

EVALUACIÓN DE UN NÉCTAR DE MORA FUNCIONAL CON INULINA Y *LACTOBACILLUS CASEI*

ASSESSMENT OF A FUNCTIONAL BLACKBERRY NECTAR SUPPLEMENTED WITH INULIN AND *LACTOBACILLUS CASEI*

Lesly Espinoza B.¹ & Ana Hidalgo A.^{1*}

Recibido: 23 de septiembre 2024 / Aceptado: 24 de febrero 2025

DOI 10.26807/ia.v13i2.294

RESUMEN

Los alimentos funcionales ofrecen beneficios para la salud cuando se acompañan de una dieta equilibrada. En el caso de los productos que contienen probióticos, se debe asegurar la viabilidad de los microorganismos durante su vida útil. En este estudio, se desarrolló un néctar de mora (*Rubus glaucus*) funcional mediante la adición de inulina como prebiótico y *Lactobacillus casei* como probiótico. El objetivo fue elaborar una bebida que cumpla con los requerimientos de viabilidad del probiótico y de nutrición para el consumidor. Se investigaron los efectos de la adición de inulina en concentraciones de 0, 2 %, 4 % y 6 % del pH y de las concentraciones de glucosa de la fruta sobre el crecimiento del probiótico *Lactobacillus casei*. Además, se realizaron pruebas sensoriales para evaluar la acidez y aceptabilidad del producto. El estudio se llevó a cabo durante 28 días bajo condiciones de almacenamiento en refrigeración. Los resultados mostraron una reducción logarítmica del probiótico con todos los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con un 4 % de inulina y pH de 3,07 permitió un mejor crecimiento de *Lactobacillus casei*, manteniéndolo viable durante 14 días. Finalmente, se observó un consumo significativo de la glucosa propia de la fruta que, al ser metabolizada por *L. casei*, proporcionó un sabor más ácido en el néctar, cambio determinado por la percepción sensorial de los jueces evaluadores.

Palabras clave: cinética de crecimiento, inulina, *Lactobacillus casei*, néctar, probiótico.

ABSTRACT

Functional foods offer health benefits when they form part of a balanced diet. Among them, products that contain probiotics must ensure the viability of microorganisms throughout their shelf life. In this study, a functional Andean blackberry (*Rubus glaucus*) nectar was prepared by adding inulin as a prebiotic and *Lactobacillus casei* as a probiotic. The goal was to elaborate a beverage that meets the probiotic viability and nutritional requirements for consumers. The effects of adding inulin at concentrations of 0, 2%, 4%, and 6%, as well as the pH conditions and glucose concentrations of the fruit over the growth of the probiotic *Lactobacillus casei* were investigated. Additionally, sensory tests were conducted to assess the acidity and acceptance of the product. The study took place for 28 days under refrigerated storage conditions. The results showed a logarithmic reduction in probiotic growth with all treatments. However, the treatment with 4% of inulin and pH of 3.07 assured the greater growth of *Lactobacillus casei*, keeping it viable in the lapse of 14 days. Finally, a significant consumption of the fruit's own glucose was observed, metabolized by *L. casei*, which provided a more acidic taste in the nectar, change that was determined by the sensory perception of the judges.

Keywords: growth kinetics, inulin, *Lactobacillus casei*, nectar, probiotic.

¹Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Quito-Ecuador (milemars@gmail.com; *correspondencia: amhidalgo@uce.edu.ec).

INTRODUCCIÓN

La incorporación de probióticos en alimentos contribuye a la estabilización microbiológica del producto y a la inhibición de microorganismos patógenos (Gibson et al., 2017). Además, los probióticos favorecen la síntesis de nutrientes, y su actividad metabólica influye positivamente en el sabor, aroma y textura de los alimentos (Wang et al., 2021), lo que los hace altamente aplicables en la industria alimentaria. Esto abre oportunidades para el desarrollo de zumos y néctares de frutas enriquecidos con probióticos como alternativa a los productos probióticos a base de lácteos tradicionales. Estudios respaldan la efectividad de la ingesta de los probióticos en el tratamiento de afecciones gastrointestinales como la diarrea asociada a antibióticos y la enfermedad diverticular sintomática. Las cepas *L. casei* y *L. bulgaricus* ayudan a prevenir y mejorar estos problemas. Además, una combinación de diferentes cepas *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium infantis*, *B. longum*, *B. breve* y *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* ha demostrado ser beneficiosa en el tratamiento de la inflamación no especificada del reservorio ileal en pacientes con colitis ulcerosa (Guarner et al., 2023).

