

DETERMINACIÓN DE COMBINACIONES ÓPTIMAS DE INULINA,
OLIGOFRUCTOSA Y MIEL PARA EL CRECIMIENTO DE BB-12 (*Bifidobacterium.*)
EN UNA GELATINA COMERCIAL

DETERMINATION OF OPTIMUM COMBINATION OF INULIN, OLIGOFRUCTOSE*
AND HONEY FOR GROWTH BB -12 (*Bifidobacterium.*) IN A COMMERCIAL
GELATIN

Karina Ulacio¹, Tonny Garcia², Zayby Pabón³.

¹Profesora del Departamento de Procesos Agroindustriales, Departamento de Ecología y Control de Calidad, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, estado Lara, Venezuela Email: karinaulacio@ucla.edu.ve

² Profesor del Programa de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, estado Lara, Venezuela. E-mail: tonnygarcia@ucla.edu.ve.

³ Enfermería, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, estado Lara, Venezuela.

*Tesis de Maestría

Recibido: 20/01/16 Aceptado: 31/03/16

RESUMEN

El estudio se fundamentó en determinar las combinaciones apropiadas de prebióticos constituidos por inulina, oligofructosa y miel que favorezcan el crecimiento del BB-12 (*Bifidobacterium.*) en una gelatina comercial, con la finalidad de obtener una concentración superior de 10^6 UFC del probiótico para que pueda considerarse como un alimento funcional. En primer lugar se procedió a la activación y estandarización del (BB-12), preparación de la gelatina e inoculación del microorganismo. Los datos se procesaron a través de un análisis estadístico para determinar las combinaciones óptimas de prebióticos en los cuales el BB-12 posee una concentración igual o superior a 10^6 UFC/g determinándose que en la muestras la cantidad de células viables del BB-12 supera el orden de 10^6 UFC en las diluciones 10^5 - 10^7 , obteniéndose un valor entre $1,45 \times 10^7$ a $4,9 \times 10^7$ UFC/ml, requisito indispensable para el logro de los objetivos

Palabras claves: oligofructosa, inulina, probiótico y simplex.

SUMMARY

The study was based on determining appropriate prebiotics comprise inulin, oligofructose and honey that favor the growth of BB-12 combinations (*Bifidobacterium.*) In a commercial gelatin, in order to obtain a higher concentration of 10^6 UFC of probiotic for It can be considered as a functional food. First we proceeded to the activation and standardization (BB-12), gelatin preparation and inoculation of microorganism. The data were processed through a statistical analysis to determine optimal combinations of prebiotic in which the BB-12 has a less than 10^6 UFC/g concentration in the samples determined that

the number of viable cells BB-12 exceeds the order of 10^6 UFC in dilutions 10^5 - 10^7 , obtaining a value between $1,45 \times 10^7$ to $4,9 \times 10^7$ UFC/ml, a prerequisite for achieving the objectives.

Keywords: Oligofructose , inulin, probiotic and simplex.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela se han desarrollado numerosos avances tecnológicos que permitieron generar nuevas innovaciones en materia de alimentos, dichos avances se encuentran orientados a introducir en el mercado alimentos que ofrezcan beneficios considerables a la salud de las personas que los consumen (Olagnero *et al.*, 2007). En este sentido, todo adelanto que contribuya a mejorar la nutrición humana toma un papel importante en la sociedad, debido a que estimula el consumo de alimentos sanos que aporten los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas y de esta manera reducir el riesgo de sufrir enfermedades, de este modo, surge el concepto de alimento funcional, que se define como aquel alimento que proporciona un efecto beneficioso a la salud superior a los tradicionales (Aracenta y Gil, 2009). Bajo esta premisa, el estudio se centró en determinar las combinaciones apropiadas de prebióticos constituidos por inulina, oligofructosa y miel que favorezcan el crecimiento del BB-12 (*Bifidobacterium.*) en una gelatina comercial, con la finalidad de obtener una concentración superior de 10^6 UFC del probiótico para que pueda considerarse como un alimento funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la investigación se empleó una cepa comercial de cultivo puro de BB-12, en estado liofilizado. Las unidades experimentales estuvieron conformadas por 24 muestras de gelatina de 20 g cada una, con una formulación de 93% gelatina, 5% prebióticos (inulina, oligofructosa y miel) y 2% probióticos. Las muestras se dividieron en 4 grupos, analizadas en un periodo de tiempo de 0, 5, 10 y 15 días respectivamente.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1.- Activación del microorganismo: se realizó incubando 1 g. del cultivo en 99 ml en caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) modificado para rehidratación, fue suplementado con

