

PERMANENCIA DE LACTOBACILOS AISLADOS DE LECHE HUMANA Y FÓRMULAS INFANTILES DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE UN INGREDIENTE FERMENTADO

PERMANENCE OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM HUMAN MILK AND INFANT FORMULAS DURING THE MANUFACTURING PROCESS OF A FERMENTED INGREDIENT

RESUMEN

Se han demostrado los beneficios a la salud que proveen los microorganismos aislados de leche humana por lo que su incorporación a alimentos puede servir para generar alimentos con potencial funcional, pero deben mantenerse viables. El objetivo de este trabajo fue obtener un alimento fermentado deshidratado, utilizando lactobacilos aislados de leche humana y fórmulas infantiles comerciales y evaluar su viabilidad después de ser secado en cama de espuma (FMD). Se utilizaron melones (*Cucumis melo* L.) maduros y microorganismos aislados de las fuentes mencionadas. Se extrajo jugo y se fermentó durante 24h/37°C. El FMD se realizó con albúmina de huevo y jugo fermentado (1:5 p/p) en deshidratador a 55°C con flujo de aire por 2.5 horas hasta peso constante. Se molió y se determinó la viabilidad de los microorganismos al final del secado y a los 5 días. Se encontró que los microorganismos viables aumentaron en 3log por lo que tienen potencial para ser usados en alimentos.

Palabras clave: leche humana; lactobacilos; secado en cama de espuma; melón; fermentación.

DANIEL DE LA PEÑA AGUIRRE¹

RUTH E. BELMARES CERDA¹

MIRIAM DESIREE DÁVILA
MEDINA²

MAYELA GOVEA SALAS³

ROSA M. RODRÍGUEZ JASSO¹

ARACELI LOREDO TREVIÑO¹

1. Departamento de
Investigación en Alimentos,
Facultad de Ciencias
Químicas, Unidad Sureste,
UAdeC.

2. Grupo de Bioprocesos y
Bioquímica Microbiana,
Facultad de Ciencias
Químicas, Unidad Sureste,
UAdeC.

3. Grupo de Nanobiociencia,
Facultad de Ciencias
Químicas, Unidad Sureste,
UAdeC.

Correspondencia
araceliloredo@uadec.edu.mx
ORCID: 0000-0002-2857-3340
SCOPUS ID: 57196029690

Recepción de artículo
13 de junio de 2024

Artículo aceptado
23 de septiembre de 2024.

ABSTRACT

*The health benefits provided by microorganisms isolated from human milk have been demonstrated, so their incorporation into food can serve to generate foods with functional potential, but they must remain viable. The objective of this work was to obtain a dehydrated fermented food, using lactobacilli isolated from human milk and commercial infant formulas, and to evaluate their viability y after being dried in foam mat (FMD). Ripe cantaloupes (*Cucumis melo* L.) and microorganisms isolated from the mentioned sources were used. Juice was extracted and fermented for 24h/37°C. The FMD was performed with egg albumen and fermented juice (1:5 w/w) in dehydrator at 55°C with air flow for 2.5 hours until constant weight. The dried material was ground and the viability of the microorganisms was determined at the end of drying and after 5 days. Viable microorganisms were found to increase by 3log so they have potential to be used in food.*

Keywords: human milk; lactobacillus; foam mat drying; cantaloupe; fermentation.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos probióticos pudieran tener efectos benéficos a la salud por las moléculas que se producen durante su cultivo y cuando son consumidos y logran colonizar el tracto intestinal del hospedador. Dentro de las fuentes de microorganismos con potenciales beneficios a la salud se encuentra la leche materna (Cárdenas y col., 2014). La alimentación con leche materna durante los primeros meses de vida ha demostrado tener beneficios a corto, mediano y largo plazo en humanos, esto por el efecto de diversas moléculas y células (Fernández y col., 2013). Dentro de las células que componen la leche materna, hay una gran microbiota y parte de ella son lactobacilos los cuales son considerados probióticos.



Se han aislado con anterioridad microorganismos de leche materna y se ha demostrado su influencia benéfica a la salud, tanto, que muchas leches maternizadas, mejor conocidas como “fórmulas para bebés”, los están incluyendo en sus formulaciones. Debido a su naturaleza, estos microorganismos tienen una gran capacidad para resistir la digestión y llegar y colonizar el intestino, por lo que tienen potencial para ser usados en alimentos (Fernández y Rodríguez, 2020; Calatayud y col., 2019).

