

ANÁLISIS PRELIMINAR DEL EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA SOBRE LA VIABILIDAD Y ESTABILIDAD EN FORMULACIONES DE PROBIÓTICOS

PRELIMINARY ANALYSIS OF THE EFFECT OF WATER ACTIVITY ON VIABILITY AND STABILITY OF PROBIOTICS FORMULATIONS

Dervis Jorge Febles Remón^{1}, Yorley Negrín Bandera¹ y Fidel Domenech López²*

¹ Facultad de Ingeniería Química. Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría, CUJAE Calle 114, No. 11901, entre Cidovía y Rotonda. Marianao. Habana. Cuba.

² Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Vía Blanca 804 Esq. Carretera Central. San Miguel del Padrón, La Habana.

Recibido: Octubre 22, 2015; Revisado: Noviembre 18, 2016; Aceptado: Diciembre 18, 2015

RESUMEN

El PROBICID[®] seco, producido en la planta Cuba10 del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), se obtiene mediante un proceso en el que se pierde el 99% de la viabilidad celular en la operación de secado por aspersión. Con el objetivo de eliminar esta etapa y minimizar las pérdidas, en el estudio se obtuvieron formulaciones de un preparado probiótico utilizando represores químicos de la actividad de agua, con la aplicación de un diseño de experimentos ³. Se determinaron las isotermas de adsorción de los formulados, a partir del ajuste de modelos a los datos experimentales. Se analizó la influencia de la actividad de agua de los formulados sobre las variables dependientes viabilidad y estabilidad, obteniéndose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el valor que toman las variables respuesta para los niveles del factor analizado.

Palabras clave: actividad de agua, PROBICID[®], probiótico, estabilidad, viabilidad.

Copyright © 2016. Este es un artículo de acceso abierto, lo que permite su uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

* Autor para la correspondencia: Dervis J. Febles, Email: dfebles@quimica.cujae.edu.cu

ABSTRACT

The dry PROBICID® is obtained in Cuba10 plant of the Cuban Research Institute of Sugarcane By-products (ICIDCA), by a process that lost 99% of cell viability in the drying operation spray. In order to eliminate this stage and minimize losses, in the study was obtained probiotics formulations using chemicals repressors of water activity, with the application of a design of experiments 3². The adsorption isotherms of the formulations were determined by fitting models to experimental data. The influence of water activity over viability and stability as dependent variables was studied, yielding no statistically significant difference between the values taken by the response variables for levels of the analyzed factor.

Key words: water activity, PROBICID®, probiotic, stability, viability.

1. INTRODUCCIÓN

El PROBICID®, es un aditivo probiótico obtenido por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) en la planta CUBA 10. Se obtiene por un proceso fermentativo en el que interviene la bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. En el proceso de obtención del PROBICID® seco se aplica una operación de secado por aspersión, que constituye la fase crítica debido a que por las condiciones utilizadas actualmente en la planta, se produce una pérdida considerable de la viabilidad (Gastón, 2005). Con el presente estudio se pretende obtener una formulación del bioproducto utilizando controladores químicos de la actividad del agua, con el objetivo de obtener un producto que conserve su viabilidad y estabilidad sin necesidad de condiciones especiales de almacenamiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La experimentación se realizó en los laboratorios del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Para la selección de los materiales se tuvieron en cuenta las propiedades y aplicaciones reportadas en la literatura (Nava y col., 2015; Costales y col., 2015). En las formulaciones se utilizó bagacillo como soporte o matriz de los formulados, miel física y carbonato de calcio (CaCO₃).

Para formular se empleó el producto final de un proceso de fermentación en zaranda a partir de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB/ 103-1-5, procedente del banco de cepas del Departamento de Microbiología de la Subdirección de Derivados del ICIDCA. En cada formulado el bagacillo aportó el 30% de los sólidos totales, con un tamaño de partícula inferior a 2 mm y una humedad de 11,87%, luego de un proceso de secado solar. Para las formulaciones se aplicó un diseño de experimentos 3² con el objetivo de analizar el efecto del contenido de humedad, variable de la cual se estudiaron los niveles 15%, 30% y 45% másico y el factor composición de represores, cuyos niveles se muestran la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de composición de los formulados

Tipo de Formulado	A	B	C
% miel - % CaCO ₃	100 - 0	50 - 50	0 - 100

La composición expuesta para la miel y el CaCO₃ corresponden al porcentaje de sólidos totales restante de los sólidos aportados por el bagacillo y el probiótico.

Para construir las isotermas de adsorción se registró el incremento de la masa por ganancia de humedad, de muestras previamente secadas al vacío a 65°C por 24 horas, que fueron puestas en contacto con una atmósfera generada por disoluciones saturadas de las sales expuestas en la Tabla 2.