0,05 % (p/v) de L- Cisteína, como fuente esencial de nitrógeno para BB-12 y poder reducir el potencial de oxido – reducción del medio (condiciones anaeróbicas estrictas que se requiere para de esta manera obtener un total de 60 gr de biomasa de BB-12. Las muestras se almacenaron en una estufa a 37°C durante 24 horas, las cuales fueron temperadas y refrigeradas a 5 °C, para posterior centrifugación a 5000 RPM/15 minutos, el sedimento obtenido representó la biomasa de cultivo de BB-12 utilizada.

2.- Preparación de las unidades experimentales e incubación del BB-12: La distribución de los ingredientes para la elaboración de las muestras se realizó tomando en cuenta un diseño estadístico simplex rejilla las cuales se reflejan en la tabla 1. Se procedió a la reparación de la gelatina, luego se pesaron 10 g de biomasa y se dividieron en 24 muestras de 0,4 g. Se tomaron seis (6) vasos precipitado y se identificaron como M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ y M₆, dichas muestras hacen referencia a las unidades experimentales 1, 2, 3, 4, 5 y 6 que se estudió por cuadruplicado (4 veces). Distribuidos los grupos se procedió a inocular a cada tubo de ensayo 0,4 g de biomasa con BB-12 y se refrigeraron a 4°C, luego se evaluaron cada 5 días.

Tabla 1. Cantidad de ingredientes para la preparación de muestras.

Unid Exp (20 g) 100%	Prebióticos 5% (g)								Gelatina 93%		Probiótico 2%	
	X ₁ Oligf.		X ₂ Inulina		X ₃ Miel		1 Unid	4 Unid	1 Unid	4 Unid		
	1 Unid	4 Unid	1 Unid	4 Unid	1 Unid	4 Unid	1 Unid	4 Unid	1 Unid	4 Unid		
1	0	0	1	4	0	0	18,6	74,4	0,4	1,6		
2	1	4	0	0	0	0	18,6	74,4	0,4	1,6		
3	0,5	2	0	0	0,5	2	18,6	74,4	0,4	1,6		
4	0	0	0	0	1	4	18,6	74,4	0,4	1,6		
5	0,5	2	0,5	2	0	0	18,6	74,4	0,4	1,6		
6	0	0	0,5	2	0,5	2	18,6	74,4	0,4	1,6		

3.- Dilución y siembra del probiótico en capsulas de petri: los recuentos se iniciaron a las 48 hrs de la incubación, realizando diluciones de 10⁵, 10⁶ y 10⁷ en un periodo de tiempo de 5, 10 y 15 días.

4.- Procesamiento y análisis de datos: Los datos obtenidos fueron procesados a través de un análisis estadístico empleando el método probabilístico de Weibull, siguiendo el procedimiento establecidos por Giménez *et al.*, (2008) y Fernández y García, (2010). El indicador utilizado fue las Log ufc/g de BB-12 en la gelatina en el tiempo, medidos en