La búsqueda de microorganismos probióticos para mejorar la salud también viene impulsada por la necesidad de ofrecer alternativas alimenticias que, además de nutrir, puedan tener algún efecto benéfico adicional en la salud de los consumidores. Esto porque las enfermedades asociadas a una alimentación no balanceada y a la poca o nula actividad física debido a diversos factores entre los que pueden destacar un estilo de vida que no permite darse el tiempo para comer adecuadamente y porque no se tiene acceso en todo momento a los alimentos (Bigliardi y Galati, 2013).

En el caso de algunas frutas, se vuelve difícil conservarlas frescas, por lo que hay alternativas para conservarlas, pero pueden perder algunas propiedades tanto funcionales como organolépticas. En este trabajo se aplicó la técnica de secado en cama de espuma en melón. Esta técnica de deshidratado es rápida, sencilla y puede ser de bajo costo. Es especialmente útil en el caso de líquidos o jugos con alto contenido de azúcar porque no quedan polvos “pegajosos” (Yüskel y Pandiselvam, 2023).

En este proyecto, para hacer un alimento fermentado y deshidratado se eligió melón, ya que, por un lado, Coahuila fue el principal productor a nivel nacional en 2017 (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural [SEDUR], 2017) y se mantiene en los primeros tres lugares hasta 2023 (Desarrollo, 2024; SEDUR, 2024). Por otro lado, el melón tiene características organolépticas y funcionales muy agradables, sin embargo, casi todo su consumo es en fresco. Así que el objetivo de este trabajo fue aislar microorganismos con características de lactobacilos de fórmulas maternizadas y de leche materna para ver si es posible que



crezcan en jugo de melón y se conserven viables después de ser sometidos a secado en cama de espuma, esto para elaborar un ingrediente deshidratado para la formulación de alimentos con potencial probiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIA PRIMA. Los melones se compraron en el mercado de abastos de la ciudad de Saltillo, Coahuila, México y fueron trasladados al Laboratorio de Análisis de Alimentos del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Ahí se lavaron con agua y jabón para eliminar la tierra y suciedad que pudieran tener en la cáscara; una vez secos, se pesaron y pelaron y se separó la cascara de la pulpa y las semillas para determinar rendimiento.

La pulpa del melón se pasó por un extractor de jugo donde se separó la pulpa del jugo. Los extractos obtenidos se escaldaron a 70°C durante cinco minutos para inactivar enzimas. Una vez obtenido el jugo sin pulpa y el jugo con la pulpa y escaldado se procedió a congelarlos en un congelador que alcanza los -18°C hasta su uso.

OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE LAS CEPAS. La obtención de los microorganismos usados se obtuvo de dos fórmulas de leche infantil y de una muestra de leche materna. Las leches maternizadas se procesaron de la siguiente manera. Se hizo un aislamiento y conteo usando diluciones seriadas sembrando por vertido en placa en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y se incubaron 24h a 37°C. La leche materna se obtuvo de una voluntaria a quien se le pidió que antes de tomar la muestra se lavara con agua y jabón la piel y esterilizara los instrumentos para la extracción. La muestra se recogió en una bolsa plástica estéril y se mantuvo en refrigeración hasta su procesamiento.

Una vez viendo crecimiento de los microorganismos se procedió a aislar usando el mismo medio de cultivo con la técnica de estriado en cuatro



campos y se aisló una cepa de cada fuente, EN, NT y HM, siendo HM la cepa aislada de leche materna, y se hicieron observaciones microscópicas buscando bacilos largos, no esporulados, Gram positivos.

FERMENTACIÓN. La fermentación se llevó a cabo por triplicado en frascos estériles de vidrio donde se agregaron 50 ml de jugo de melón y se añadieron las cepas correspondientes. Se decidió inocular con tres asadas de cada cepa. Las cepas usadas para inocular tenían 18 h de incubación. Las condiciones de fermentación fueron estáticas, 37°C durante 24 horas.

Se midieron durante cada hora los Grados Brix (°Brix) que corresponden al azúcar presente en el jugo y el pH. Esto se hizo con un refractómetro digital marca Hanna y con un potenciómetro de banco marca Ohaus ST3100-F. Una vez terminada la fermentación se procedió a hacer un conteo de microorganismos por vertido en placa usando el medio antes mencionado.

