

Leche fermentada simbiótica a partir de cocultivo con una cepa autóctona aislada de leche maternal.

Symbiotic fermented milk from co-culture with a native strain isolated from human breast milk.

Taimy Hernández Sariego ^{1/*}; Rosalesmi Rodríguez Odel ²; Daniela Rafaela Hernández Machado ³; Luisa Matos Mosqueda ⁴; René Tejedor Arias ⁵; Amilcar Arenal ⁶.

^{1; 2; 3; 4} Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte y Loynaz”, Camagüey, Cuba

⁵ Departamento de Alimentos, Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de la Habana, Habana, Cuba

⁶ St. Nicholas University, / Roseau, Dominica

*Correspondencia: thsariago@gmail.com

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2024.09.02.10>

Resumen

Las leches fermentadas simbióticas se utilizan frecuentemente como alimentos portadores de probióticos y prebióticos, la mayoría de los primeros aislados del tracto gastrointestinal y productos fermentados; sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés por cepas de leche materna. El objetivo del presente trabajo es evaluar el crecimiento de *L. arizonensis* LM1564 en cocultivo con *S. thermophilus* y fructooligosacáridos en un modelo de leche fermentada simbiótica y la calidad del producto obtenido. La leche fermentada fue elaborada a partir de materias primas lácteas, cultivo de *L. arizonensis* LM1564 (aislado de leche materna) y *S. thermophilus* ST-M5 en relación 1:2 y 5 % de sirope de fructooligosacáridos. Para evaluar la calidad se determinó: pH, acidez, grasa, sólidos totales, conteo de coliformes, hongos, levaduras y viabilidad del cultivo. Sensorialmente se evaluaron las características: sabor, aspecto, aroma y textura y sus atributos. *L. arizonensis* LM1564 fue capaz de crecer adecuadamente en cocultivo y con prebiótico para obtener una leche fermentada simbiótica, constituyendo la primera referencia de su utilización en un producto de este tipo. El producto cumplió con los requisitos establecidos en las normas cubanas en cuanto a sus parámetros físicos, químicos y microbiológicos y presentó una excelente calidad sensorial.

Palabras claves. Fructooligosacáridos; *L. arizonensis*; leche fermentada; leche materna; prebiótico; probiótico; simbiótico.

Abstract

Symbiotic fermented milks are frequently used as a carrier for probiotics and prebiotics, most of which are isolated from the gastrointestinal tract and fermented products. However, in recent years, interest in strains isolated from human breast milk has increased. The objective of this study was to evaluate the growth of *L. arizonensis* LM1564 in cocultures with *S. thermophilus* and fructooligosaccharides in a model of symbiotic fermented milk and to determine the quality of the obtained product. Fermented milk was prepared using dairy raw materials: a culture of *L. arizonensis* LM1564 (isolated from breast milk) and *S. thermophilus* ST-M5 in a 1:2 ratio, and 5% fructooligosaccharide sirup. The quality of the samples was assessed by determining pH, acidity, fat content, total solids, coliform count, fungi, yeast, and culture viability. Sensory characteristics, including taste, appearance, aroma, and texture, were also evaluated. *L. arizonensis* LM1564 successfully grew in coculture with the prebiotic, resulting in symbiotic fermented milk, marking the first reference to its use in such a product. The product met the physical, chemical, and microbiological requirements established by Cuban standards and demonstrated excellent sensory quality.

Keywords. Fructooligosaccharide; *L. arizonensis*; fermented milk; breast milk; prebiotic; probiotic; symbiotic.

Introducción

Los alimentos fermentados se han consumido durante miles de años, sin embargo, en la actualidad están recibiendo cada vez más atención entre biólogos, nutricionistas, tecnólogos, médicos y consumidores. A pesar de este interés, existen inconsistencias relacionadas con el uso del término "fermentado", es por ello que en septiembre de 2019, la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP, sus siglas en inglés) convocó un panel de expertos a desarrollar una definición de alimentos fermentados y describir su papel en la dieta humana. Este panel después de los análisis correspondientes definió los alimentos y bebidas fermentados como "alimentos obtenidos mediante el crecimiento microbiano deseado y las conversiones enzimáticas de los componentes alimentarios".¹

Las leches fermentadas son uno de los productos fermentados más populares debido a sus propiedades sensoriales particulares, beneficios para la salud y prolongada vida útil.²⁻³ Estos productos son ampliamente fabricados en todo el mundo y existen aproximadamente 400 nombres genéricos de productos tradicionales y comerciales.⁴⁻⁵

Las leches fermentadas se han utilizado durante mucho tiempo como alimentos lácteos portadores de probióticos.⁶ Los microorganismos probióticos usados generalmente para la producción de leches

fermentadas son los siguientes *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* GG, *L. helveticus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. reuteri*); *Pediococcus* (*P. acidilactici*); *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *breve*, *longum*, *adolescentis*, *infantis*, *lactis*, *animalis*); *Lactococcus* (*Lc. lactis* subsp. *lactis*); *Enterococcus* (*E. faecium*, *faecalis*) y *Saccharomyces* (*S. boulardii*).⁴⁻⁷