intervalos de 5 días, considerándose como muestra inaceptable aquellas que contenían recuentos inferiores a Log 6 (1×10^6 ufc/ml de BB-12). Los resultados del análisis de riesgo de Weibull fueron tratados en el software STATISTICA 8.0, siguiendo lo descrito por Gacula y Singh, (1984). El criterio para establecer la estabilidad en la gelatina, se fijó como el tiempo en que el 50 % de las muestra fueron inaceptables, esta probabilidad corresponde a un acumulativo de riesgo de 63,2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Reporte de recuentos obtenidos en el análisis experimental: La Tabla 2 muestra los resultados o recuentos (ufc/g) de BB-12 presente en la gelatina, medidos en el tiempo a temperatura de refrigeración (aprox. 4 °C). La supervivencia del BB-12 en las gelatinas durante los primeros 15 días de ensayo, se encuentran dentro del límite crítico considerado por Sanz (2007), Langhendries *et al.* (1995), para aportar beneficios de salud y ser considerado un alimento probiótico o producto funcional. Adicionalmente se observa que la mayor sobrevivencia en las gelatinas con 0,5g de inulina y 0,5 g de miel, obtuvo log recuentos de $7,84 \pm 0,21$ a los 15 días de almacenamiento, valores que cumplen con el límite crítico de calidad funcional del producto (log 6) (Tabla 2).

Tabla 2. Respuesta de la población o recuentos (ufc/g) de BB-12 presente en las gelatinas, medidos en el tiempo a temperatura de refrigeración (aprox. 4 °C).

Días	Oligofructosa	Inulina	Miel	Olig/ inulina	Olig/ miel	Inulina/ miel
0	6,25 ± 0,03	6,25 ± 0,03	6,25 ± 0,03	6,25±0,03	6,25 ± 0,03	6,25 ± 0,03
5	7,77±0,12	6,51±0,12	5,13±0,17	6,90±0,18	7,49±0,15	5,33±0,15
10	8,44±0,4	8,38±0,12	7,73±0,20	8,36±0,12	7,96±0,17	7,60±0,18
15	7,44±0,15	7,49±0,12	7,61±0,18	7,69±0,25	6,40±0,17	7,84±0,21

Tabla 3. Valores de Probabilidad de los modelos lineal y cuadrático de los recuentos del BB-12 para los días 5, 10 y 15 de almacenamiento de la gelatina.

Día de Alm.	LINEAL		CUADRATICO	
	F-valor	p-valor	F-valor	p-valor
5	20,03	0,0005	183,23	0,0000
10	8,05	0,0099	1,64	0,2768
15	1,05	0,3890	5792,36	0,0000

La Tabla 3 muestra los resultados de los recuentos del BB-12 en un periodo de 5, 10 y 15 días de almacenamiento de la gelatina (previa transformación de la variable), el

modelo lineal consta de términos de primer orden para cada uno de los componentes y el modelo cuadrático añade productos cruzados entre pares de componentes. Al observar el P-valor de los modelos involucrados se obtiene que las ecuaciones cuadráticas son las de mayor adecuación para predecir las respuestas de los cambios del BB-12, ya que p-valor es inferior a 0,05 (Tabla 3). Por lo tanto las predicciones de las combinaciones de los componentes de la mezcla se establecieron con los modelos cuadráticos. En la Tabla 4, se observa los coeficientes de determinación de los modelos estudiados (R^2), los mismos indican buena capacidad de predicción de los modelos poblacionales planteados ya que, estos son superiores al 80% y los valores son cercanos al R^2 adjuntados. Es decir, que los componentes oligofructosa, inulina y miel explican las respuestas Log recuento de BB-12 en el tiempo de estudio, en los porcentajes que indica la Tabla 4. De igual manera se visualiza que los R^2 de mayor significancia los poseen los modelos cuadráticos.

Tabla 4. Coeficientes de determinación de los modelos lineales y cuadráticos para los diferentes días de almacenamientos estudiados.

Día de almacenamiento	LINEAL		CUADRATICO	
	R^2	R^2 adjuntado	R^2	R^2 adjuntado
5	81,66	77,58	99,80	99,64
10	64,13	56,16	80,30	73,89
15	18,92	0,91	99,97	99,95

2.- Efectos de las mezclas de oligofructosa, inulina y miel sobre los recuentos de BB-12 en la gelatina.

