en el sistema inmune, reducción de la actividad enzimática pro cancerígenas, control de diarrea. ⁽¹⁰⁾ Además tiene acción antagónica sobre el crecimiento de distintos tipos de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, produce dos bacteriocinas la lacticina B y lacticina F. ⁽⁹⁾

Con respecto al crecimiento de los cultivos iniciadores relacionado con el valor de pH se ha informado ⁽¹¹⁾ que para valores por debajo de 5 se produce daño celular, que baja la actividad de los mismos, como es el caso del cultivo del yogur *S. thermophilus* que se inhibe el crecimiento entre valores de pH 4,3 a 4,0.

Bifidobacterium bifidum es una bacteria heterofermentativa que tiene su crecimiento óptimo entre 35 a 39 °C, constituye una de las especies predominantes del colon, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde 10^8 a 10^{11} ufc/g; ⁽¹²⁾ el valor de pH óptimo de crecimiento es de 6,5 a 7,0 y no crece de 4,5 a 5,0. ⁽¹³⁾ Presenta como beneficios la disminución de la actividad de la β -glucoronidasa, pero no de las

otras enzimas que se asocian con el cáncer de colon, tiene efectos positivos sobre la función intestinal. ⁽⁹⁾

En el Ecuador se ha estado investigando el desarrollo de bebidas de lactosuero fermentado con la adición de jugo de sábila y pulpa de frutas logrando un producto con buena aceptabilidad y vida de almacenamiento de hasta 21 días y con beneficios a la salud dado por los cultivos probióticos, el jugo de sábila y las bondades de la pulpa de guanábana. ⁽¹⁴⁾

Entre las frutas más abundantes en el Ecuador se encuentra la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) y su uso fundamental se destina a la elaboración de mermeladas, jugos y néctares. Para la mora andina en fruta fresca se ha informado alto contenido de fenoles y antocianinas ⁽¹⁵⁾ y para la pulpa pasteurizada reportaron ⁽¹⁶⁾ que presenta excelente contenido de sólidos, minerales, alta acidez y características antioxidantes que la hacen un buen ingrediente para la elaboración de bebidas con esas características.

De acuerdo a estos antecedentes este trabajo tuvo como objetivo desarrollar una bebida de suero fermentado con la adición de jugo de sábila (*Aloe vera* L.) y pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth) con características probióticas y buena aceptabilidad.

Materiales y métodos

El trabajo experimental se realizó en la planta piloto de producción de alimentos y en el Laboratorio del Programa de Tecnología de Alimentos -PROTAL de la Escuela Superior Politécnica del Litoral-ESPOL de Guayaquil, Ecuador.

Las materias primas utilizadas en los experimentos fueron las siguientes: suero dulce procedente de la elaboración de queso fresco enzimático, pulpa de mora pasteurizada obtenida de frutas frescas, jugo de sábila pasteurizado extraído de pencas de tres años o más, suero en polvo, edulcorante sucralosa y steviosida (Stevia), cultivos liofilizados: *L. delbrueckii subsp bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium spp* ABY-3 Probio-Tec, CHR HANSEN.

Diseño de la bebida de suero fermentado

Para la elaboración de la bebida de suero fermentado las formulaciones fueron estandarizadas a $9 \pm 0,1$ % de sólidos totales lácteos empleando suero en polvo, con el fin de alcanzar en la bebida un contenido de proteínas alrededor de 1,0 % similar a

otras bebidas fermentadas, ^(5, 7) edulcorada con sucralosa y steviosida en relación 1:1 (equivalente al 10 % de azúcar refinado) para la obtención de una bebida baja en calorías.

Para las diferentes formulaciones de la bebida de suero fermentado se utilizó un diseño Superficie de Respuesta tipo Box Behken (con tres puntos centrales por bloque) ⁽¹⁷⁾ haciendo uso del programa Statgraphics Centurion, ⁽¹⁸⁾ se tomaron como variables independientes la dosis de jugo de sábila (7 a 15 %), dosis de pulpa de mora (6 a 12 %) y dosis de cultivo (2,5 a 5 %), en la tabla 1 se presenta la matriz del experimento con una réplica. Las variables de respuesta fueron: estabilidad a la sedimentación, viscosidad de la bebida, viabilidad de los microorganismos probióticos y aceptabilidad.