En el caso de *Lactobacillus*, teniendo en cuenta los resultados obtenidos del análisis de ADN con tecnologías novedosas, en el 2020 un panel de expertos realizó una actualización taxonómica donde lo dividió en 25 géneros.⁸ No obstante, al citarlas en este documento, se presentan como fueron nombradas en su fuente original. Otro cambio importante encontrado es el hecho de ser asumido *L. arizonensis* como un heterotipo de *Lactiplantibacillus plantarum*.⁹

Se han ido acumulando evidencias a favor de los beneficios para la salud atribuidos a las leches fermentadas con probióticos, como la reducción del colesterol sérico, la mejora de la salud intestinal, la prevención de varios tipos de cáncer, la promoción de la respuesta inmunitaria e inclusive la mejora de las deficiencias cognitivas.¹⁰⁻¹² Otros beneficios incluyen efectos antihipertensivos,³ antidiabéticos¹³ y efectos contra la obesidad.⁴⁻¹⁴ Además representan una buena opción a los intolerantes a la lactosa.⁽¹⁵⁾

La mayoría de los probióticos mencionados con anterioridad han sido aislados del tracto gastrointestinal y de productos fermentados.⁽¹⁶⁾ Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el interés por cepas de leche materna.⁽¹⁷⁻²⁰⁾ Acorde con esta tendencia, investigadores de la Universidad de Camagüey han aislado y caracterizado cepas de leche materna dentro de las cuales se encuentra *L. arizonensis* LM1564, lo que constituye el primer reporte de aislamiento del heterotipo *L. arizonensis* a partir de leche materna e igualmente se realiza por vez primera su caracterización probiótica.²¹⁻²² La cepa aislada presenta cualidades probióticas y tecnológicas de gran valor, ya que posee la habilidad de sobrevivir en condiciones semejantes a las del sistema gastrointestinal, tiene propiedades antimicrobianas contra *E. coli*, es capaz de fermentar la leche y produce aromas agradables. Si *L. arizonensis* LM1564 es combinada además con un agente prebiótico para la elaboración de un producto simbiótico puede adquirir mayor relevancia.

Los productos simbióticos son considerados alimentos de mayor beneficio sobre el microbiota intestinal, ya que promueven el crecimiento de bifidobacterias y la inhibición de microorganismos potencialmente patógenos, favorecen la estabilización del entorno intestinal y la activación del metabolismo de bacterias promotoras de la salud y, en consecuencia, del bienestar del huésped.²³

Al mismo tiempo a la hora de desarrollar un producto ya sea probiótico o simbiótico es fundamental saber si los microorganismos son capaces de crecer adecuadamente y si cuentan con los nutrientes necesarios y las condiciones adecuadas para su desarrollo. El objetivo del presente trabajo es evaluar el crecimiento de *L. arizonensis* LM1564 en cocultivo con *Streptococcus thermophilus* y un sirope

de fructooligosacáridos en un modelo de leche fermentada simbiótica, así como la calidad del producto obtenido. Los resultados del estudio constituyen la primera referencia de la utilización de la cepa en un producto de este tipo.

Materiales y métodos

Evaluación del crecimiento microbiano en un modelo de leche fermentada simbiótica

La leche fermentada fue elaborada a partir de las siguientes materias primas: leche entera en polvo proveniente de Nueva Zelanda, leche descremada en polvo procedente de Brasil, cultivo mixto de *L. arizonensis* LM1564 (con número de acceso MT164468 en el GenBank del NCBI) y *S. thermophilus* ST-M5 (CHR-HANSEN), así como un sirope de fructooligosacáridos (KESTO MIX, TECNOAZUCAR AZCUBA).

Teniendo en cuenta que la mayoría de las leches fermentadas se diseñan con una simbiosis de un lactobacilo y el *S. thermophilus*, se decide incluir este último como parte del cultivo en una relación 1:2 (*L. arizonensis*: *S. thermophilus*). El sirope de FOS se añade en 5 % a partir de los resultados óptimos reportados en la literatura luego de evaluadas diferentes concentraciones.²⁴

Para la estandarización de la leche, cantidades adecuadas de LEP y LDP se disolvieron en agua para obtener una leche con 8,5 % de sólidos no grasos y 2,5 % de grasa cumpliendo con lo establecido en la Norma Cubana para leches fermentadas.²⁵ La leche estandarizada fue esterilizada a 121 °C por 30 min, luego fue inoculada con el cultivo de ambas cepas en simbiosis, homogenizada e incubada a 37 °C. Se tomaron muestras de la leche cada una hora durante un período de 5 h, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar MRSc mediante el método de goteo.²⁶ Las placas sembradas se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas durante 48h. Al término de ese tiempo, se realizó un conteo de colonias (*L. arizonensis*: colonias blancas, convexas; *S. thermophilus*: colonias crema parduzca, planas y de tamaño más pequeño) y se determinó la concentración microbiana correspondiente a cada momento muestreado.

