

## Evaluación de la fermentación de bebida de soya con un cultivo láctico

### Evaluation of soymilk fermentation with a lactic culture

Martha Cecilia Quicazán\*, Angélica Sandoval\*\*, Germán Padilla\*\*

#### RESUMEN

La leche o bebida de soya, extracto acuoso de las proteínas de este grano, elaborada mediante un proceso previamente validado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), fue fermentada con un cultivo láctico termófilo, constituido por *L. delbrueckii ss. bulgaricus*, *L. delbrueckii ss. lactis* y *S. salivarius ss. thermophilus*. La composición de la bebida fue estandarizada, antes de la fermentación, en cuanto al contenido de sólidos y de proteína, utilizando como variable de proceso los grados Brix. La fermentación de las bebidas se llevó a cabo aplicando básicamente las mismas operaciones utilizadas en la de leche de vaca. Para la evaluación de la acidificación, además de hacer el seguimiento del pH y de la acidez titulable, la producción de ácidos orgánicos fue determinada mediante la HPLC, utilizando una columna de exclusión iónica. La modificación de las propiedades Teológicas fue estudiada y se efectuaron comparaciones con la fermentación de leche de vaca. Se comprobó que, a pesar de la ausencia de lactosa como sustrato, la acidificación en este proceso es debida a la producción de ácido láctico, y que el contenido de sólidos de la bebida utilizada influye en la producción del mismo, así como en la viscosidad alcanzada en el producto.

Palabras clave: fermentación láctica, yogurt de soya, HPLC, ácidos orgánicos.

#### ABSTRACT

Soymilk, the protein slurry extracted in water from soybeans, obtained by means of a process tested previously at ICTA (the National University of Colombia's Institute of Food Science and Technology), was fermented by using a thermophilic lactic culture consisting of *L. delbrueckii ss. bulgaricus*, *L. delbrueckii ss. lactis* and *S. salivarius ss. thermophilus*. The soymilk composition was standardised (before fermentation), regarding solids and protein content, by means of Brix<sup>0</sup> as process variable. Soymilk was fermented by applying those same basic operations followed in cow milk fermentation. Acidification was assessed by evaluating pH, titrable acidity and organic acid production during the process by HPLC in an ionic exclusion column. Reology property modification was studied and compared with that for cow milk. It was proved that, despite the absence of lactose as substrate, soymilk acidification during this process can be explained by lactic acid production and that soymilk solid content influences acid production and changes in viscosity.

Key words: lactic fermentation, soymilk yogurt, HPLC, organic acids.

#### INTRODUCCIÓN

Las propiedades nutricionales de la bebida o leche de soya han sido frecuentemente

equiparadas con las de la leche de vaca, y en algunos aspectos, tales como su bajo costo, la ausencia de colesterol, el bajo contenido de grasa saturada y la ausencia de lactosa le confieren grandes ventajas. su

---

\* Ingeniera química y profesora asociada. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Tel. 571-3165000 E19210. E mail: mquicaza@bacata.usc.unal.edu.co

\*\*Ingenieros químicos. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

consumo obedece a la tradición en culturas orientales (Wolf, 1975). A pesar de esto, algunas características sensoriales de la leche de soya, especialmente el sabor a frijol y su contenido de oligosacáridos flatulentos, han limitado su consumo y no han permitido que en las culturas occidentales se haya popularizado como alternativa nutricional (Goldbitz, 1995).

La aplicación de la biotecnología en la industria de alimentos ofrece actualmente alternativas importantes para el desarrollo de nuevos productos; bajo procesos controlados se obtienen alimentos de alto valor nutricional, con cualidades sensoriales agradables, consecuencia del metabolismo característico del microorganismo empleado (Oberman, 1985; Mottar *et al.*, 1989). Avances en el estudio de la fermentación ácido-láctica permiten disponer actualmente en el mercado de cultivos iniciadores purificados, con presentaciones que facilitan su uso en la industria láctea; tal es el caso de los cultivos termófilos, cuya principal aplicación es la producción de yogurt a partir de leche de vaca (Robinson, 1975; Kroger *et al.*, 1989). Utilizando la lactosa, estos microorganismos, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*, producen fundamentalmente ácido láctico y ocasionan cambios favorables en las características de la leche de vaca. El nivel de ácido láctico es extremadamente importante para producir aceptabilidad del yogurt, en cuanto al sabor, cuerpo, textura y para reducir la sinéresis durante el almacenamiento (Whitaker, 1976). Desde el punto de vista nutricional y de salud, las leches fermentadas aportan compuestos adicionales a los del producto fresco, como son las vitaminas del complejo B, y aumentan el valor biológico de las proteínas en productos como el yogurt. También la grasa resulta más digerible en estos productos que en la leche, por acción de las enzimas microbianas (Kroger *et al.*, 1989; Robinson y Lamine, 1991).