Tabla 1- Matriz del diseño experimental con una réplica

No experimento	Bloque	Jugo sábila (%)	Pulpa de mora (%)	Dosis de cultivo (%)
1	1	11,0	6,0	5,0
2	1	11,0	9,0	3,75
3	1	7,0	6,0	3,75
4	1	15,0	6,0	3,75
5	1	11,0	6,0	2,5
6	1	7,0	9,0	2,5
7	1	7,0	12,0	3,75
8	1	15,0	9,0	2,5
9	1	11,0	9,0	3,75
10	1	7,0	9,0	5,0
11	1	15,0	9,0	5,0
12	1	11,0	12,0	5,0
13	1	11,0	12,0	2,5
14	1	15,0	12,0	3,75
15	1	11,0	9,0	3,75
16	2	11,0	6,0	5,0
17	2	11,0	9,0	3,75
18	2	7,0	6,0	3,75
19	2	15,0	6,0	3,75
20	2	11,0	6,0	2,5
21	2	7,0	9,0	2,5
22	2	7,0	12,0	3,75
23	2	15,0	9,0	2,5
24	2	11,0	9,0	3,75
25	2	7,0	9,0	5,0
26	2	15,0	9,0	5,0
27	2	11,0	12,0	5,0
28	2	11,0	12,0	2,5
29	2	15,0	12,0	3,75
30	2	11,0	9,0	3,75

Procedimiento para la elaboración de la bebida fermentada

El suero se recibió en la planta piloto en bidones de 40 L, se pesó y se sometió al proceso de pasteurización a 72 a 75 °C por 10 a 15 min en tanque de doble fondo con agitación moderada ^(19, 20). El suero pasteurizado se enfrió hasta los 60 °C y se

comenzó el mezclado, con agitación constante, agregando según formulación los ingredientes: jugo de sábila pasteurizado, la mezcla de edulcorantes y suero en polvo para la estandarización de la mezcla. A la temperatura de 40 ± 1 °C se adicionó la dosis de cultivo correspondiente según diseño, se agitó durante 5 min y se mantuvo en incubación.

La fermentación se dio por terminada cuando se alcanzó una acidez entre 0,55 a 0,60 % de ácido láctico (valor de pH = 4,3).

El producto fermentado se refrescó a 20 °C y se le incorporó la dosis de pulpa de mora pasteurizada según diseño, seguidamente se sometió a refrigeración a 4 ± 1 °C para su conservación.

Al producto terminado se le evaluó a las 24 h, estabilidad a la sedimentación, acidez, pH, viscosidad, viabilidad de los microorganismos probióticos y la aceptabilidad.

A todas las formulaciones se les determinó: acidez ⁽²¹⁾, pH ⁽²²⁾ y viscosidad mediante viscosímetro Brookfield modelo LVT a temperatura de 20 °C, velocidad de 30 min^{-1} y vástago 2.

A las formulaciones de la bebida de suero fermentado se le evaluó a las 24 h de fermentadas la estabilidad a la sedimentación, por un panel compuesto por siete catadores experimentados teniendo en cuenta la separación de fases o presencia de sedimentación, la puntuación se realizó de uno a cinco puntos según lo reportado. ⁽¹⁹⁾

Todas las formulaciones se sometieron a evaluación sensorial para su aceptabilidad con 25 personas de la planta piloto (conocedores de productos lácteos fermentados), con una escala estructurada de cinco puntos que va de me gusta mucho a me disgusta mucho. ⁽²³⁾

A las formulaciones se le determinó la viabilidad de los microorganismos probióticos, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp bulgaricus*, *S. thermophilus* y *Bifidobacterium spp.* Para la cuantificación de las bacterias lácticas se realizaron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en agua peptonada y se inocularon en medio agar MRS y los estreptococos en medio agar M-17 utilizando la técnica de doble capa. Las placas se incubaron invertidas a 37 °C durante 72 h. Para las bifidobacterias el medio agar MRS fue suplementado con rafinosa, cloruro de litio y cisteína. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 72 h ^(24, 25) y las colonias fueron expresadas en ufc/g.