Con los resultados obtenidos se construyeron los gráficos que describen la cinética de crecimiento de los microorganismos crecidos en simbiosis. Para el análisis de la calidad de ajuste de los modelos se utilizó el Modelo de Gompertz, el cual está descrito como el adecuado para evaluar el crecimiento microbiano.²⁷

Elaboración de la leche fermentada simbiótica y evaluación de la calidad

Elaboración de la leche fermentada

La leche fermentada fue elaborada según lo establecido en la Norma Cubana para leches fermentadas,²⁵ como se describió en el acápite anterior, pero con las modificaciones siguientes. La pasteurización se realizó a 90 °C durante 5 minutos. La leche inoculada se envasó en recipientes

plásticos de 450 mL, los que se incubaron para su coagulación. Una vez coagulada la leche fermentada se conservó a 4 °C.

Evaluación física, química y microbiológica

Para la evaluación de la calidad se tomaron 5 envases a las 24 h de fabricado. Luego se realizaron por duplicado las siguientes determinaciones físicas y químicas: pH y acidez,²⁸ contenido de grasa²⁹ y sólidos totales mediante la utilización de una balanza de humedad (BM-50-1 BIOBASE).

Desde el punto de vista microbiológico se realizó el conteo de coliformes,³⁰ conteo de hongos y levaduras³¹ y viabilidad del cultivo en el medio seleccionado a 37 °C.³²

Evaluación sensorial

Para el panel de evaluación sensorial se seleccionaron catadores de la industria láctea. Con anterioridad a la evaluación, el jefe del panel tuvo un intercambio con el equipo para explicar el procedimiento a seguir según la metodología descrita por Duarte³³ y lo establecido en la norma cubana NC-TS-457: 2007²⁵ en cuanto a los requisitos sensoriales.

Se evaluaron las características: sabor, aspecto, aroma y textura y los atributos correspondientes a ellas, en base a un sistema de 5 categorías (Excelente, Buena, Aceptable, Insuficiente y Pésima) siguiendo los criterios establecidos en la metodología citada, luego se seleccionó para cada atributo la categoría más repetida por los evaluadores y la más baja determinó la evaluación de la característica y la calidad sensorial de la leche fermentada.

Los atributos evaluados de cada característica fueron los siguientes:

- Sabor: sabor típico a producto lácteo fermentado, acidez de muy ligera a moderada y dulzor de muy ligero a moderado.
- Aspecto: color uniforme.
- Aroma: olor típico a producto lácteo fermentado.
- Textura: consistencia viscosa, coágulo firme y grumosisidad de ligera a moderada.

Resultados

Crecimiento de *L. arizonensis* en cocultivo con *S. thermophilus* y FOS en modelo de leche fermentada simbiótica

En la Figura 1 se describe el crecimiento de ambas cepas en cocultivo durante la fermentación de la leche a partir de las 0 hasta las 5:00 horas. La fase de latencia o adaptación al nuevo medio de cultivo tuvo lugar en la primera hora del proceso para ambas cepas, siendo más lento el crecimiento de *S. thermophilus* en esta etapa. Luego de este tiempo de fermentación comienza la fase exponencial para ambos microorganismos. El proceso de coagulación de la leche fue aproximadamente a las 4 h,

tiempo en el que *L. arizonensis* alcanza una concentración microbiana de $5,3 \times 10^7$ ufc/mL, mientras que la de *Streptococcus thermophilus* es $9,9 \times 10^7$ ufc/mL.

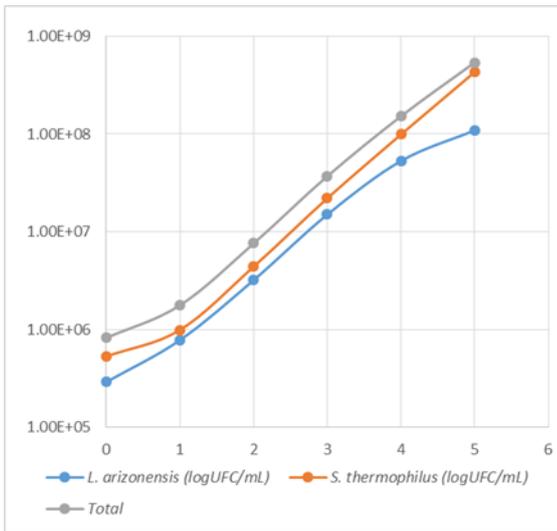


Figura 1. Cinética de crecimiento de *L. arizonensis* y *S. thermophilus* en leche con 5 % de FOS.

En la fase exponencial la velocidad de crecimiento específica de *S.thermophilus* es mayor que la de *L. arizonensis* con una pendiente más acentuada, que se confirma con los valores obtenidos en las ecuaciones de la Figura 2.