Por otro lado, el uso de inulina como prebiótico no solo proporciona nutrientes a los probióticos adicionados a un producto, sino que también beneficia a la microbiota intestinal del consumidor, mejorando su salud (Guarner et al., 2023).

Investigaciones como la de Dahal et al. (2020) han buscado alternativas a los productos lácteos probióticos. En la evaluación de la calidad funcional y estudio de la vida útil del jugo de yacón simbiótico, con el uso del *Lactobacillus acidophilus*, estos investigadores estudiaron los cambios en las propiedades fisicoquímicas durante el almacenamiento. Ellos concluyeron que el jugo de yacón puede actuar como sustrato para el crecimiento de microorganismos probióticos y que el almacenamiento como jugo simbiótico es beneficioso tanto en el aspecto sensorial como nutricional. Incluso, se demostró un bajo recuento de levaduras y mohos, lo que permitiría su consumo como un jugo normal, aún después de que disminuya la viabilidad del organismo láctico.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de inulina sobre el crecimiento del probiótico *Lactobacillus casei* en néctar de mora (*Rubus glaucus*). Los resultados de la investigación, junto con su interpretación estadística, se presentan en términos del crecimiento microbiano, variación del pH y de la concentración de glucosa en el néctar, y la valoración sensorial con jueces entrenados de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. Este proyecto aporta con conocimientos para futuras investigaciones sobre el desarrollo de alimentos funcionales con probióticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales utilizados en la

investigación incluyeron medios de cultivo como agar MRS GranuCult®, agua de peptona GranuCult® y caldo nutritivo GranuCult®; la cepa ATCC® *Lactobacillus casei* marca Culti-Loops™, fibra de inulina granular marca INNOVAPEC (División-Alimentos), néctar de mora pasteurizado, compuesto de 30 % pulpa de mora, 55 % agua, 10 % azúcar, e inulina en concentraciones de 0 %, 2 %, 4 % y 6 %. Luego del proceso de pasteurización, se adicionó el inóculo del probiótico, elaborado en el laboratorio para controlar sus condiciones microbiológicas y, posteriormente, se almacenó en refrigeración. Se ocuparon, además, tubos de ensayo estériles, matraces Erlenmeyer, cajas Petri de vidrio, botellas de vidrio con tapa twist presentación de 250 mL estériles, micropipetas Fisherbrand. Los equipos utilizados fueron refrigerador; autoclave marca PBI, tipo Stematic III; espectrofotómetro Fisher Scientific, modelo Spectrum SP 2100UVP; y un potenciómetro Mettler Toledo, modelo S220-K-US.

El crecimiento de *Lactobacillus casei* se evaluó en dos medios correspondientes a un caldo nutritivo y el néctar de mora con inulina. Ambos medios tuvieron una limitada cantidad de nutriente disponible para el crecimiento del probiótico, que utiliza glucosa como fuente de carbono. Las condiciones de pH cambiaron en el transcurso del experimento, durante su almacenamiento en refrigeración. El caldo de enriquecimiento se utilizó como control para comparar su comportamiento con el de la bebida con probiótico, misma que contenía distintas concentraciones de inulina. Adicionalmente, se evaluaron

exclusivamente en la bebida con probiótico los parámetros de pH, concentración de glucosa y el análisis sensorial.

El cálculo del número de microorganismos se realizó según la Norma ISO 7889:2003 para el recuento de colonias de bacterias ácido-lácticas, a 37 °C, en agar MRS, durante 48 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) de alimento. Los medios de agua de peptona, Man Rogosa Sharpe (MRS) agar y caldo enriquecido con dextrosa fueron preparados y esterilizados en la autoclave, a 121 °C, durante 15 minutos, y luego almacenados en refrigeración (Hidalgo, 2021).

Para la determinación de pH, se tomaron 30 mL de néctar en un vaso de precipitación, previo ajuste de la muestra a temperatura ambiente; el electrodo se enjuagó y secó antes de realizar cada medición; se realizaron mediciones cada 7 días, durante 4 semanas. Se analizó la dependencia del pH del medio en el desarrollo y la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*.