Se han efectuado investigaciones para evaluar procesos fermentativos que se presentan en diferentes productos de soya, y específicamente en la bebida, respecto a los que ocurren en la leche de vaca (Fukushima, 1978; Lee y Morr, 1990). Debido a la importancia que tiene el nivel de sólidos totales de la leche de vaca en la consistencia y el aroma del yogurt elaborado, algunos investigadores han evaluado el efecto del incremento en los sólidos totales de la bebida de soya en el desarrollo de la acidez titulable y en

tiempo de coagulación (Buono, 1990). Se han efectuado pruebas enriqueciendo la bebida de soya antes de la fermentación, mediante la adición de fructuosa, leche en polvo y sólidos de soya no grasos hasta alcanzar un valor de sólidos totales igual a 14%, en peso (Chang, 1990). Igualmente, se han trabajado diferentes niveles de sólidos totales disminuyendo la relación soya: agua en la etapa de extracción en la preparación de la bebida (Ankenman, 1996). También se ha comparado el efecto de la adición de proteína de suero concentrada y sólidos no grasos en la elaboración de yogurt a base de bebida de soya y de leche de vaca (Lee y Morr, 1990). Los productos fermentados han sido sometidos a análisis químicos detallados y a la caracterización física y sensorial. Simultáneamente, para la disminución del sabor característico a frijol, se han llevado a cabo tratamientos con carbón activado, con el fin de retirar compuestos fenólicos. Se ha reportado que aplicando un tratamiento térmico durante 30 minutos a 82°C y un tiempo de incubación de 16 horas a 37°C, la adición de los distintos sólidos puede ocasionar un aumento en la acidez respecto a la bebida de soya sin aditivos. Para mejorar la aceptabilidad del yogurt elaborado a partir de soya se ha intentado la adición de caseína, caseína hidrolizada y proteína de suero hidrolizada (Ankenman, 1996). Otros estudios se han centrado en la producción de un yogurt fortificado con calcio hasta lograr una concentración similar a la de leche de vaca (120-180 mg/100 g); sin embargo se han encontrado dificultades debido a que la proteína de soya es sensible a dicha concentración (Yacizi, 1997).

En el presente trabajo, mediante la aplicación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se exploró la producción de ácidos orgánicos al utilizar un cultivo láctico termófilo en un medio exento de lactosa, como es la leche de soya. Se realizaron comparaciones con el mismo proceso aplicado a la leche de vaca y se evaluó la influencia del contenido de sólidos de la bebida de soya en la fermentación. Durante la incubación se hizo un seguimiento del cambio en las propiedades de la bebida de soya y se efectuaron comparaciones con lo que sucede en condiciones semejantes con la leche de vaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de la bebida de soya

Con base en los estudios previos realizados en el ICTA, se preparó la bebida de soya (Becerra y Leguía, 2000). En el proceso se siguieron las etapas de remojo, desintegración del grano, cocción, filtración y empaque. El método de elaboración asegura la adecuada degradación del inhibidor de tripsina y minimiza la acción de la lipoxigenasa, causante del sabor afrijolado.

### Estandarización de la bebida de soya

El contenido de sólidos totales y de proteína de la bebida se estandarizó con base en el ajuste de los grados Brix de la mezcla preparada a partir de una bebida diluida (preparada con una relación en peso soya seca: agua igual a 1:9) y una concentrada (preparada con una relación en peso soya seca: agua 1:4.5), de acuerdo con la figura 1 y la ecuación 1.