En la Figura 1, se evidencia que al aumentar en la concentración la oligofructosa se incrementa los valores de la concentración de BB-12 en la gelatina, ya que como se observa en el gráfico de trazas este es el único ingrediente de la mezcla que incrementa las ufc/g de BB-12. A su vez se visualiza que los componentes inulina y miel solo actúan a concentraciones bajas en la mezcla ya que a medida que se incrementa el porcentaje esta causa un efecto negativo en la sobrevivencia del BB-12 en la gelatina, teniendo efecto más acentuado en el factor concentración de miel. Por lo antes expuesto se puede inferir que el prebiótico que beneficia considerablemente al BB-12 durante los primeros 5 días de almacenamiento, es la oligofructosa.

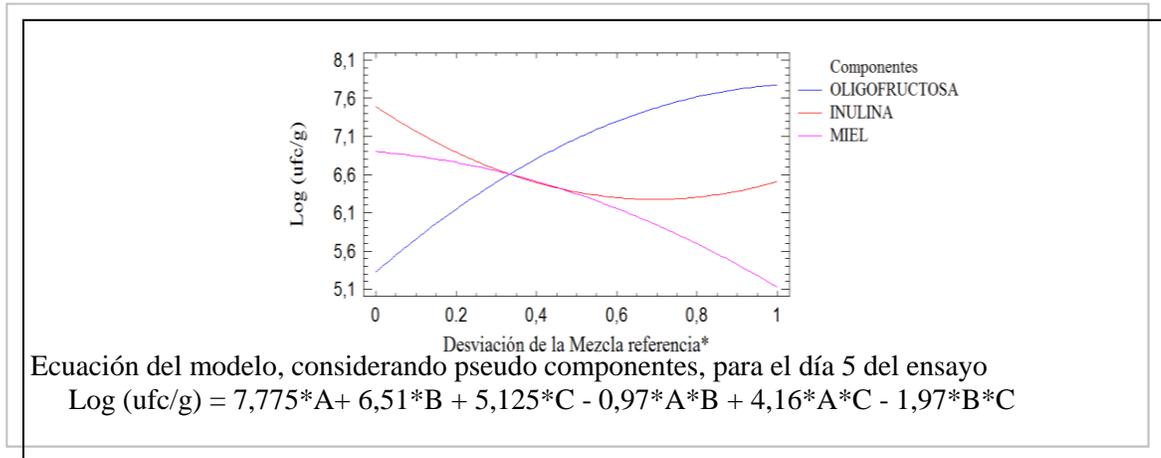
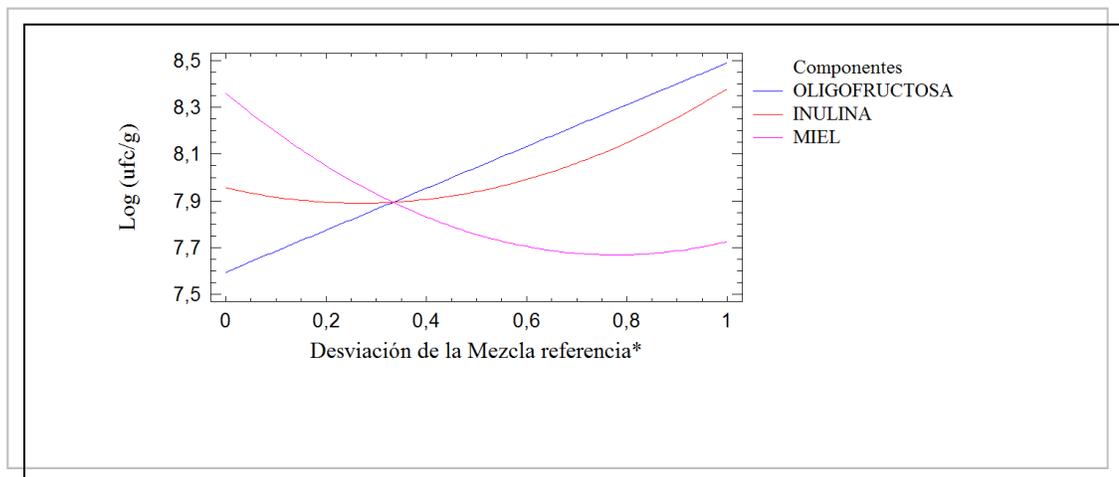


Figura 1. Modelo cuadrático de mezcla durante 5 días de almacenamiento, correspondiente a la variable respuesta Log (ufc/g) de BB-12, en función de los factores: Oligofruktosa (A), Inulina (B) y Miel (C). Figura Gráfico de trazas, *Mezcla referencial 0,33g A; 0,33g B; 0,33g C. $R^2 = 0,9995$ ($p < 0,05$).