A la bebida fermentada seleccionada se le realizó el control microbiológico de mohos y levaduras, ⁽²⁶⁾ *Escherichia coli*, ⁽²⁷⁾ coliformes ⁽²⁸⁾ y *Salmonella*. ⁽²⁹⁾

A la bebida seleccionada se le evaluó la tolerancia a pH y bilis bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*. Para la tolerancia al pH el producto se ajustó a valores de pH 2,0 y 3,0 utilizando HCl 1 M, posteriormente fue incubado a 37 °C y el conteo de cada uno de los microorganismos se realizó después de dos horas de exposición. Para el análisis del comportamiento frente a la bilis se utilizaron sales biliares a concentraciones de 0,3 y 1 % (p/v) a un valor de pH 6,8 a 7,0. El producto se incubó a 37 °C y el conteo de cada uno de los microorganismos se realizó después de dos horas de exposición ⁽²⁵⁾. Todas estas determinaciones se hicieron por duplicado.

A la bebida también se le realizó análisis de inhibición de patógenos. Esta prueba conocida como el método de difusión en disco o agar (Kirby-Bauer), consiste en una prueba de inhibición o resistencia a los microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus* ATCC 36862, *Escherichia coli* ATCC 10536 y *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. La bacteria patógena se sembró en una concentración de acuerdo al estándar de McFarland 5, en agar Muller Hinton y en los pocillos de 6 mm de diámetro se colocaron las bacterias probióticas. Se realizó la incubación por 24 h a 37 ± 1 °C, y se observaron los halos alrededor de los pocillos, se midió el diámetro incluido el pocillo. ⁽³⁰⁾ Los resultados fueron interpretados de la forma siguiente: resistente (R) cuando el halo fue menor o igual a 11 mm; intermedio (I) halo de 11 a 13 mm y sensible (S) cuando el halo fue mayor o igual a 14 mm.

La aceptabilidad de la formulación seleccionada de la bebida fermentada se realizó mediante una prueba hedónica de aceptación, estructurada con cinco puntos que va desde me gusta mucho hasta me disgusta mucho; la evaluación se hizo con una población de 80 personas adultas potencialmente consumidores. ⁽³¹⁾

Resultados y discusión

Análisis de los resultados del diseño de experimento de la bebida fermentada

En la figura 1 se presenta el comportamiento del pH durante la fermentación de la mezcla de suero, jugo de sábila y cultivo con la adición de pulpa de mora y sin pulpa (las curvas obtenidas corresponden a un experimento con su réplica).

Con la adición de la pulpa se produjo un descenso del pH desde 5,6 hasta 3,9 y se mantuvo constante durante todo el tiempo que se midió el pH. En la mezcla sin la presencia de pulpa de mora el pH disminuyó por la formación de ácido láctico, debido a la acción de las bacterias lácticas durante la fermentación.

Con este experimento se demostró el efecto inhibitorio de la fermentación de la bebida por la presencia de la pulpa de mora en la mezcla debido a su alta acidez.