El contenido de glucosa fue determinado mediante el método fenol-ácido sulfúrico. Para ello, se elaboró una curva de calibración en función de las concentraciones de glucosa p.a. (0, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/L), utilizando una disolución patrón de glucosa p.a. de 100 mg/L. Las muestras fueron filtradas previamente con etanol al 80 % para eliminar interferencias; una porción cuantificada se aforó a 100 mL,

se tomaron alícuotas de la muestra en tubos de ensayo y se añadieron 0,05 mL de fenol al 5 % y 5 mL de H₂SO₄, 1 mol/L a cada tubo que contenía la disolución patrón y las muestras, agitando para mezclar. Tras 10 minutos de reposo, las disoluciones se colocaron en celdas de cuarzo, en el espectrofotómetro, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

La concentración de glucosa en las muestras de bebida con probiótico se calculó a partir de la ecuación obtenida de la curva patrón. El análisis fue realizado cada 7 días para evaluar si hubo o no variación en el contenido de glucosa, en función del tiempo de almacenamiento, del crecimiento y consumo de azúcares por parte del *Lactobacillus casei*.

El análisis estadístico de la cinética de crecimiento del probiótico en el medio enriquecido y en la bebida con probiótico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores ($\alpha = 0,05$). Para el parámetro fisicoquímico pH y las diferencias en la concentración de glucosa en la bebida con probiótico, se aplicó un diseño de bloques al azar y se utilizó la prueba de Dunnett para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y el control.

El análisis sensorial se llevó a cabo con una prueba de comparaciones múltiples para determinar diferencias significativas en la acidez de los néctares de mora (Tapia, 2020). Para evaluar la variación de acidez de la bebida con probiótico, se utilizó una escala numérica con valores de 9 a 1: entre 9 a 6 correspondiente a *Extremadamente más ácida*, *Mucho*

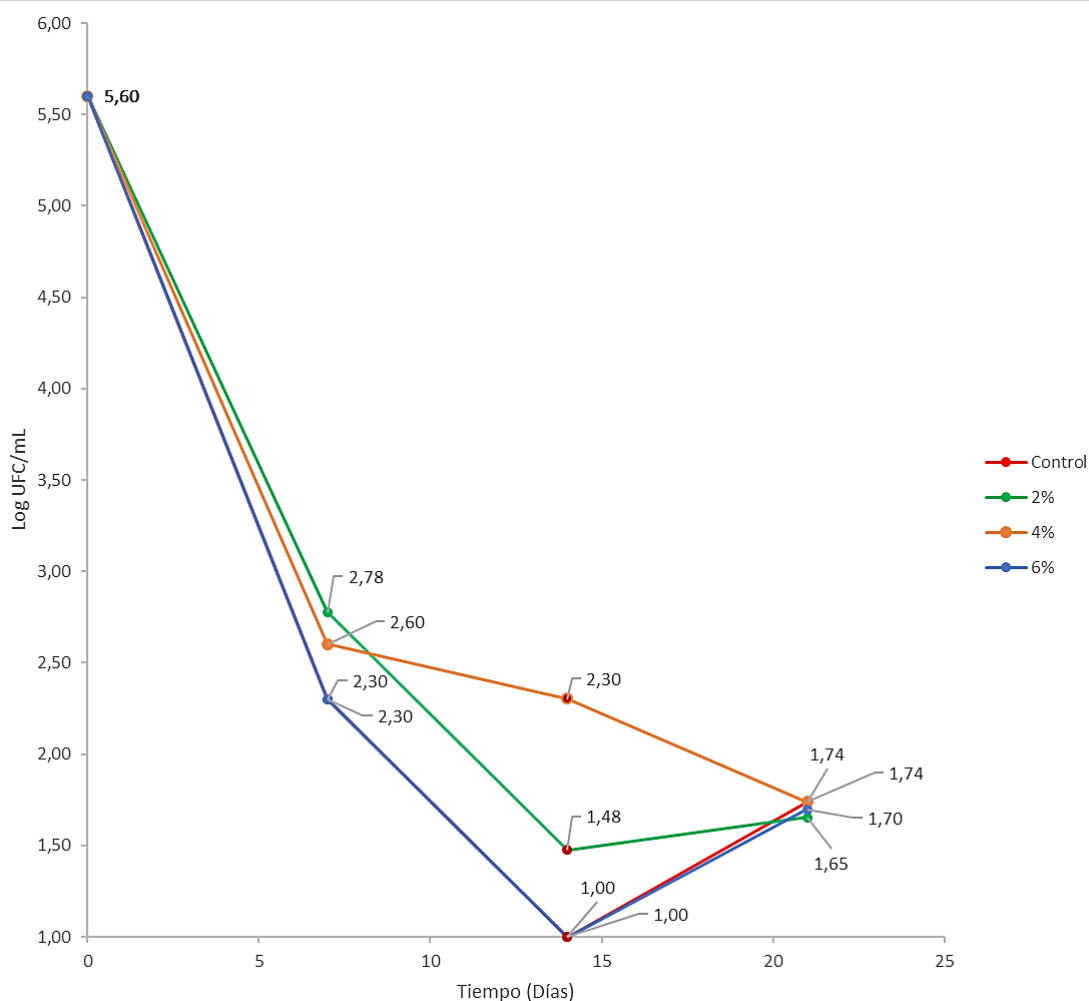
más ácida, *Moderadamente más ácida*, *Ligeramente más ácida* que R. 5, *Igual a R*, mientras que de 4 a 1 corresponde a *Ligeramente menos ácida*, *Moderadamente menos ácida*, *Mucho menos ácida* y *Extremadamente menos ácida* que R. Se compararon un control sin inulina y néctares con concentraciones de inulina del 2, 4 y 6% utilizando vasos desechables blancos rotulados con códigos numéricos para cada concentración; para la muestra de referencia se rotuló con la letra R. Las mediciones se tomaron cada 7 días durante 4 semanas. La prueba de Tukey fue aplicada para identificar diferencias entre las diferentes formulaciones.