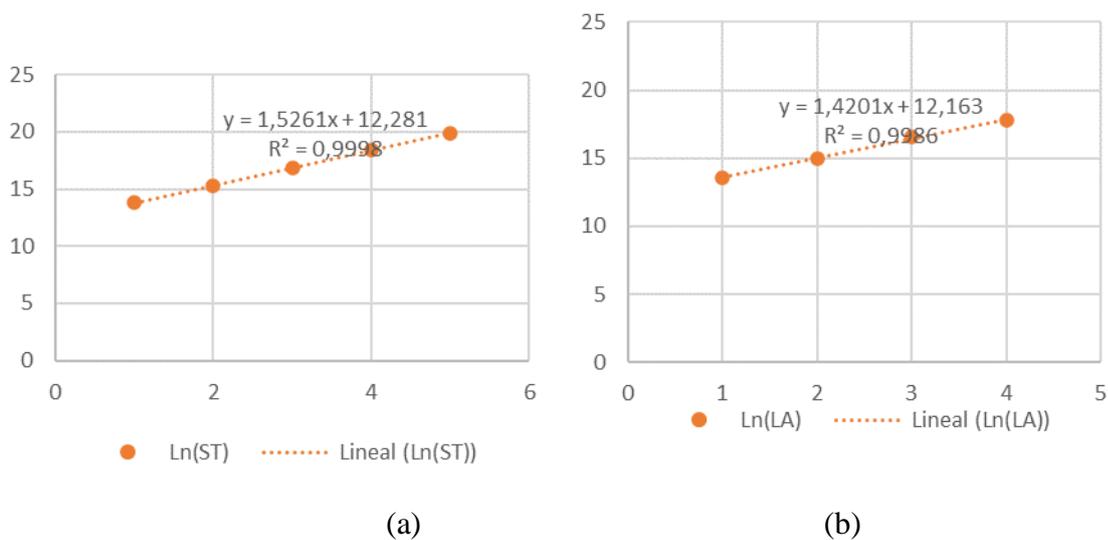


Figura 2. Logaritmo natural del incremento de la concentración microbiana. (a): Logaritmo natural de *L. arizonensis*, (b): Logaritmo natural de *S. thermophilus*.

Se conoce que el logaritmo de la fase exponencial del crecimiento microbiano responde a un comportamiento lineal,³⁴ el cual queda evidenciado en la misma figura con $R^2= 0,9986$ y $R^2=0,9998$ para *L. arizonensis* y *S. thermophilus*, respectivamente. En el análisis de la calidad de los modelos se comprobó que la ecuación de Gompertz fue estadísticamente suficiente para describir los datos experimentales de crecimiento microbiano con un $R^2= 0,9958$.

La concentración microbiana total (Figura 1) en la toma de muestra posterior a la coagulación fue de $1,52 \times 10^8$ ufc/mL. Por tanto, se comprueba que cumple con el mínimo de 10^7 ufc/mL que debe presentar un probiótico para asegurar que las bacterias lleguen vivas al intestino.³⁵ Este resultado también está acorde con la Norma Cubana de Leches Fermentadas²⁵ que establece un mínimo de 10^7 ufc/g en cuanto a la suma de microorganismos que comprenden el cultivo.

Evaluación de la calidad de la leche fermentada simbiótica

Caracterización física y química de la leche fermentada

Los valores obtenidos en los ensayos físicos y químicos realizados a las muestras a las 24 h de producida la leche fermentada y conservada bajo temperaturas de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se muestran en la Tabla 1. Tanto la acidez, como la grasa, los sólidos totales y el pH cumplen con los requisitos establecidos en la norma relacionada con las especificaciones de calidad para leches fermentadas.²⁵

Tabla 1. Características físicas y químicas de la leche fermentada.

Indicadores	Resultados*
Acidez (% ácido láctico)	0,78 ($\pm 0,02$)
Grasa (%)	2,4 ($\pm 0,1$)
Sólidos totales (%)	11,2 ($\pm 0,3$)
pH	4,3 ($\pm 0,2$)

*Los valores son el resultado de la media (\pm Desviación Estándar) con $n=5$

Caracterización microbiológica de la leche fermentada

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los análisis microbiológicos realizados al producto luego de 24 horas de conservación. Con respecto a la contaminación se comprobó que tanto los coliformes totales, como los hongos y levaduras están por debajo de los límites establecidos en las normas cubanas cumpliendo las especificaciones de calidad.

En cuanto a la viabilidad de los microorganismos utilizados se cuantificó un total de $1,42 \times 10^8$ ufc/mL, superando el mínimo establecido de 10^7 ufc/g.²⁵

Tabla 2. Características microbiológicas de la leche fermentada.

Indicadores	Resultados (ufc/mL)*
Coliformes totales	< 10
Hongos y levaduras	< 10
Viabilidad de <i>L. arizonensis</i>	$4,7 \times 10^7$
Viabilidad de <i>S. thermophilus</i>	$9,5 \times 10^7$

*Los valores son el resultado de las determinaciones con $n=5$

Caracterización sensorial de la leche fermentada

Todos los atributos recibieron evaluaciones correspondientes a las categorías Buena y Excelente según los criterios establecidos por Duarte.³³ Los principales defectos percibidos levemente por pocos catadores estuvieron asociados a una tenue intensidad de la acidez y una ligera presencia de grumos blandos, sin afectar de forma significativa la calidad sensorial del producto.