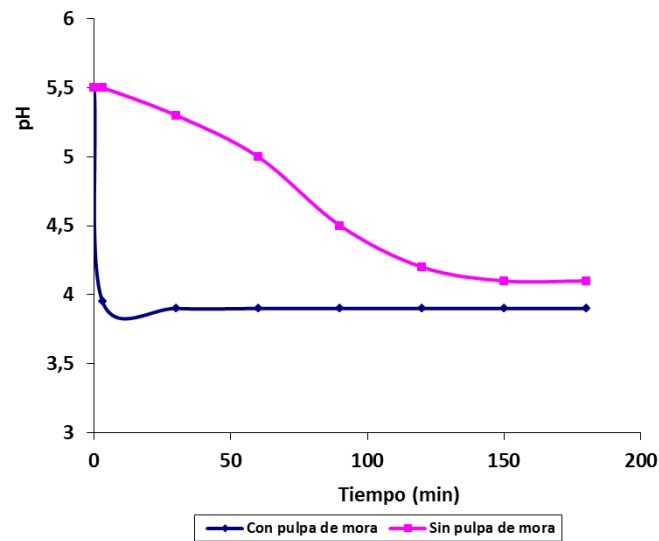


Fig. 1- Comportamiento del pH durante la fermentación del suero lácteo.

Este resultado coincide con lo reportado por ⁽¹¹⁾ para *S. thermophilus* en que el crecimiento se inhibe entre valores de pH 4,3 a 4,4 y para el *Bifidobacterium* que no crece de 4,5 a 5,0. ⁽¹³⁾

Dado este comportamiento, la pulpa de mora se adicionó a la mezcla de suero, jugo de sábila y cultivo después de la fermentación por el efecto de inhibición que ejerce la misma al proceso de fermentación.

Esto sin duda, es una variante tecnológica en la producción de la bebida fermentada que no se previó en el diseño inicial, ni se encontró información publicada al respecto. Los valores del tiempo de fermentación oscilaron en un intervalo de 3,3 a 4,0 h con muy poca dispersión, estos valores se encuentran entre los tiempos normales de fermentación de bebidas lácteas fermentadas con cultivos probióticos. ^(5, 7, 19)

Comportamiento de las variables de respuesta analizadas en las formulaciones diseñadas

En la tabla 2 presenta los valores medios de las variables de respuesta por formulación de la bebida del diseño de experimento desarrollado.

El valor de pH de la bebida al final de la fermentación fue fijado como 4,3. Los valores reportados post-fermentación estuvieron en el intervalo de 3,7 a 3,9 y representan el resultado de la adición de la pulpa de mora.

Tabla 2- Resultados por formulación según el diseño del experimento

Fórmula	Jugo de sábila (%)	Pulpa de mora (%)	Cultivo (%)	Valor de pH	Estabilidad	Viscosidad (mPa.s)	Viabilidad [log (ufc/g)]	Aceptabilidad
1	11,0	6,0	5,00	3,9 (0,0)	4,6	206 (23)	7,15 (0,21)	3,8
2	11,0	9,0	3,75	3,8 (0,1)	4,7	229 (7)	8,20 (0,72)	4,0
3	7,0	6,0	3,75	3,9 (0,1)	4,5	153 (11)	8,0 (0,0)	4,2
4	15,0	6,0	3,75	3,9 (0,1)	4,6	238 (3)	7,60 (0,43)	4,1
5	11,0	6,0	2,50	3,9 (0,1)	4,4	203 (4)	7,69 (0,83)	4,1
6	7,0	9,0	2,50	3,9 (0,0)	4,8	201 (6)	8,28 (0,96)	4,2
7	7,0	12,0	3,75	3,7 (0,0)	4,6	209 (3)	7,65 (0,49)	4,2
8	15,0	9,0	2,50	3,9 (0,1)	4,8	255 (9)	8,72 (0,34)	4,1
10	7,0	9,0	5,00	3,8 (0,0)	4,4	201 (5)	8,74 (0,37)	4,1
11	15,0	9,0	5,00	3,7 (0,1)	4,5	267 (9)	7,39 (0,12)	4,1
12	11,0	12,0	5,00	3,8 (0,1)	4,4	264 (2)	7,74 (0,37)	3,5
13	11,0	12,0	2,50	3,7 (0,1)	4,6	206 (2)	7,74 (0,37)	4,0
14	15,0	12,0	3,75	3,8 (0,1)	4,6	315 (7)	7,80 (1,13)	3,7

Valores () significa desviación estándar

Estabilidad de la bebida a la sedimentación

La estabilidad de la bebida a la sedimentación presentó una puntuación de 4,4 a 4,8, que de acuerdo a la escala utilizada indica que la mayoría de las bebidas mostraron mínima separación en la superficie y solo tres uniformidad total (fórmulas 2, 6 y 8), indicador que incidió positivamente en todas las formulaciones.