RESULTADOS

En el caldo de enriquecimiento, el crecimiento se desarrolló a un pH entre 7 y 5, durante 28 días. El mismo procedimiento se aplicó a la bebida con probiótico, evaluando concentraciones de inulina al 2 %, 4 % y 6 % y un control sin inulina. El pH ácido afectó negativamente el crecimiento del probiótico, mismo que comenzó en unidades logarítmicas de 5,60 UFC/mL y finalizó en unidades logarítmicas de 1,74 UFC/mL. Aunque ambos medios tuvieron una composición nutricional similar, el caldo de enriquecimiento favoreció un mejor crecimiento debido a su menor acidez. Como lo indican James et al. (2017) en su estudio, la cepa de *Lactobacillus casei* crece de mejor manera a un pH óptimo entre valores de 6,5 - 7. El ANOVA con significancia $p < 0,05$ indicó que, en condiciones menos ácidas, el crecimiento del probiótico fue más estable, y se comprobó que el medio de inoculación influyó en el crecimiento de *Lactobacillus casei*.

Figura 1

Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* en la bebida con probiótico a distintas concentraciones de inulina con un control, durante 21 días de almacenamiento



Para evaluar el efecto de la inulina a distintas concentraciones en la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*, se graficó el crecimiento en valores logarítmicos desde el tiempo 0 hasta 21 días.

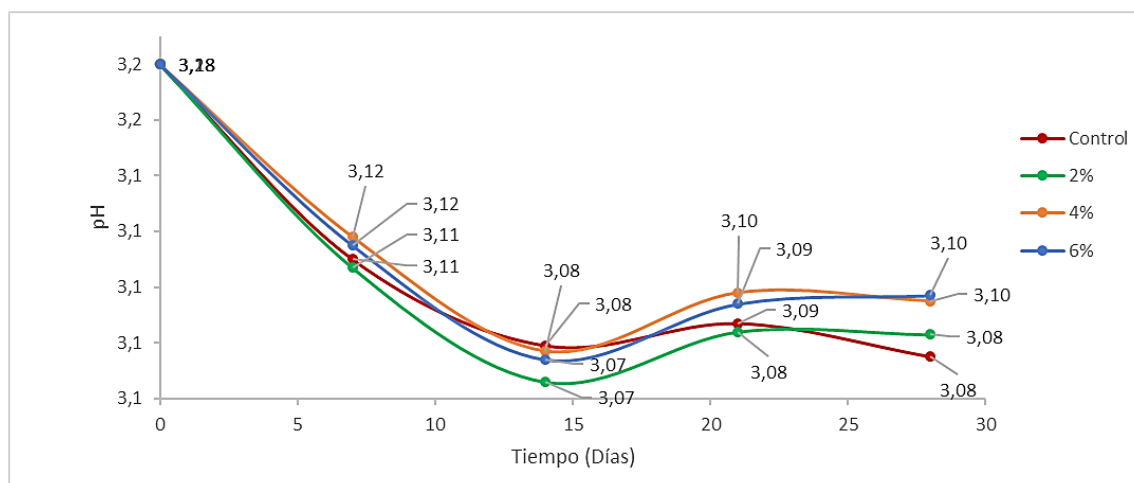
Los resultados presentados en la Figura 1 indican que la concentración de inulina al 4 % causó un menor decrecimiento de *Lactobacillus casei* a los 14 días en comparación con el control. La inulina