Considerando el balance de sólidos se tiene:

$$S = (A \cdot M_D + B \cdot M_C) / (M_D + M_C) \quad (1)$$

Donde:

A = Sólidos solubles en la bebida diluida

B = Sólidos solubles en la bebida concentrada

S = Sólidos solubles en la bebida estandarizada (por fermentar)

M<sub>D</sub> = Masa de bebida diluida

M<sub>C</sub> = Masa de bebida concentrada



Figura 1. Proceso de estandarización de las bebidas de soya.

Los valores de S se ajustaron en 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 para los diferentes ensayos de fermentación.

### Proceso de fermentación

En la figura 2 se muestran los pasos seguidos para la fermentación de la bebida de soya estandarizada. Se empleó un cultivo láctico termófilo comercial liofilizado marca Rhodia, de inoculación directa, en una proporción de 25 unidades por 100 litros, constituido por *Lactobacillus delbrueckii* ss. *Bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* ss. *Lactis* y *Streptococcus salivarius* ss. *Thermophilus*.

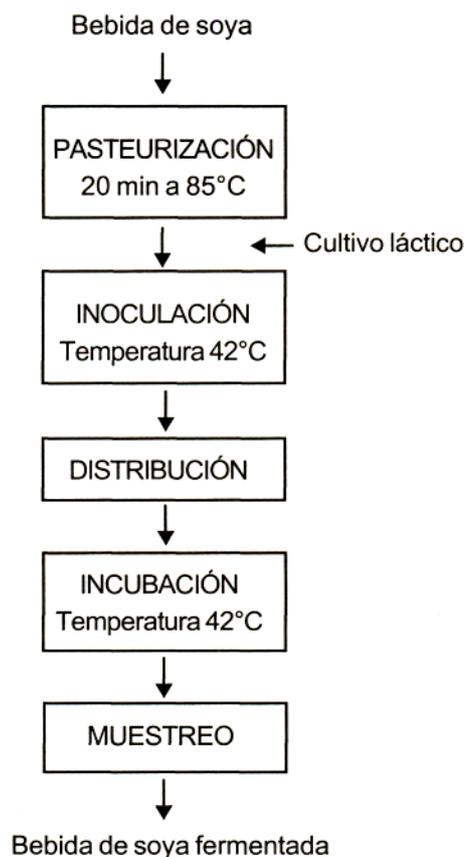


Figura 2. Proceso de fermentación de la bebida de soya

### Valoración de las propiedades físico-químicas

Se determinó la composición de las bebidas iniciales y se efectuó seguimiento de las propiedades físicas y químicas relacionadas con la acidificación de acuerdo con la metodología que se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas y método de valoración.

Característica (unidades)	Método	Equipo
pH	Valoración potenciométrica	pH-metro Orion modelo 420
Acidez titulable (meq/100g)	Titulación con solución NaOH 0.1	pH-metro Orion modelo 420
Viscosidad (cP)	Viscosimetría rotacional	Viscosímetro Haake, rotovisco RV 20, con el sistema NV a 300 revoluciones por minuto.
Sólidos solubles (% p/p)	Refractometría	Refractómetro Euromex microscopes-holland, RF 0.232 HC TYPE (0-32%).
Contenido de proteína (% p/p)	Método Kjeldahl	Digestor Foss Tecator 2006 unidad de destilación Kjeltac 1002.
Contenido de grasa (% p/p)	Método Gerber	Butírometro Gerber
Densidad (g/ml)	Picnometría	Picnómetro calibrado, Baño con control de temperatura.

### Determinación de ácidos orgánicos mediante HPLC

En la figura 3 se presenta el procedimiento seguido para la preparación de la muestra por analizar mediante HPLC, el cual fue adaptado con base en las recomendaciones propuestas para la leche de vaca (Marsili *et al.*, 1981; Quattrocchi, 1992).