SECADO EN CAMA DE ESPUMA. Para el secado del fermentado se hizo una espuma con clara de huevo debido a su alto contenido de proteína y capacidad de hacer espuma. El espumado se hizo con una batidora de mano a máxima velocidad hasta lograr picos firmes y se hizo una mezcla con el jugo fermentado en relación 1:5 espuma-jugo (v/v). Esta espuma se colocó en charolas de aluminio previamente pesadas y se colocaron en un deshidratador marca Excalibur Economy mode 9 con flujo horizontal de aire a 55°C durante dos horas, pesando las muestras cada diez minutos para obtener la cinética de secado. Al término de este tiempo se volvió a determinar el número de UFC. Las camas usadas fueron de 15x5x1cm para mantener la misma área para todos los tratamientos. Para analizar las diferencias en la velocidad de secado se calcularon las pendientes de las curvas de pérdida de peso hasta los 80 minutos, esto porque ahí es cuando la curva empezaba a mantenerse horizontal, es decir, que ya no había una pérdida de peso que se pudiera medir. Se hizo un análisis de varianza para diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones con un $\alpha=0.05$ usando el software Statistica 64 con la incorporación de un blanco que consistió en jugo sin fermentar y sin ser sometido a FMD.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ASLAMIENTO. Se logró aislar de cada muestra una cepa bacteriana con características macro y microscópicas de lactobacilo. Las características macroscópicas fueron colonias cremosas, brillantes, redondas, convexas, de 0.2mm de diámetro y en microscopía bacilos cortos Gram positivo. En la Figura 1 se puede observar las características macroscópicas de las cepas aisladas en agar MRS. Estas características coinciden con características macroscópicas descritas previamente (Kumar y Kumar, 2014) Los microorganismos adicionados a las leches maternizadas, son capaces de resistir el proceso de desecado además de que son capaces de conservarse viables, en este trabajo se buscó aislar una cepa a partir de leche humana para ver si es posible que pudiera compararse con las cepas encontradas en las fórmulas lácteas comerciales. Los lactobacilos tienen la capacidad de crecer en el medio MRS, el cual es específico para lactobacillus.

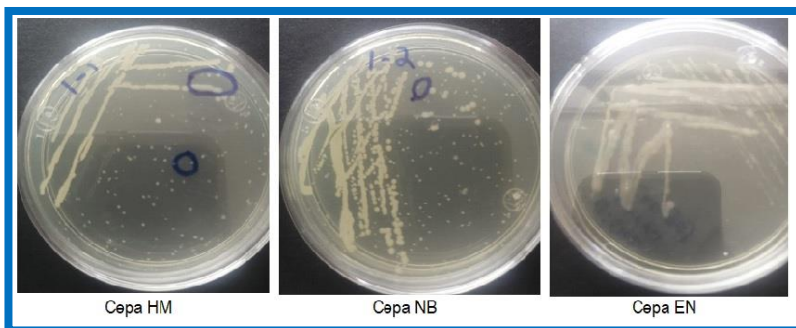


Figura 1. Características macroscópicas de las cepas aisladas de leche humana (HM), y de las fórmulas lácteas de leche maternizada (NB y EN) en agar MRS después de 24 horas de incubación.

FERMENTACIÓN. En la Figura 2 se puede ver el comportamiento en el descenso de los grados Brix, siendo estos los azúcares solubles en la muestra. Este comportamiento es debido al consumo de los azúcares por los microorganismos, además del descenso de pH, el cual fue hasta 4.5. esto porque según la Norma Oficial Mexicana de lácteos (Secretaría de Salud [SSA], 2010) indica que las leches fermentadas deben tener un pH máximo de 4.5 lo cual se logró a las 24 h de fermentación. Después de eso, el jugo fermentado se guardó en



refrigeración. Estos resultados indican que, a pesar de que los lactobacilos usen como fuente de carbono y energía lactosa, son capaces de crecer en otros azúcares como los que podemos encontrar en los jugos de frutas. Esto abre la posibilidad de utilizarlos para lograr alimentos vegetales fermentados y que produzcan ácidos orgánicos relacionados con potencial funcional, ya que son capaces de estimular el sistema inmunológico, etc.

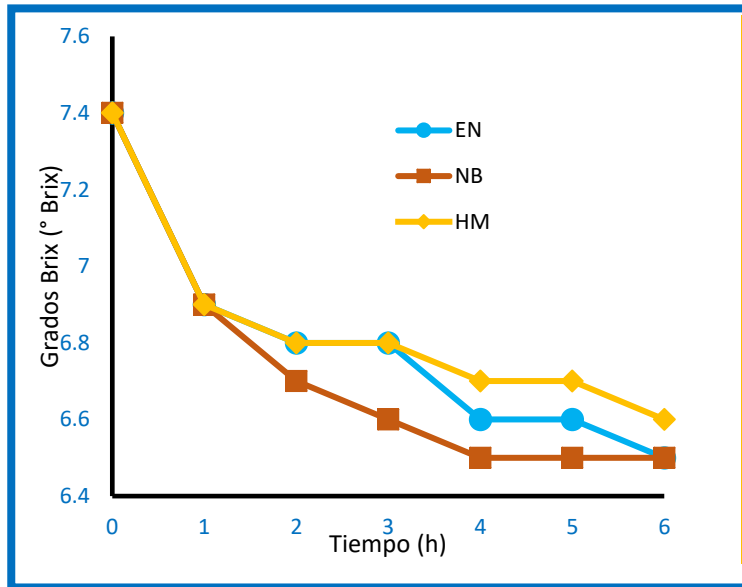


Figura 2. Descenso en los grados Brix a lo largo de la fermentación. Se puede observar que el descenso es en las primeras horas del tiempo de cultivo.