sirvió como fuente de nutrientes para el probiótico, favoreciendo una cinética de crecimiento más estable en un medio ácido, lo cual fue corroborado por una diferencia significativa $p < 0,05$. Aunque los microorganismos dejaron de crecer después de este periodo, el ácido láctico producido posiblemente ayudó a prolongar la vida útil del producto.

Los datos obtenidos de la variación de pH se representan gráficamente en la Figura 2.

Figura 2

Variación de pH en la bebida con probiótico a diferentes concentraciones de inulina (2, 4 y 6 %) y control, durante 28 días de almacenamiento



Desde el día 1 al 14 se observa una reducción en el pH de la bebida, debido a la producción de ácidos a partir de los azúcares, por parte del microorganismo probiótico (Monteiro et al., 2021). A partir del día 14, se observa un aumento en el pH, lo que estaría asociado con la disminución del crecimiento de *Lactobacillus casei*, puesto que se comprobó que el pH influye sobre el crecimiento del probiótico y, además, que la variación del pH se debe a la producción de ácido en las diferentes concentraciones

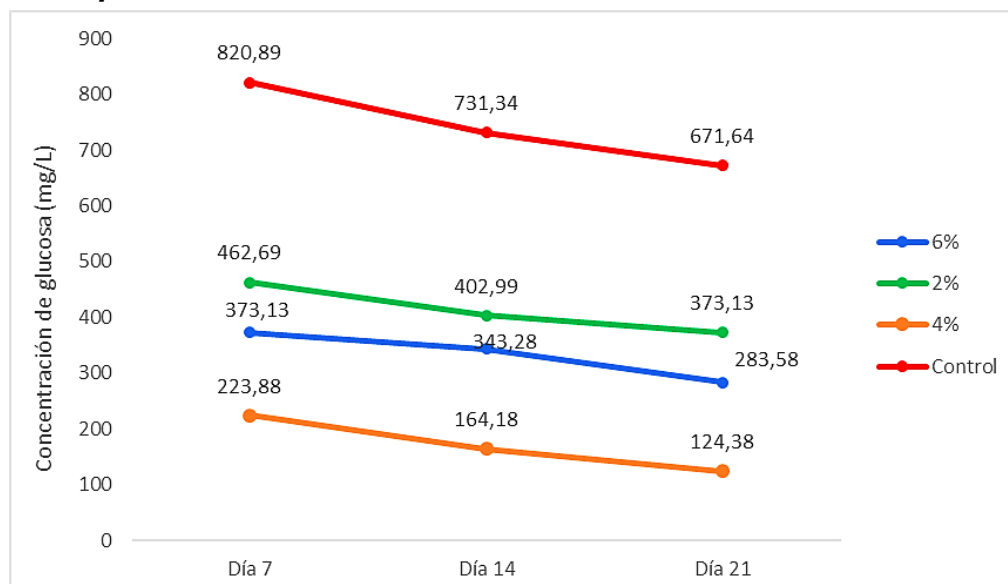
de inulina por el consumo de azúcares en la bebida con probiótico.

Los resultados de la determinación de la concentración de glucosa en la bebida con probiótico se presentan en la Figura 3.

A partir de la ecuación obtenida de la curva de calibración ($y = 0,0067x + 0,0255$), que tuvo un $R^2 = 0,0992$, se calculó la concentración de glucosa en mg/L en el néctar de mora.

Figura 3

Concentración de glucosa en la bebida con probiótico a distintas concentraciones de inulina después de 21 días de almacenamiento en condiciones de refrigeración



La concentración inicial de glucosa, presente en el néctar de mora pasteurizado, proveniente directamente de la mora utilizada para la elaboración de la bebida con probiótico y antes de la inoculación del microorganismo, fue de 860 mg/L. En la Figura 3, las líneas de colores representan cada uno de los tratamientos de la bebida con probiótico, diferenciados por la concentración de inulina añadida como prebiótico.