Se utilizó un sistema de HPLC constituido por una bomba Jasco PU-980, un dispositivo de inyección de 20  $\mu$ l, una columna de exclusión iónica 300 x 7.8 mm Aminex HPX - 87 h, un detector UV - 9757 de múltiple longitud de onda y un paquete de manejo de datos (Browin). La determinación se llevó a cabo a 20°C empleando ácido sulfúrico 4 mM como fase móvil a un flujo de 0.6 ml/min, presión 77 kg/cm<sup>2</sup>. Se utilizaron patrones de ácido láctico, pirúvico, acético, málico, succínico y oxálico para la cuantificación construyendo las curvas patrón, haciendo la calibración a 210 nm.

### Análisis estadístico

Para cada uno de los ensayos se efectuaron seis repeticiones. La evaluación planteó el estudio de una variable (°Brix) sobre las características físico-químicas del producto: pH, concentración de ácido y viscosidad. Se aplicó un modelo estadístico de bloques completamente al azar.

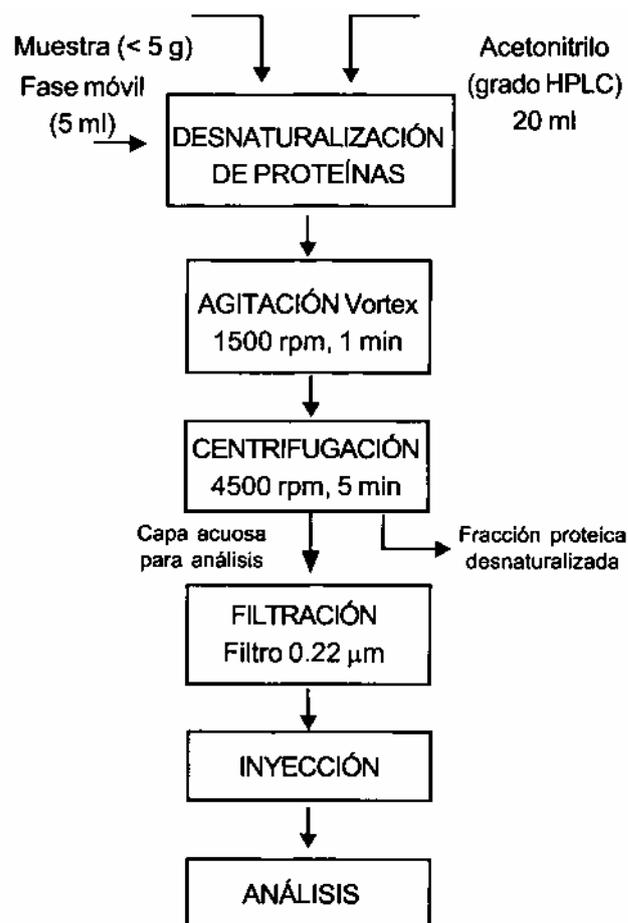


Figura 3. Preparación de la muestra para la determinación de la concentración de ácidos orgánicos mediante HPLC

El análisis de la varianza se realizó por medio de la prueba estadística F con un valor a 5%. En este análisis cada bloque corresponde a una de las bebidas fermentadas, y el valor de sólidos solubles es un tratamiento.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Características de las bebidas de soya estudiadas**

En la tabla 2 se presentan los valores promedio de las características evaluadas para cada una de las bebidas empleadas. Es importante notar la relación directa que existe entre los sólidos totales, los sólidos solubles (°Brix) y el nivel de proteína; a mayor concentración de ésta y de sólidos totales existe un valor más alto de °Brix, propiedad que se puede utilizar como variable de proceso en la elaboración y estandarización de la bebida de soya.

**Acidificación durante la fermentación**

Mediante la aplicación de HPLC se comprobó que la acidez de la bebida de soya antes de fermentar se debe a la presencia de ácido cítrico, y que la desarrollada durante la fermentación se ocasiona por la producción del ácido láctico. En ninguno de los ensayos efectuados se detectó la aparición de alguno de los otros ácidos orgánicos estudiados.