Del análisis del diseño de superficie de respuesta se obtuvo un modelo con un coeficiente de determinación muy bajo ($R^2 = 48,45 \%$).

Con vista a tener una mayor información de la influencia de las variables independientes sobre la estabilidad se realizó un análisis de varianza. Como resultado se obtuvo que las dosis de pulpa de mora y jugo de sábila no fueron significativas ($p \leq 0,05$); la dosis de cultivo fue la única significativa y al aplicar la prueba de Duncan dio que esta variable no presentó diferencia entre las dosis de 2,5 y 3,75 %, la dosis de 5 % si presentó diferencias significativas con una tendencia a disminuir la estabilidad.

Comportamiento de la viscosidad

La viscosidad fue la propiedad física que más varió, los resultados muestran que las formulaciones con los mayores valores correspondieron a las dosis más altas de pulpa de mora y jugo de sábila, estos valores presentaron buenas réplicas dada la desviación estándar para esta propiedad.

Al hacer el análisis superficie de respuesta dio como resultado un modelo con un coeficiente de determinación bajo ($R^2 = 64,67 \%$) y para analizar la influencia de las variables en la viscosidad de la bebida fermentada se realizó un análisis de varianza. Se obtuvo que la dosis de pulpa de mora y la de jugo de sábila ($p \leq 0,05$) presentaron diferencias significativas. Mediante la prueba de Duncan para el caso de la pulpa de

mora solo se encontró diferencias significativas entre las dosis de 6 y 12 %, de acuerdo a este resultado la pulpa de mora dio como efecto el aumento de la viscosidad en la bebida con el incremento de la dosis; para el caso del jugo de sábila el efecto fue aumentar significativamente la viscosidad por el incremento de la dosis utilizada, este comportamiento se justifica por la alta viscosidad del jugo de sábila por la presencia de glucomananos. ⁽¹⁶⁾

Comportamiento de la viabilidad

La viabilidad de los microorganismos probióticos de todas las formulaciones presentaron valores por encima del mínimo terapéutico (10^7 ufc/g), a pesar de que la pulpa de mora inactivó la fermentación por la acidez alta, pero la adición de la misma posterior a la fermentación no afectó a la viabilidad de los probióticos, debido a que estos son capaces de soportar el paso a través de la barrera gástrica a valores de pH entre 2 y 3.

El análisis de varianza arrojó que la única variable significativa para la viabilidad de los microorganismos fue la dosis de pulpa de mora ($p \leq 0,05$), al aplicar la prueba de Duncan dio que la dosis diferente y con mayor viabilidad fue la de 9 %.

Análisis de la aceptabilidad de las formulaciones

Con relación a la mezcla de edulcorante utilizada en las formulaciones, sucralosa y steviosida, los jueces no emitieron ningún comentario concerniente al sabor. Respecto a la aceptabilidad solo una formulación recibió la calificación de ni me gusta ni me disgusta, el resto de las formulaciones obtuvieron la calificación de me gusta, lo que significa que la bebida fermentada con jugo de sábila y pulpa de mora presentó buena aceptabilidad.

Al realizar el análisis de varianza, arrojó que ninguna de las variables independientes fueron significativas para la aceptabilidad ($p \leq 0,05$). De acuerdo a este resultado la aceptabilidad no fue una variable de respuesta restrictiva para la selección de la mejor formulación.

Un resumen de las variables que fueron significativas y el efecto de los ingredientes y los niveles recomendados lo presenta la tabla 3.