A los 21 días de estudio bajo condiciones de refrigeración, se observa una disminución en el contenido de glucosa en todos los tratamientos. El análisis estadístico reveló diferencias significativas en el contenido de

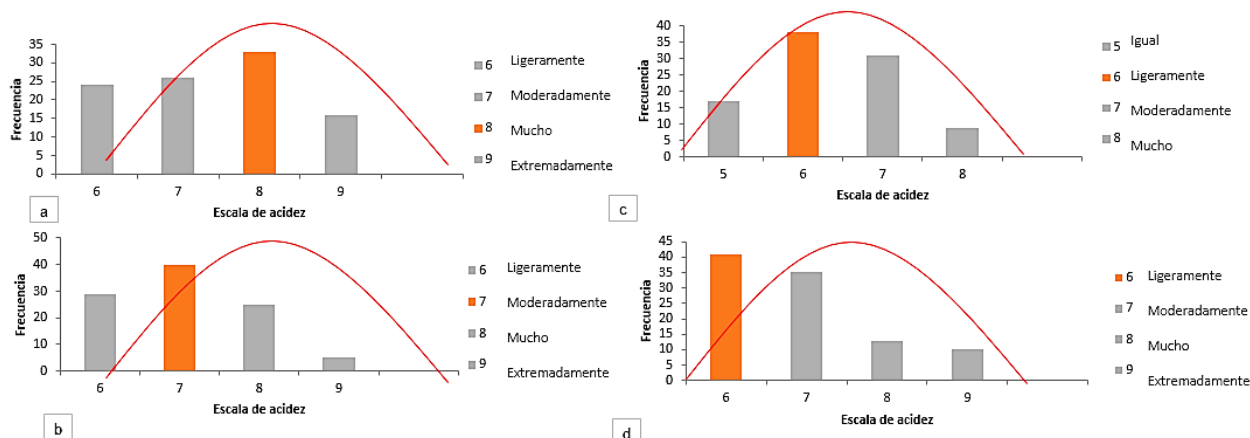
glucosa entre los diferentes tratamientos con distintas concentraciones de inulina.

En particular, en la formulación con 4 % de inulina, después de 21 días de crecimiento de *Lactobacillus casei*, se registró el mayor consumo de glucosa, reflejado en el valor más bajo de este azúcar, con 124,38 mg/L.

La prueba de comparaciones múltiples en el análisis sensorial se realizó con 25 jueces en un espacio adecuado del laboratorio, los resultados se representaron gráficamente para el control sin inulina y los néctares con concentraciones de inulina del 2 %, 4 % y 6 %, como se muestra en las Figuras 4a, 4b, 4c y 4d, respectivamente.

Figura 4

Gráfica de distribución normal con frecuencias de la escala de acidez del control (a), tratamiento al 2 % (b), 4 % (c) y 6 % (d) de inulina de la bebida con probiótico



Frente al néctar de mora sin probiótico ni prebiótico, la bebida control fue mucho más ácida (Figura 4a); la bebida con 2 % de inulina fue significativamente más ácida (Figura 4b); la bebida con 4 % de inulina fue percibida como ligeramente más ácida, pero con un sabor más agradable y un aroma más dulce (Figura 4c), mientras que la bebida con 6 % de inulina (Figura 4d) presentó una acidez ligeramente superior

DISCUSIÓN

En el caldo enriquecido, *Lactobacillus casei* tuvo un mayor crecimiento. En contraste, la bebida con probiótico a pH ácido mostró una reducción significativa en el crecimiento del probiótico. Aunque ambos medios tuvieron composiciones nutricionales similares, el caldo de enriquecimiento con menor acidez favoreció un mejor crecimiento, confirmando que el probiótico prospera mejor en condiciones menos

ácidas (James et al., 2017).