En la figura 4 se aprecia la diferencia entre la fermentación de la leche de vaca y la bebida de soya. La producción de ácido láctico ocurre a menor velocidad en la bebida de soya que en la leche de vaca y, por tanto, los valores de concentración

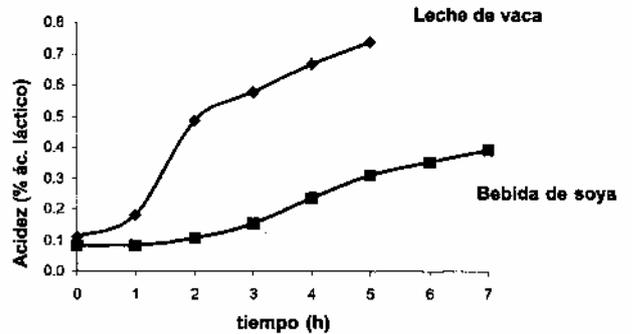


Figura 4. Acidificación de leche de vaca y bebida de soya fermentadas bajo las mismas condiciones.

alcanzados son mayores en esta última para tiempos iguales, lo cual concuerda con la naturaleza de las bacterias empleadas en esta fermentación.

Como se observa en la figura 5, la disminución de pH en la leche de vaca es más rápida que en la bebida de soya; sin embargo, al cabo de cinco horas de fermentación, los valores alcanzados en esta propiedad son similares.

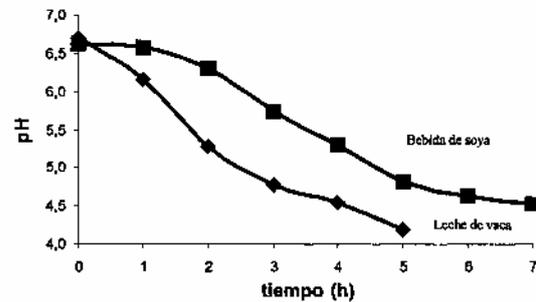


Figura 5. Comportamiento del pH durante la fermentación de la bebida de soya y la leche de vaca.

Tabla 2. Características de las bebidas de soya estudiadas.

Bebidas Sólidos solubles(°Brix)	Características				
	% Humedad	% Sólidos totales	% Proteína	% Grasa	Densidad (g/cm³)
8.0	91.21	8.79	2.84	1.65	1.0219
7.5	91.90	8.10	2.78	1.7	1.0204
7.0	92.18	7.81	2.74	1.7	1.0180
6.5	92.90	7.10	2.63	1.7	1.0166
6.0	93.20	6.80	2.46	1.8	1.0156
5.5	93.72	6.28	2.20	1.8	1.0139
5.0	94.21	5.79	1.86	1.9	1.0117

**Tabla 3. Variación del pH durante la fermentación de bebidas con diferente contenido de sólidos.**

Grados Brix							
t(h)	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0
1	6.59	6.52	6.59	6.54	6.54	6.53	6.59
2	6.25	6.3	6.39	6.37	6.37	6.32	6.29
3	5.77	5.8	5.79	5.81	5.81	5.81	5.72
4	5.34	5.41	5.43	5.38	5.38	5.39	5.32
5	4.92	4.89	4.98	4.88	4.88	4.89	4.83
6	4.69	4.69	4.73	4.69	4.69	4.70	4.69
7	4.56	4.53	4.56	4.56	4.57	4.56	4.53

En la tabla 3 se presentan los valores promedio obtenidos para el pH registrado durante la fermentación de bebidas de soya con diferente contenido de sólidos. Se aprecia la similitud en el comportamiento de esta propiedad durante el tiempo. La evaluación estadística demostró que no existe diferencia significativa en esta propiedad para un mismo tiempo de fermentación y, por tanto, en los valores alcanzados al final del proceso.

En las figuras 6 y 7 se presentan los resultados promedio obtenidos para la concentración de ácido láctico evaluado mediante HPLC para las bebidas de soya durante la fermentación. El análisis estadístico permitió demostrar que el contenido de sólidos de la bebida tiene efecto sobre la concentración de ácido láctico que se alcanza en el proceso. Las bebidas más diluidas ( $^{\circ}\text{Brix} < 6.5$ ) alcanzan valores de acidez menores al 0,38%, y no se logra la formación de un coágulo firme; esto influye en la baja viscosidad y la

alta sinéresis del producto. Las bebidas intermedias ( $^{\circ}\text{Brix}$ : 6.5 y 7.0) alcanzan valores de acidez entre 0,39% y 0,42%; el coágulo formado es firme, y se obtiene una bebida de apariencia y consistencia similar al yogurt de leche de vaca, probablemente debido a la interacción entre la proteína y la acidez; las bebidas de 7.5 y 8.0  $^{\circ}\text{Brix}$  alcanzan los máximos niveles de acidificación (entre 0,42%-0,47%), pero presentan propiedades organolépticas deficientes como el sabor a frijón, grumos y una elevada viscosidad.