La categoría más repetida en cada atributo fue Excelente, dando lugar a evaluaciones de Excelente para cada característica según la metodología citada.³³ La calidad sensorial de la leche fermentada se corresponde, por tanto, con la categoría establecida como Excelente.

Discusión

La cinética de crecimiento de bacterias probióticas es una herramienta importante para el desarrollo de alimentos que contienen probióticos,³⁶ más aún cuando hay simbiosis microbiana y por tanto codependencia entre ellas. Por ejemplo, la simbiosis entre *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* está muy bien documentada. Numerosos estudios han mostrado que *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* funcionan sinérgicamente intercambiando metabolitos, donde el lactobacilo libera aminoácidos y péptidos a partir de la caseína, que estimulan el crecimiento del estreptococo y este último puede proveerle al lactobacilo ácido fórmico, ácido fólico y dióxido de carbono,³⁷ de esta manera la cinética de crecimiento de ambos microorganismos se acelera de forma considerable. Esta codependencia puede ser similar con otros lactobacilos ya que la producción de aminoácidos tiene lugar debido a una proteinasa extracelular que poseen varios de ellos. *L. arizonensis* es una cepa que no ha sido casi estudiada y no existen reportes de cinética de crecimiento de la misma y menos en simbiosis con *S. thermophilus*. No obstante, si existen datos de otros lactobacilos, por ejemplo autores como Berkman y col.³⁸ muestran una cinética similar a la obtenida en este estudio para *L. bulgaricus* en simbiosis con *S. thermophilus* (1:2). En el caso de *L. plantarum*, Anindita y Khumaira evaluaron la cinética de crecimiento de este microorganismo solo, para la obtención de leche fermentada, donde los mejores resultados los obtienen inoculando a 8 % el cultivo iniciador y empleando como parámetros de incubación 18 h a 37 °C, requiriendo tiempos de fermentación muy superiores a los empleados en el presente estudio.³⁹

Por otra parte, diferentes proporciones de *L. bulgaricus*: *S. thermophilus*: *L. plantarum* (1:1:0, 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3) han sido analizadas con las que se obtuvieron conteo total y cinética general similar para los cuatro casos evaluados y no se particulariza en la cinética individual de cada microorganismo.⁴⁰ La mayoría de los estudios realizados publican la cinética o perfil de acidificación, sin mostrar el crecimiento individual de los microorganismos, sin embargo el objetivo de esta investigación es valorar el comportamiento de cada cepa independiente cuando crecen en simbiosis.

Al mismo tiempo, son varios los factores que inciden en el proceso de fermentación y por tanto en la cinética de los microorganismos. En cuanto a la concentración inicial del inóculo, esta debe ser la adecuada para optimizar el proceso, ya que si es elevada se pierde sustrato debido a una competencia exagerada entre microorganismos, que genera muerte celular y exceso de calor. Por otro lado si la concentración es baja, se incrementa el tiempo de fermentación disminuyendo la productividad y se corre el riesgo de contaminación por microorganismos indeseables.⁴¹ En la investigación llevada a cabo se probó una sola concentración, pero el ensayo con otras concentraciones iniciales puede sugerir el empleo de valores óptimos.

Otro elemento es la temperatura a la cual ocurre el proceso.⁴² En este estudio se realizó la fermentación a 37 °C, por *L. arizonensis* ser aislado de leche materna y la temperatura corporal corresponderse con estos valores. Sin embargo, esta cepa puede crecer a 45 °C²¹ y los productores de la cepa de *S. thermophilus* utilizada reportan acidificaciones más rápidas de la leche a 40 °C y 43 °C.⁴³

La proporción de microorganismos también pudiera modificar la cinética de crecimiento. En la investigación realizada se utilizó la proporción 1:2 (*L. arizonensis*: *S. thermophilus*), ya que es la mejor opción en la cual *S. thermophilus* está por encima del lactobacilo como en la mayoría de las leches fermentadas, pero al mismo tiempo *L. arizonensis* se encuentra en una buena proporción con respecto al cultivo total y así puede ejercer su función tanto en la fermentación como en las propiedades probióticas y beneficiosas del producto. Otros autores reportan estudios en los que se han evaluado proporciones diferentes tales como: 1:1⁴⁴⁻⁴⁵, 1:4 y 1:7³⁸.