La adición de inulina al 4 % en la bebida con probiótico proporcionó un menor decrecimiento del probiótico después de 14 días (Figura 1); esto sería explicado por la capacidad de la inulina de actuar como una fuente de nutrientes, permitiendo una cinética de crecimiento favorable en un entorno ácido. Aunque el probiótico se vuelve inviable después de este período, el ácido láctico producido ayuda a prolongar la vida útil del producto (Fajardo et al., 2011). A partir de los 14 días, el aumento del pH en la bebida con probiótico se asocia con la disminución de la población de *Lactobacillus casei* (Figura 2). A pesar de la producción continua de ácido láctico, el pH aumentó debido a la inviabilidad del probiótico y a la presencia de inulina residual y azúcar, que afectan la membrana celular del probiótico (Monteiro et al., 2021). El análisis de concentración de glucosa indica un notable consumo por parte del probiótico a concentración del 4 % de inulina (Figura 3). La glucosa se utiliza como fuente de carbono y se convierte en ácido láctico durante el proceso metabólico del probiótico (Wang et al., 2021).

Finalmente, la evaluación sensorial muestra que la bebida con 4 % de inulina fue ligeramente más ácida, pero presentó un sabor agradable (Figura 4c). Esto mejora las características sensoriales del producto, destacando la importancia de la inulina en la formulación de bebidas funcionales, ya que aporta dulzor.

CONCLUSIÓN

El efecto de la inulina en el crecimiento de *Lactobacillus casei* resulta favorable

para mantener una población estable de probióticos cuando se adiciona a un néctar de mora en una concentración del 4 %, bajo condiciones ácidas y almacenamiento en refrigeración, durante un periodo de 14 días. Durante este tiempo, los probióticos se mantuvieron viables. Sin embargo, después de 14 días, se observó una disminución en el metabolismo de los probióticos, evidenciada por el menor consumo de glucosa de la fruta usada en el néctar de mora y, como consecuencia, un ligero aumento en el pH.

En el análisis sensorial, el tratamiento con un 4 % de inulina fue percibido como ligeramente más ácido por los jueces, lo que sugiere que la bebida es aceptable en términos de acidez y que el producto de la fermentación no afecta negativamente las características sensoriales del néctar de mora.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Universidad Central del Ecuador por el apoyo y los recursos brindados para la realización de esta investigación.

LISTA DE REFERENCIAS

- Dahal, S., Ojha, P., & Karki, T. B. (2020). Functional quality evaluation and shelf life study of synbiotic yacon juice. *Food Science & Nutrition*, 8(4), 1546-1553. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/fsn3.1440>
- Fajardo-Argoti, I., Jurado-Gámez, H., & Alzate-Amariles, V. (2021). *Elaboración de néctar de mango con adición de probiótico Lactobacillus gasseri e inulina como alimento funcional*,

sin aditivos químicos y como una alternativa a la industria de alimentos. Conocimiento Global, S2, 1-23. <https://conocimientoglobal.org/revista/index.php/cglobal/article/view/176>

Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M., Prescott, S., Reimer, R., Salminen, S., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K., Cani, P., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.75>

Guarner, F., Snaders, M., Szajewska, H., Cohen, H., Eliakim, R., Herrera, C., Karakam, T., Merenstein, D., Piscoya, A., Ramakrishna, B., & Salminen, S. (2023). Probióticos y prebióticos. Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2023.pdf>

Hidalgo, A. (2021). *Guía de Laboratorio de Microbiología Industrial* (pp. 51-55). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador.

International Organization for Standardization. (2003). ISO 7889:2003. *Yogurt-Enumeración de los Microorganismos Característicos-*

Técnica del Conteo de Colonias a 37°C. <https://cdn.standards.iteh.ai/s/31880/393d5cba46a845b9896d8392239f0801/ISO-7889-2003.pdf>

James, M., Velastegui, E., & Cruz, M. (2017). *Evaluación de las condiciones de cultivo de Lactobacillus acidophilus y Lactobacillus casei a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono.* *Bionatura*, 1, 235-239. <https://www.revistabionatura.com/files/2017.02.01.4.pdf>

Monteiro, P. M., Santos, L. P., Coelho, L. F., Ávila Neto, P. M., Sass, D. C., & Contiero, J. (2021). *Production of L (+) Lactic Acid by Lactobacillus casei Kell: Fed Batch Fermentation Strategies.* *Fermentation*, 7(3), 151. <https://www.mdpi.com/2311-5637/7/3/151>

Tapia, I. (2020). *Guía de Laboratorio de Análisis Sensorial.* Comparaciones múltiples (pp. 1-4). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador.

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). *Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry.* *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2021.612285/full>