En la Figura 2 y 3, se presentan las gráficas correspondientes a la variación del Log (ufc/g) de BB-12 en la gelatina durante 10 y 15 días de almacenamiento respectivamente, en ambos tiempos (10 y 15 días) se observa el efecto parabólico y participativo prebiótica que posee la inulina en cuanto al mayor recuento de BB-12 en la gelatina, incluso teniendo la mayor referencia al final del ensayo. Este comportamiento del efecto prebiótico de la inulina en recuento a los 15 días de la experimentación y la incorporación de la miel como factor importante en las postrimerías del ensayo (15 días), hace inferir que se debe al consumo selectivo de los BB-12 de la oligofruktosa como fuente de energía inicial (10 días), y luego por el grado de complejidad de cada carbohidrato, el BB-12 lo utiliza para su mantenimiento dentro de la matriz de la gelatina.



Ecuación del modelo, considerando pseudo componentes, para el día 10 del ensayo
 $\text{Log (ufc/g)} = 8,49*A + 8,38*B + 7,725*C - 0,3*A*B - 0,61*A*C - 1,83*B*C$

Figura 2. Modelo cuadrático de mezcla durante el día 10 de almacenamiento, correspondiente a la variable respuesta Log (ufc/g) de BB-12, en función de los factores: Oligofruktosa (A), Inulina (B) y Miel (C). Figura Gráfico de trazas, *Mezcla referencial 0,33g A; 0,33g B; 0,33g C. $R^2 = 0,8030$ ($p < 0,05$).

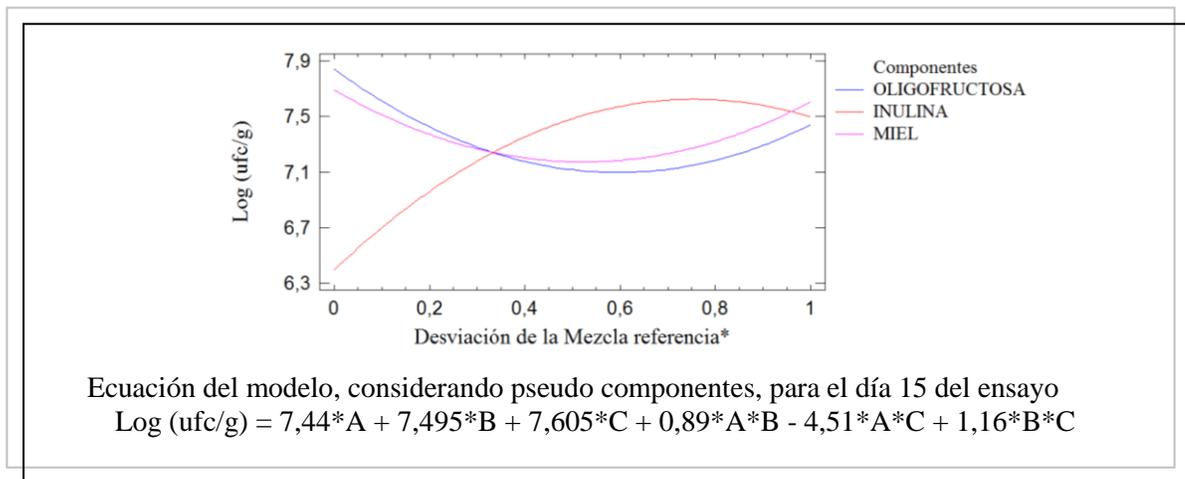


Figura 3. Modelo cuadrático de mezcla durante el día 15 de almacenamiento, correspondiente a la variable respuesta Log (ufc/g) de BB-12, en función de los factores: Oligofruktosa (A), Inulina (B) y Miel (C). Figura superior: Gráfico de contornos; Figura inferior: Gráfico de trazas, *Mezcla referencial 0,33g A; 0,33g B; 0,33g C. $R^2 = 0,9997$ ($p < 0,05$).