La concentración de FOS en el medio¹⁵ y el momento de adición del mismo pudieran también influir en el desarrollo microbiano.⁴⁴ En el estudio realizado se utilizó un 5 % de FOS a partir de constatar en la literatura la obtención de buenos resultados con estas concentraciones.²⁴ El FOS utilizado contiene fructosa y glucosa, hidratos de carbono simples metabolizables por *L. arizonensis* LM1564,²¹ lo que puede incidir en el crecimiento microbiano y la coagulación de la leche. Martínez y col.⁴⁴ demostraron que con la presencia de FOS en el medio hay una estimulación de la producción de células, dado por el hecho de que la glucosa tiene una entrada directa a la célula para la obtención de energía metabólica, mientras que la lactosa debe ser hidrolizada y luego la glucosa resultante es la que se utiliza para el proceso fermentativo, en consonancia todo ello con el principio de economía celular. Por tanto, la adición antes o después de la fermentación y su concentración puede dar lugar a un perfil de acidificación y una cinética diferente.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto y al hecho de que es crucial optimizar las condiciones de crecimiento para las cepas debido a la posible interacción entre los cultivos¹⁵ y la influencia de los diferentes factores sobre ellos, se recomienda realizar un estudio de optimización

donde se evalúen las siguientes variables: temperatura, proporción de los microorganismos, concentración microbiana inicial, porcentaje y momento de adición de FOS, con el objetivo de lograr una mayor concentración microbiana y la coagulación de la leche en el menor tiempo posible y por tanto una mayor productividad. A pesar de ser recomendable realizar un proceso de optimización se demuestra con el estudio realizado que *L. arizonensis* es capaz de desarrollar una leche fermentada, donde los dos microorganismos crecen pasando por las fases de latencia y crecimiento exponencial, contribuyendo cada uno en el proceso de fermentación, coagulación y obtención de la leche fermentada.

Los resultados presentados constituyen los primeros datos de una cinética de crecimiento de *L. arizonensis* en la obtención de una leche fermentada simbiótica.

En relación a los parámetros de calidad de leches fermentadas, los sólidos totales y la grasa dependen en gran medida del proceso de estandarización que se realiza, sin embargo, la acidez y el pH están condicionados por la actividad metabólica de los microorganismos empleados en el proceso fermentativo. En este caso la combinación utilizada de *L. arizonensis* y *S. thermophilus* permitió obtener un producto con las especificaciones establecidas al respecto en las normas cubanas.²⁵

No existen referencias de parámetros físicos y químicos obtenidos en leches fermentadas con la combinación de estas cepas, pero si con *L. acidophilus* y *S. thermophilus* en presencia de FOS, en los cuales se obtienen resultados similares,⁴⁴ aunque no se declara el tiempo de fermentación que se requirió para obtener los valores de pH y acidez necesarios para la coagulación, los cuales pueden diferir teniendo en cuenta el perfil de acidificación de cada cepa.

Respecto a las características microbiológicas, la leche fermentada obtenida cumplió con los requisitos establecidos en la norma cubana tanto en lo relacionado con microorganismos no deseables como en la viabilidad de los cultivos.²⁵ Otras leches fermentadas cubanas han sido reportadas con 2×10^8 ufc/mL de viabilidad en la que se utiliza *L. acidophilus* en la fermentación de leche de búfala⁴⁶ y $1,2 \times 10^8$ ufc/mL también con el citado microorganismo y la presencia de FOS²⁴.

Los resultados de viabilidad están relacionados con varios factores dentro de los cuales se encuentran los nutrientes disponibles en el medio. En este caso la utilización de FOS les garantiza una fuente de carbono simple como es la glucosa, la que pueden utilizar con mayor facilidad que la lactosa contenida en la leche, esta última requiere de un paso previo de hidrólisis para luego utilizar los metabolitos resultantes. El recuento microbiano en otros estudios también ha indicado una estimulación de la producción de células cuando hay presencia de sirope FOS en el medio.⁴⁴ Al mismo tiempo otras investigaciones han demostrado mediante modelos cinéticos mayor viabilidad de los microorganismos con la utilización de FOS respecto al empleo del azúcar como ingrediente.²⁴

Desde el punto de vista sensorial, la leche fermentada obtuvo excelentes evaluaciones de calidad. Otros autores han obtenido leches fermentadas con excelente calidad⁽²⁴⁾ y muy buena calidad y aceptación con la utilización de FOS,⁴⁴ así como evaluaciones de “me gusta mucho” y “me gusta extremadamente”,⁴⁷ aunque ninguna contiene cepas autóctonas de leche materna.

La utilización de *L. arizonensis* LM1564 aislada de leche materna, en cocultivo con *S. thermophilus* y la presencia de FOS, bajo las condiciones probadas dio lugar a una leche fermentada simbiótica con excelente calidad física, química, microbiológica y sensorial. El desarrollo de un alimento funcional simbiótico como este, tiene gran importancia, posee un enfoque novedoso y de gran valor práctico. El mismo se obtiene con un heterotipo bacteriano no reportado como cultivo iniciador, capaz de sobrevivir en condiciones semejantes a la del tracto gastrointestinal y de antagonizar microorganismos como la *E. coli*, por lo que puede producir efectos positivos en el microbiota intestinal humana y utilizarse en el tratamiento de enfermedades asociadas a patógenos intestinales.