Tabla 3- Resumen de las variables significativas

Ingredientes	Variable significativa	Efecto	Nivel recomendado
Dosis de cultivo	Estabilidad	Disminución	Entre 2,5 a 3,75 %
Pulpa de mora	Viscosidad	Aumento	Entre 9,0 a 12,00 %
	Viabilidad	Disminución	9,0 %
Jugo de sábila	Viscosidad	Aumento	Entre 7,0 y 15,00 %

La pulpa de mora fue la variable que quedó condicionada a ser utilizada al 9 % por la variable de respuesta viabilidad. Teniendo en cuenta la restricción de la pulpa de mora y los niveles de ingredientes recomendados producto del análisis estadístico, se presentan en la tabla 4 las formulaciones seleccionadas como las mejores.

Tabla 4- Formulaciones seleccionadas

Formulación	Jugo de sábila (%)	Pulpa de mora (%)	Dosis de cultivo (%)	Viabilidad [log (ufc/g)]
2	11	9	3,75	8,2
6	7	9	2,5	8,8
8	15	9	2,5	8,7

De acuerdo al análisis realizado del diseño experimental cualquiera de estas formulaciones pudiera ser empleada para la elaboración de la bebida, pero teniendo en cuenta aspectos como es el costo de cultivo y los beneficios que aporta a la salud el jugo de sábila se decidió seleccionar la formulación 8.

Evaluación de las características probióticas de la bebida seleccionada

La tabla 5 refleja los resultados de la simulación de la barrera de la acidez gástrica *in vitro*. Para el valor de pH 3 prácticamente no existieron variaciones en la viabilidad según conteo total para estas condiciones, la mayor variación de la viabilidad ocurrió a valor de pH 2, que para los bacilos y estreptococos la disminución fue cercana a una unidad logarítmica, para bifidobacterias existió muy poca variación. El conteo total de microorganismos de los cultivos probióticos para valores de pH 2 se mantuvo por encima del mínimo terapéutico (10^7 ufc/g), de acuerdo a este resultado se puede asegurar que los microorganismos probióticos de la bebida son capaces de sobrevivir las condiciones de acidez durante el tránsito por el sistema gástrico.

Tabla 5- Viabilidad bajo condiciones de barrera ácida

Condiciones del análisis	Viabilidad [log (ufc/g)]
Conteo total inicial de bacterias	9,52
Conteo inicial de lactobacilos	3,75
Conteo a pH 3	3,73
Conteo a pH 2	2,94
Conteo inicial de estreptococos	2,85
Conteo a pH 3	2,79
Conteo a pH 2	1,92
Conteo inicial de bifidobacterias	2,92
Conteo a pH 3	2,83
Conteo a pH 2	2,71

La tabla 6 muestra la viabilidad de los microorganismos probióticos a la concentración de sales biliares, bajo estas condiciones prácticamente no existieron variaciones en la viabilidad de los microorganismos presentes en la bebida.

Tabla 6- Resistencia de los microorganismos probióticos frente a las sales biliares

Indicadores analizados	Viabilidad [log (ufc/g)]
Conteo inicial de bacterias probióticas	9,52
Conteo final de bacterias probióticas	8,86
Conteo inicial de lactobacilos	3,75
Conteo final de lactobacilos	3,61
Conteo inicial de estreptococos	2,85
Conteo final de estreptococos	2,52
Conteo inicial de bifidobacterias	2,92
Conteo final de bifidobacterias	2,73

La tabla 7 presenta los resultados de la prueba de actividad antimicrobiana por los cultivos probióticos presentes en la bebida, se puede observar que hubo disminución del halo en *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria*, la inhibición mostrada para estos microorganismos se puede calificar como resistente (R), para el caso de *S. aureus* no se mostró inhibición.