SECADO. En la Figura 3 se puede ver la cinética de secado de los tratamientos de las espumas con los diferentes jugos fermentados. Lo que se busca es un secado rápido con el fin de preservar las características de los jugos deshidratados y, en este caso, conservar viables a los microorganismos. Se compararon las pendientes de secado de los tres tratamientos contra un blanco de sólo jugo sin secado en estera de espuma. Podemos ver que según el análisis estadístico de las pendientes de secado no hay diferencia entre el blanco, el jugo fermentado con NB y HM, mientras que con EN sí hubo diferencia, siendo esta la que tiene un valor de pendiente más pronunciado lo que indica que fue la que se secó más rápido. Es importante mencionar que este tipo de secado permite obtener polvos de más fácil manejo. Los



jugos de frutas, altos en azúcar, al secarse tienen una textura “pegajosa” y son altamente higroscópicos, los polvos obtenidos con el método de secado en estera de espuma no lo son (Brar y col., 2020).

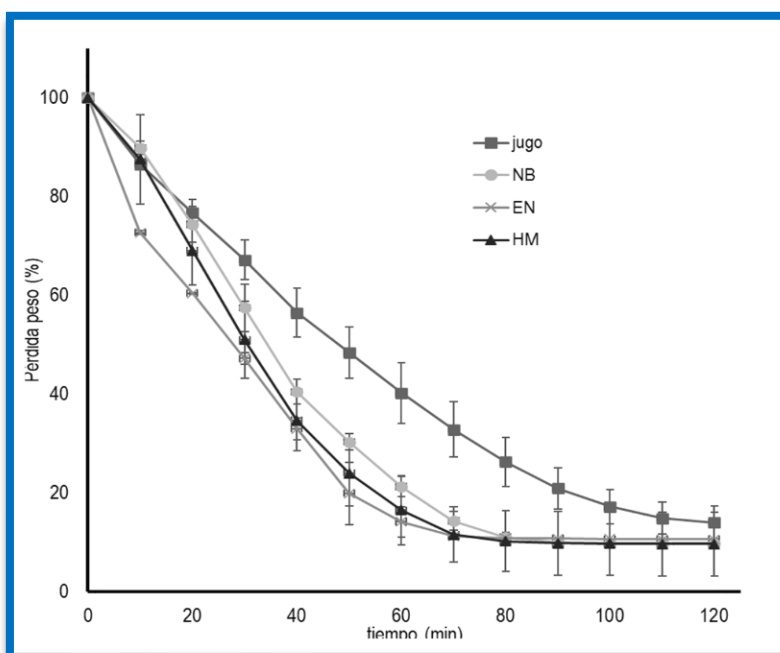


Figura 3. Cinética de secado de los jugos fermentados. HM corresponde al microorganismo aislado de leche humana y NB y EN a fórmulas comerciales.

El análisis estadístico se muestra en la Tabla 1. Dado que la pendiente es negativa, podemos ver que mientras más cercano a cero sea la pendiente, menos inclinada, es decir, se tarda más en perder peso. Esto quiere decir que el control, o sea, el jugo sin fermentar y sin haber sido sometido a la técnica de secado en cama de espuma, fue el que más se tardó en secar y es diferente estadísticamente a los demás. En cuanto a los tratamientos de los jugos fermentados y deshidratados por medio de FMD el que más se tardó fue el fermentado con la cepa EN, seguido de HM y el que menos tardó fue el jugo con la cepa NB. Con esto podemos decir que la técnica de FMD permite un secado rápido que pudiera permitir conservar las propiedades funcionales de los materiales sometidos a este proceso.

Tabla 1. Comparación de medias de secado de los jugos fermentados y secados con la técnica de FMD y de jugo sin fermentar y sometido a secado tradicional ($\alpha=0.05$).