En todos los casos se presentan dos etapas bien definidas y similares a las curvas de crecimiento características de los microorganismos: la etapa de latencia o adaptación al medio y la fase de crecimiento exponencial. La primera etapa registra una duración de dos horas, tiempo en el cual la acidez no registra un incremento apreciable (1-3%). La segunda etapa, con duración de cinco horas, presenta un incremento constante y apreciable en la acidez (360-450%), debido al consumo de los sustratos presentes, los cuales son transformados.

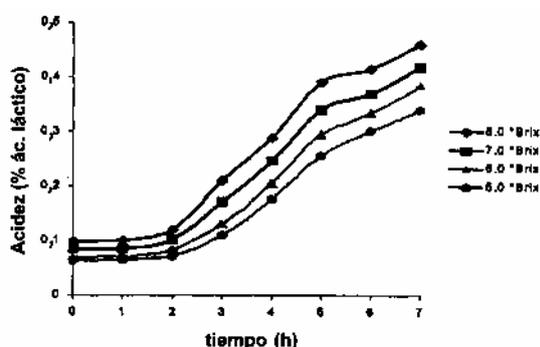


Figura 6. Comportamiento de la acidificación durante la fermentación de bebidas de soya con diferente contenido de sólidos

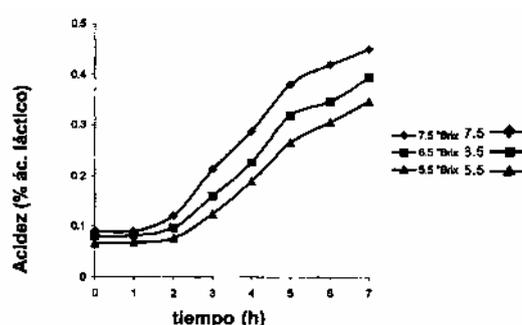


Figura 7. Comportamiento de la acidificación durante la fermentación de bebidas de soya con diferente contenido de sólidos.

**Tabla 4. Viscosidad de las bebidas antes y después de la fermentación.**

Bebida de soya Sólidos solubles(°Brix)	Viscosidad Inicial (cP)	Viscosidad final (cP)
5.0	5.1	130
5.5	5.2	169
6.0	6.0	195
6.5	6.2	220
7.0	7.1	235
7.5	7.8	268
8.0	8.0	305
Leche de vaca	6.2	167

La prueba estadística F permitió confirmar que para el pH no existen diferencias significativas en la valoración de las bebidas fermentadas (bloques), lo que se reafirma con el coeficiente de variación encontrado (0.03). La misma prueba revela las diferencias significativas existentes para la concentración de ácido láctico entre cada tratamiento.

### Cambios en la viscosidad

En la tabla 4 se presentan los valores de viscosidad encontrados para las diferentes bebidas antes y después de la fermentación. También aparecen los valores correspondientes a la leche de vaca. La bebida de soya fermentada posee un valor de viscosidad mayor que el yogurt de leche de vaca. Estadísticamente se comprobó que existe diferencia significativa en esta propiedad durante la fermentación de las bebidas con distinto contenido de sólidos. Para aquellas que se estandarizaron con 5.5 grados Brix, el valor final de la viscosidad es similar a la de la leche de vaca fermentada con el mismo cultivo, bajo las mismas condiciones. Las bebidas de soya con menor concentración de sólidos presentan baja viscosidad y excesiva sinéresis después de la fermentación. Las de mayor contenido de sólidos, por el contrario, adquieren alta viscosidad con la acidificación y mayor estabilidad.