Tabla 7- Acción inhibitoria de los cultivos probióticos frente a microorganismos patógenos

Bacteria patógena	Diámetro del halo del disco (mm)	Inhibición	Diámetro del halo del inhibición (mm)
<i>E. coli</i>	6	+	9*
<i>Salmonella</i>	6	+	8*
<i>S. aureus</i>	6	-	-
<i>Listeria</i>	6	+	8*

* Resistente (R)

Los resultados de la prueba de barrera gástrica permiten asegurar que los cultivos utilizados en la elaboración de la bebida tienen la capacidad de soportar el tránsito bajo las condiciones gastrointestinales y mantener la viabilidad por encima del mínimo terapéutico, demostrándose así sus características probióticas. ^(3, 4, 32)

La tabla 8 refleja los análisis microbiológicos efectuados a la bebida, todos los indicadores cumplieron con lo establecido para calidad sanitaria según la norma ecuatoriana. ⁽³³⁾

Tabla 8- Calidad sanitaria de la bebida fermentada

Indicadores analizados	Resultados	Indicadores según norma
Coliformes totales (NMP/mL)	<3	<10
<i>E. coli</i> (NMP/mL)	<1	<1
Mohos y levaduras (ufc/mL)	<10	200
Salmonella cualitativa (Aus/Pres)	Aus	Aus
Viabilidad de microorganismos probióticos [log(ufc/g)]	8,81	7

La aceptación de la bebida dio una puntuación media de cuatro puntos, que corresponde a una evaluación de me gusta. En la figura 2 se refleja el comportamiento de las respuestas según intensidad de agrado, la mayoría de las respuestas estuvieron en las categorías de me gusta mucho y me gusta; se debe resaltar que las respuestas en la categoría me disgusta fueron muy bajas y ninguna en me disgusta mucho.

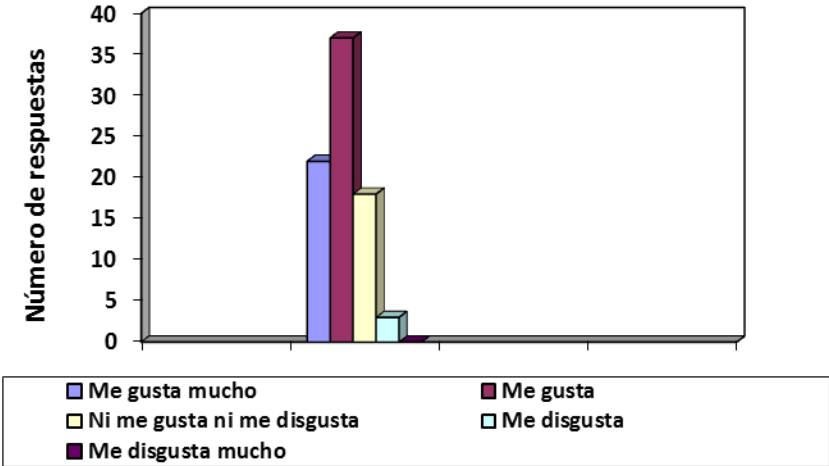


Fig. 2- Comportamiento de las respuestas según grado de intensidad de agrado de la bebida.

Conclusiones

La bebida desarrollada de suero fermentado con la adición de jugo de sábila y pulpa de mora de Castilla presentó una aceptabilidad de me gusta, una viabilidad de los microorganismos probióticos por encima de 10^9 ufc/g con resistencia a la barrera gástrica y con actividad antimicrobiana que permite clasificarla como bebida probiótica.

Referencias bibliográficas

1. OMS / FAO. *Informe del 25 Período de Servicios de la Comisión del Codex Alimentarius sobre la leche y productos lácteos*. Roma, 2003.
2. FOLIGNÉ, B., *et al.* "Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*", *International Journal of Food Microbiology*, 2010., 140., 136–145.
3. AZAÏS-BRAESCO, V., *et al.* "Not all lactic acid bacteria are probiotics, but some are". *British Journal of Nutrition*, 2010 , 103, 1079– 1081.
4. CODEX-STAN-243. *Norma del Codex para leches fermentadas*. 2003.
- 5 MIRANDA, O., *et al.* "Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintas y control de calidad". *Rev Cubana Aliment Nutr.* 2007., 17(2) 103-108.
6. MAITY, T., *et al.* "Development of healthy whey drink with *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*". *Mljekarstvo* , 2008, 58(4) 315-325.
7. LONDOÑO, Margarita, *et al.* "Utilización de suero de queso fresco en la elaboración de bebida fermentada con cultivos probióticos". 2010, *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 20(2) 53 - 56.
8. ARAZO, Migdalia, *et al.* "Utilización del suero dulce del queso en la elaboración de bebidas fermentadas dietéticas". *Ciencia Tecnología de Alimentos*, 2013, 23(2), 68 - 71.
9. MOZZI, F., *et al.* *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. Singapore: Wiley Black Well, 2010.