Conclusiones

L. arizonensis LM1564 en cocultivo con *S. thermophilus* ST-M5 en una proporción 1:2 y con un 5 % de FOS es capaz de crecer adecuadamente para obtener una leche fermentada simbiótica, constituyendo la primera referencia de su utilización en un producto de este tipo. El crecimiento de este microorganismo en el modelo utilizado permite la obtención de un producto que contiene una cepa autóctona con propiedades probióticas aislada a partir de una fuente no convencional y aprovecha un derivado de la industria azucarera cubana con propiedades prebióticas. La leche fermentada cumplió con los requisitos establecidos en las normas cubanas en cuanto a sus parámetros físicos, químicos y microbiológicos y presentó una excelente calidad sensorial.

Contribución de los autores: conceptualización, T.H., R.T. y A.A.; metodología, T.H., R.T. y A.A.; análisis formal, T.H., L.M.; investigación, T.H., R.O. y D.H.; análisis de datos, T.H., R.O., D.H., L.M., R.T. y A.A.; redacción-preparación del borrador original, T.H.; redacción-revisión y edición, T.H., L.M., R.T. y A.A. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: esta investigación no recibió financiamiento externo.

Conflictos de Intereses: los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

1. Marco ML, Sanders ME, Gänzle M, Arrieta MC, Cotter PD, De Vuyst L, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021;18(3):196-208.

2. Moineau-Jean A, Champagne CP, Roy D, Raymond Y, LaPointe G. Effect of Greek-style yoghurt manufacturing processes on starter and probiotic bacteria populations during storage. *International Dairy Journal*. 2019;93:35-44.
3. Beltrán-Barrientos L, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez M, González-Córdova A, Vallejo-Córdova B. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of dairy science*. 2016;99(6):4099-110.
4. Khorshidian N, Yousefi M, Mortazavian AM. Fermented milk: The most popular probiotic food carrier. *Advances in Food and Nutrition Research*. 94: Elsevier; 2020. p. 91-114.
5. Mohammadi R, Sohrabvandi S, Mohammad Mortazavian A. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Engineering in Life Sciences*. 2012;12(4):399-409.
6. Turkmen N, Akal C, Özer B. Probiotic dairy-based beverages: A review. *Journal of Functional Foods*. 2019;53:62-75.
7. Tamime AY. Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *European journal of clinical nutrition*. 2002;56(4):S2-S15.
8. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2020;70(4):2782-858.
9. NCBI. Taxonomy. *Lactiplantibacillus plantarum*.: National Center for Biotechnology Information; 2023 [31-octubre-2023]. Available from: <http://ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>.
10. Sakandar HA, Zhang H. Trends in Probiotic (s)-Fermented milks and their in vivo functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;110:55-65.
11. Hou Q, Li C, Liu Y, Li W, Chen Y, Bao Y, et al. Koumiss consumption modulates gut microbiota, increases plasma high density cholesterol, decreases immunoglobulin G and albumin. *Journal of Functional Foods*. 2019;52:469-78.
12. Li C, Kwok L-Y, Mi Z, Bala J, Xue J, Yang J, et al. Characterization of the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of fermented milks produced with *Lactobacillus casei*. *Journal of dairy science*. 2017;100(12):9495-507.
13. Fernandez MA, Marette A. Novel perspectives on fermented milks and cardiometabolic health with a focus on type 2 diabetes. *Nutrition reviews*. 2018;76(Supplement_1):16-28.
14. Park S-Y, Seong K-S, Lim S-D. Anti-obesity effect of yogurt fermented by *Lactobacillus plantarum* Q180 in diet-induced obese rats. *Korean journal for food science of animal resources*. 2016;36(1):77.

15. Nyanzi R, Jooste PJ, Buys EM. Invited review: Probiotic yogurt quality criteria, regulatory framework, clinical evidence, and analytical aspects. *Journal of Dairy Science*. 2021;104(1):1-19.
16. Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Du S, Ye F, et al. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*. 2014;30:1-10.
17. Jabur AK, Isa JK, TofahAlAzzawi JA. A Study the Characteristics of *Bifidobacterium* ssp Isolated from Breast Milk as a Probiotic in Vitro. *Eurasian Medical Research Periodical*. 2022;14:56-67.
18. Duraisamy S, Husain F, Balakrishnan S, Sathyan A, Subramani P, Chidambaram P, et al. Phenotypic assessment of probiotic and bacteriocinogenic efficacy of indigenous LAB strains from human breast milk. *Current Issues in Molecular Biology*. 2022;44(2):731-49.
19. D'Alessandro M, Parolin C, Patrignani S, Sottile G, Antonazzo P, Vitali B, et al. Human breast milk: A source of potential probiotic candidates. *Microorganisms*. 2022;10(7):1279.
20. Rajoka M, Shi J, Zhu J, Shao D, Huang Q, Yang H, et al. Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101:35-45.
21. López N. Aislamiento de cepas potencialmente probióticas a partir de leche materna. Camagüey, Cuba: Universidad de Camagüey; 2018.
22. Prieto L. Optimización y evaluación de propiedades probióticas de cepas aisladas de leche materna. Camagüey, Cuba.: Universidad de Camagüey; 2019.
23. Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, Reimer RA, Reid G, Verbeke K, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2020;17(11):687-701.
24. Valdés M, Iglesias D, Martínez L, Guzmán TM. Empleo de fructooligosacárido en el desarrollo de una leche fermentada simbiótica saborizada. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2022;32(1):63-8.
25. NC-TS-457: Leches fermentadas. Especificaciones. Cuba, (2007).
26. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods*. 2001;44(2):121-9.
27. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, Van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*. 1990;56(6):1875-81.
28. NC-ISO-11869. NC-ISO-11869. Determinación de acidez titulable. Método potenciométrico. Cuba. Cuba2006. p. 3-5.