### CONCLUSIONES

Este estudio permitió concluir que, aunque la bebida de soya no contiene lactosa, durante su fermentación mediante un cultivo láctico termófilo se lleva a cabo un proceso de acidificación en el cual se produce ácido láctico, ocasionando cambios en el pH semejantes, aunque más lentos, que los que se producen en la leche de vaca. La concentración de ácido láctico alcanzada depende del contenido de sólidos de la bebida de soya, y la acidificación ocasiona también incremento en la viscosidad. A diferencia de estudios realizados por otros autores -quienes reportan tiempos de fermentación del orden de 16 horas para detectar la acidificación-, en éste se lograron valores de pH cercanos a 4.5 en solamente siete horas de fermentación, debido posiblemente a los niveles de sólidos estandarizados en este trabajo y al procedimiento utilizado en la elaboración de la bebida. Además, es posible inferir que este proceso degrada los oligosacáridos presentes en la bebida, ya que en ningún caso se adicionaron carbohidratos mejoradores de la acidificación.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan agradecimientos al Instituto Ítalo-Latinoamericano, entidad de cooperación internacional del gobierno italiano por el apoyo brindado para la implementación de las metodologías de HPLC en el ICTA, a la División de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y a la empresa Rhodia.

### BIBLIOGRAFÍA

- Ankenman, L. 1996. Improved acid, flavor and volatile compounds production in a high protein and fiber soymilk yogurt-like product. *J. Food Science*. 61 (2), 331-336.
- Becerra, L. y Leguía, C. 2000. Validación del proceso para la producción de una bebida de soya y utilización de subproductos. Trabajo de grado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

- Buono, M. 1990. Soymilk yogurt: sensory evaluation and chemical measurement. *J. Food Science.* 55 (2), 320-324.
- Chang, Chun-yen. 1990. Effect of total soymilk solids on acid production by selected lactobacilli. *J. Food Science.* 55 (6) 125-129.
- Cheng, Y. y Thompson, L. 1990. Sogurt, a yogurt-like soybean product: development and properties. *J. Food Science.* 55 (4) 85-90.
- Fukushima, D. 1978. Fermented vegetable (soybean) protein and related foods of Japan and China.
- Goldbitz, P. 1995. Traditional soy foods: processing and products. USA: American Institute of Nutrition. 570.
- Instituto de Investigaciones Tecnológicas. 1980. Final report on the Colombian-Netherlands Project for "The Utilization of Soybean Proteins for Human Consumption". Bogotá. Colombia.
- Kroger, M. 1976. Quality of yogurt. *J. Dairy Science.* 54 (4), 344-350.
- Kroger, M., Roger, M., Kurman, J. y Rasic, J. 1989. Fermented Milks: past, present and future. *Food Technology.* 43(1), 92-99.
- Lee, S. y Morr, Y. 1990. Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt. *J. Food Science.* 55 (2), 532-534.
- Marsili, R., Ostapenko, H., Simmons, R. y Creen, D. 1981. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *J. Food Science.* 46, 52-57.
- Oberman, H. 1985. Fermented milks, Microbiology of fermented foods. London: Elsevier Appl. Sci. Pub. 167-195.
- Quattrocchi, O., Abelaira, S. y Laba, R. 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina: Artes gráficas Farro.
- Robinson, R. 1975. Yogurt: A Review of its Manufacture. *J. Soc. Dairy Technol.* 28, 149-163.
- Robinson, R. y Tamime, A. 1986. Recent developments in yogurt manufacture. *Modern Dairy Technology.* Vol.2. London. Elsevier. 1-34.
- Robinson, R. y Tamime, A. 1988. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological Aspects. *J. Dairy Res.* 55, 281-307.
- Robinson, R. y Tamime, A. 1991. Yogurt: Ciencia y tecnología. Zaragoza, España: Acribia.
- Whitaker, J. 1976. Biochemical changes occurring during the fermentation of high-protein foods. Symposium: Microbial alteration in high protein foods. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Institute of Food Technologists. USA.
- Wolf, W. 1975. Soybeans as a food source. USA: CRC Press.
- Yacizi, F. 1997. Fermentation and properties of calcium-fortified soymilk yogurt. *J. Food Science.* 62 (3), 123-130.