10. BOURGEOIS, C. *et al.* *Microbiología alimentaria*. Zaragoza (España): Acribia, 2005. vol. II.
11. TAMIME, A. "Microbiology of starter cultures". En: ROBINSON R.. *Dairy Microbiology Handbook*. New York: John Wiley and Sons, Inc.,2002.
12. COLLADO, M. Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con caracter probiótico. *upv*. [En línea] 2004. [Citado el: 10 de 02 de 2016.] <http://www.u.upv.es>.
13. ROY, D. "Media for the detection and enumeration of bifidobacteria in food products". En: CARRY, J., *et al.* *Handbook of culture media for food microbiology*. Amsterdam: Elsiever. 2003, vol. 37.
14. RODRÍGUEZ-VILLACIS, Diomedes, *et al.* "Desarrollo de una bebida fermentada de suero con la adición de jugo de *Aloe vera* y pulpa de fruta". *Tecnología Química*, 37(1) 1-10.
15. VASCO, C.,*et al.* "Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador". *Food Chem.* 2008,vol. 111, núm. 4, p. 816-823.
16. RODRÍGUEZ, Diomedes, *et al.* "Caracterización de materias primas con propiedades funcionales para la elaboración de bebidas". *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2017, 27(1) 12-17.
17. MONTGOMERY, D. *et al.* *Applied statistics and probability for engineers*. 6th edition. Danvers: John Wiley & Sons Inc., 2014.
18. Stapoint technologies. *STATGRAPHICS. Centurion V15.1.02*. Inc Manugistics. 2012.
19. ARAZO, M. "Utilización del suero dulce de queso en la elaboración de bebidas fermentadas dietéticas".Tesis Máster. Instituto de Farmacia y Alimentos, La Habana 2010. 63 p.
20. SUÁREZ-SOLÍS, V. *Tecnologías de procesamiento del suero de queso*. La Habana: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, 2011. 58 p.
21. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA. Leche. *Determinación de acidez titulable*. NTE-INEN-0013. Quito. Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1984.
- 22 NORMA TÉCNICA ECUATORIANA.. *Agua potable. Determinación del pH*. NTE-INEN-00973. Quito, Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1984.
23. WITTING DE PENNA, E. *Evaluación Sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos*. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile, 2001. 136 p.
24. DE MAN, J., *et al.* "A medium for the cultivation of lactobacilli". *J. Appl Bacteriol*, 1960, 23,. 130-135.

25. GUIMARÃES, D., *et al.* "Quantification of lactic acid bacteria and bifidobacteria in goat milk based yoghurts with added water-soluble soy extract.", *African Journal of Food Science*. 2013, 7(10) 392-398.
26. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA. *Determinación de la cantidad de microorganismos Mohos y Levaduras. Recuento en placa por siembra en profundidad*. NTE-INEN-1529.10. Quito. Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1998.
27. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA. *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y E. coli*. NTE-INEN-1529-8. Quito. Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1990.
28. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA. *Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias*. NTE-INEN-1529.7. Quito. Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1990.
29. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA. *Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección*. NTE-INEN-1529.15. Quito. Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1996.
30. SAMUDIO, K.L., *et al.* "Estudio del potencial probiótico de lactobacillus". *Ciencia e Investigación*. 2003, 6, 30-35.
31. ESPINOSA, J. M. *Análisis Sensorial*. La Habana: Félix Varela, 2014.. 155 p.
32. DE LAS CAJIGAS, *et al.* "Prebióticos y probióticos una relación beneficiosa". *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 2002 16(1) 63 - 68.
33. NORMA TÉCNICA ECUATORIANA. *Leches fermentadas*. NTE-INEN-2395. Quito. Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2011.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.