29. NRIAL-042. Yogurt. Determinación del contenido de materia grasa. Método de rutina. Cuba2008.
30. NC-ISO-4832. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de coliformes. Técnica de placa vertida. Cuba. Cuba2010.
31. NC-100. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25 °C. Cuba. Cuba2016.
32. Pedrique M, De Castro N. Reproducción y Crecimiento Microbiano. Catedra de Microbiologia-Facultad de Farmacia (págs 1-23) UCV. 2008.
33. Duarte C. Metodología para la evaluación de la calidad sensorial de los alimentos. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 2017;27(2):31-9.
34. Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higton G. Industrial microbiology: an introduction: John Wiley & Sons; 2009.
35. Cruchet S. ¿Cuándo un microorganismo se considera probiótico? Revista Médica Revisada por Pares Medwave. 2007; <http://doi.org/10.5867/medwave.2007.05.3253>.
36. Jiang N, Kumar GD, Chen J, Mishra A, Solval KM. Comparison of concurrent and mixed-flow spray drying on viability, growth kinetics and biofilm formation of *Lactobacillus rhamnosus* GG microencapsulated with fish gelatin and maltodextrin. Lwt. 2020;124:109200.
37. Ge Y, Yu X, Zhao X, Liu C, Li T, Mu S, et al. Fermentation characteristics and postacidification of yogurt by *Streptococcus thermophilus* CICC 6038 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CICC 6047 at optimal inoculum ratio. Journal of Dairy Science. 2024;107(1):123-40.
38. Berkman T, Bozoğlu T, Özilgen M. Mixed culture growth kinetics of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Enzyme and microbial technology. 1990;12(2):138-40.
39. Anindita NS, Khumaira A. The influence of variations in starter concentration *Lactobacillus plantarum* AS4 indigenous from human breast milk to the characteristics of fermented milk. Advances in Food Science, Sustainable Agriculture and Agroindustrial Engineering (AFSSAAE). 2023;6(1).
40. Lang F, Wen J, Wu Z, Pan D, Wang L. Evaluation of probiotic yoghurt by the mixed culture with *Lactobacillus plantarum* A3. Food Science and Human Wellness. 2022;11(2):323-31.
41. Arévalo H, Arias G. Determinación de la concentración de inóculo y tiempo de fermentación, utilizando microbiota de los granos de kéfir como agente biológico y suero de leche como sustrato. 2008.
42. Rodríguez E. Modelo matemático de crecimiento celular que describe la dinámica de microorganismos durante la fermentación. México: Tecnológico Nacional de México; 2021.

43. F-DVS. ST-M5. Product Information. . <https://conovehonakopcz/wp-content/uploads/2014/04/stm5pdf>. 2014.
44. Martínez OR, Martínez JAR, Toledo LET, Cruz ERP, Alomá YL, Sánchez OH, et al. Leche fermentada simbiótica con sirope prebiótico cubano. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018;27(3).
45. Perea J, Brito AI. Evaluación de la fermentación láctica en un yogur dietético. 2008.
46. Íñiguez C, Rodríguez T, Hernández O, Martínez I, Nieto M. Desarrollo de una leche fermentada a partir de leche de búfala y cultivo de *Lactobacillus acidophilus*: Development of fermented milk from buffalo milk using culture of *Lactobacillus acidophilus*. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2018;28(2):1-6.
47. Aguila C. Desarrollo de leches fermentadas simbióticas con cultivo mixto probiótico y fructooligosacáridos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana: Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos; 2020.

/ **Received:** 22 May 2024 | **Accepted:** 6 June 2024 | **Published:** 15 June 2024 |

Citation: Hernández Sariego T, Rodríguez Odel R, Hernández Machado DR, Matos Mosqueda L, Tejedor Arias R, Arenal A. Leche fermentada simbiótica a partir de cocultivo con una cepa autóctona aislada de leche maternal. *Bionatura*. 2024;9(2). DOI: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2024.09.02.10>

Peer review information: Bionatura thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>.

All articles published by Bionatura Journal are freely and permanently accessible online immediately after publication, without subscription charges or registration barriers.

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).