3.- Selección de las combinaciones de oligofruktosa, inulina y miel en la gelatina comercial: En esta etapa se procesaron y analizaron los datos obtenidos del análisis experimental para conseguir las combinaciones óptimas de cada grupo de muestras. Se derivó del contraste y evaluación de las variables de respuestas estudiadas, según los resultados obtenidos, se seleccionaron tres formulaciones de gelatina que garantizaron la máxima respuesta (tabla 5), si se desea comercializar el producto entre los primeros diez días de su elaboración se debe seleccionar la formulación B o C, ya que la oligofruktosa es el factor predominante en el mantenimiento de BB-12 en la gelatina. Pero si es el caso de una comercialización en anaquel la formulación A es la adecuada ya que, los BB-12 usan estos prebióticos cuando no tienen una fuente primaria de facilidad.

Tabla 5. Formulaciones óptimas establecidas con los tres modelos cuadráticos a diferentes días de almacenamiento.

Formulación	Oligofruetosa (g)	Inulina (g)	Miel (g)	Log (ufc/g) BB-12.
A	-	0,45	0,55	7,84
B	1,00	-	-	8,49
C	0,82	0,18	-	7,91

CONCLUSION

Durante la evaluación de las interacciones del BB-12 con los prebióticos, se evidenció que el componente que beneficia considerablemente al BB-12 durante los primeros 5 días de almacenamiento, es la oligofruetosa. Sin embargo, durante los días 10 y 15 de almacenamiento se observó que la inulina ofreció el mayor recuento de BB-12 en la gelatina. Este comportamiento de la inulina a los 15 días de la experimentación y posteriormente la incorporación de la miel, hace inferir que se debe al consumo selectivo de los BB-12 de la oligofruetosa como fuente de energía inicial (10 días) y posteriormente el consumo de inulina y la miel como fuente secundaria. Las formulaciones obtenidas ofrecen distintas alternativas para la elaboración del producto dependiendo del tipo de comercialización y del tiempo en anaquel. En este sentido, la vida útil y estabilidad del producto utilizando como método la ecuación de Weibull, establece que las formulaciones poseen una vida útil comprendida entre 46 a 49 días aproximadamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aracenta, J. y Gil A. 2009. Alimentos funcionales y salud en las etapas infantiles y Juvenil. Editorial Panamericana. España 89-95.
- Balza, M. (2013). Evaluación de la supervivencia de *Bifidobacterium* (BB-12) en un laminado de mango (*mangifera indica*.) aplicando cobertores alginato y gelano. Tesis de maestría. Universidad Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, UNELLEZ. San Carlos Estado Cojedes.
- De las Cagigas A. y Blanco G. 2002. Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. Cubana revista cubana de alimentos. [En línea]. Disponible: http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.htm. [Consulta [20 Octubre 2013].
- Edwards, W. 2002. La ciencia de las golosinas. Editorial Acribia. España. 44-47.

- Murray, P. 2006. Microbiología médica. Ediciones Mosby. España. 75-80.
- Norma Venezolana COVENIN. 1989. N°1126. Alimentos. Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico. Fondonorma. Caracas.
- Norma Venezolana COVENIN. 1992. N°2946. Gelatina Comestible. Fondonorma. Caracas.
- Olagnero, G. y Abad, Genevois, C. 2007. Alimentos funcionales: Fibra, probióticos y simbióticos. Argentina. 62, 89-96.
- Oliveira, F. y González M (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. España. 26-34.
- Sanz, P. 2007. Monografía VI. Alimentos y Salud. Instituto de España Real Academia de Farmacia. España. 319-320.
- Tapia, M. 2007. Desarrollo de un producto funcional de fruta por impregnación a vacío y películas comestibles usando matrices sólidas de papaya. Tesis Doctoral. UCV. Caracas- Venezuela.