Tratamiento	Pendiente
Jugo	-0.913 ± 0.07^a
NB	-1.193 ± 0.17^c
EN	-1.088 ± 0.13^b
HM	-1.165 ± 0.04

CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS VIABLES. En la Tabla 2 se puede observar el comportamiento de la cantidad de organismos viables (UFC) al término del secado y después de cinco días de almacenamiento a temperatura ambiente. Podemos ver que disminuye el contenido de microorganismos viables, pero al cabo de cinco días, aumentó. Cabe mencionar que los polvos absorbieron un poco de humedad, por lo que este crecimiento puede ser debido a esto. Este comportamiento indica que los microorganismos aislados son capaces de resistir la desecación y de reproducirse, por lo que el microorganismo aislado de leche materna pudiera ser usado para la elaboración de alimentos con probióticos. Varias fórmulas lácteas maternizadas agregan en su formulación probióticos con el fin de proveer mayores beneficios, pero deben resistir el proceso de secado además de durar el tiempo de vida útil del alimento, así como también, ser capaces de llegar vivas al intestino (Rodríguez-Arreola y col., 2021) El comportamiento observado por el microorganismo aislado de leche humana muestra potencial para ser usado posteriormente.



Tabla 2. Unidades formadoras de colonias por ml o g al cabo del secado y a los cinco días de almacenamiento.

Cepa	0 días	5 días
HM	6.5×10^3	6×10^6
NB	5×10^3	8×10^6
EN	5.5×10^3	6×10^6

CONCLUSIONES

Se logró aislar microorganismos con características de lactobacilos de leches maternizadas y de leche materna. Se usaron para fermentar jugo de melón que fue secado usando la técnica de secado en cama de espuma y se evaluó su viabilidad. Se encontró que todos los microorganismos fueron capaces tanto de crecer en el jugo de melón, así como mantenerse viables en el jugo deshidratado. Esto abre las posibilidades para elaborar alimentos con este tipo de microorganismos, además de que pueden generarse materias primas estables para elaborarlos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (COECYT) por el financiamiento para continuar esta investigación por medio del proyecto COAH-2022-C19-C129 denominado "Estabilización de jugo y pulpa de melón para su uso como ingrediente para alimentos funcionales".

REFERENCIAS

Bigliardi, B., y Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 31(2): 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006>



- Brar, A. S., Kaur, P., Kaur, G., Subramanian, J., Kumar, D., y Singh, A. (2020). Optimization of Process Parameters for Foam-Mat Drying of Peaches. *International Journal of Fruit Science*, 20(S3): S1495–S1518. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1812017>
- Calatayud, M., Koren, O., y Collado, M. C. (2019). Maternal Microbiome and Metabolic Health Program Microbiome Development and Health of the Offspring. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 30(10): 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.07.021>
- Cárdenas, N., Calzada, J., Peirotén, Á., Jiménez, E., Escudero, R., Rodríguez, J. M., Medina, M., y Fernández, L. (2014). Development of a potential probiotic fresh cheese using two lactobacillus salivarius strains isolated from human milk. *BioMed Research International*, (14): 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/801918>
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., y Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research*, 69(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
- Fernández, L., y Rodríguez, J. M. (2020). Human Milk Microbiota: Origin and Potential Uses. *Nestle Nutrition Institute Workshop Series*, 94: 75–85. <https://doi.org/10.1159/000505031>
- Kumar, A., y Kumar, D. (2014). Isolation and characterization of bacteria from dairy samples of Solan in Himachal Pradesh for identification of Lactobacillus spp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(2): 110–114.
- Rodríguez-Arreola, A., Solís-Pacheco, J. R., Lacroix, M., Edgar, B.-L., Navarro-Hernandez, R. E., Sandoval-Garcia, F., Gutiérrez-Padilla, J. A., García-Morales, E., y Aguilar-Uscanga, B. R. (2021). In vivo assessment and characterization of lactic acid bacteria with probiotic profile isolated from human milk powder. *Nutrición Hospitalaria*, 1(38): 152–160. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20960/nh.03335>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). *Aumenta producción de melón mexicano más de 21 mil toneladas en un año*. Recuperado el 30 de abril de 2024 de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/aumenta-produccion-de-melon-mexicano-mas-de-21-mil-toneladas-en-un-ano>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2024). *Melón Mexicano, un fruto con creciente demanda y producción nacional: Agricultura*. Recuperado el 30 de abril de 2024 de <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/melon-mexicano-un-fruto-con-creciente-demanda-y-produccion-nacional-agricultura>
- Secretaría de Salud. (2010). *NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de*



prueba.

Yüskel, A. N., y Pandiselvam, R. (2023). Mathematical Modeling of Microwave-Assisted Foam-Mat Drying of Kefir. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2023: Article ID 3917292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2023/3917292>