Tabla 2. Soluciones saturadas con humedades relativas conocidas a 30°C

Sal	CaCl₂	LiCl	MgCl₂	NaBr	NaCl	KCl
%HR	0,04	11,5	32,3	53,2	75,1	83,4

Se realizó una siembra en placa de muestras de cada formulado, utilizando el medio selectivo Agar Diferencial WL. Se estudió de forma preliminar la contaminación microbiana por inspección diaria, para identificar algún tipo de contaminación apreciable a simple vista, con el objetivo de estudiar en investigaciones posteriores, las formulaciones aparentemente inalteradas. Todo el proceso tuvo una duración de 42 días. Para analizar la influencia de la actividad de agua en los formulados sobre las variables dependientes viabilidad y estabilidad, se realizó un análisis de varianza unifactorial para el día 42 utilizando el software *Curve Expert* versión 1.34.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la construcción de las isotermas de adsorción se realizó el ajuste de los modelos GAB, *Hailwod-Horrowin*, *Peleg* y un modelo polinomial de cuarto orden a los datos experimentales. El buen ajuste se determinó a partir del análisis del porcentaje de error medio relativo (%Er). Este parámetro no debe ser superior al 10%. Como resultado se obtuvo que en todos los casos el modelo polinomial presentó el mejor ajuste. Con el uso de este modelo se determinó el valor de la actividad de agua (Aw) de cada formulación, en función de su contenido de humedad, (Navia y col., 2013), ver figuras 1, 2 y 3.

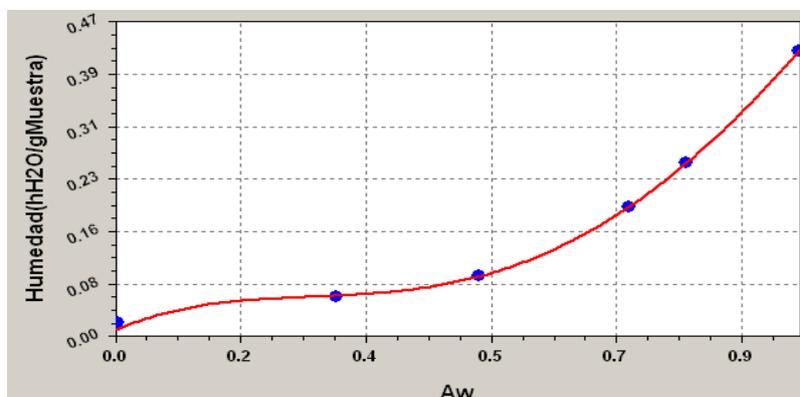


Figura 1. Isoterma de adsorción del formulado A

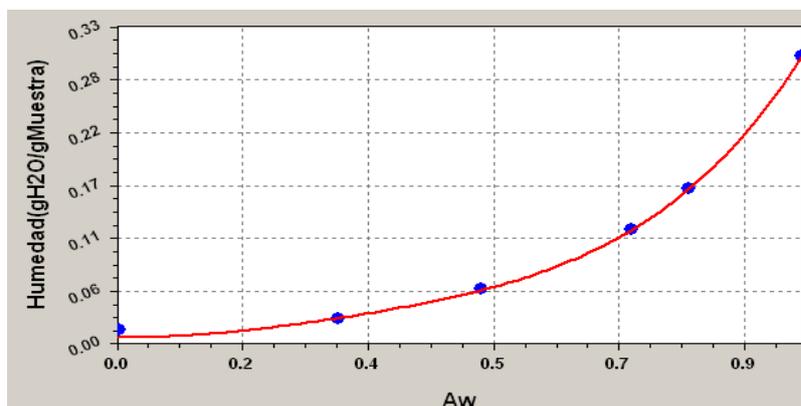


Figura 2. Isoterma de adsorción del formulado B

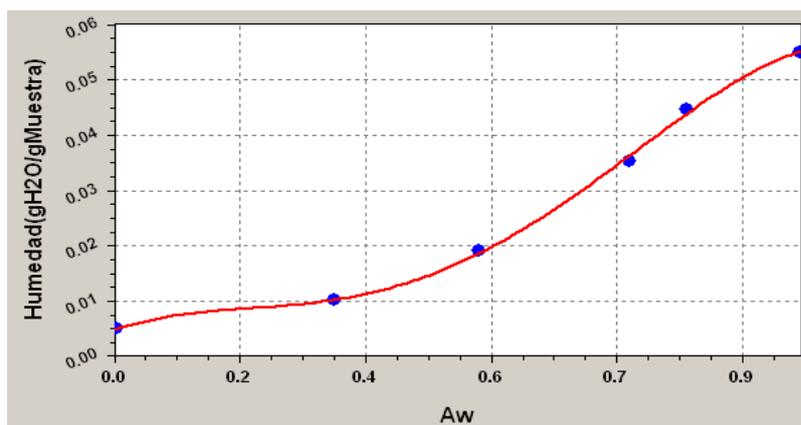


Figura 3. Isoterma de adsorción del formulado C

3.1. Estudio de la viabilidad celular.

Con el estudio se encontró que las formulaciones que contienen solo al represor CaCO₃ en su composición, muestran una disminución gradual de la viabilidad en el tiempo, según muestra la Tabla 3. Estos formulados alcanzan el máximo valor de actividad de agua para bajos porcentos de humedad. La causa directa de la disminución de la titulación es la ausencia de nutrientes disponibles en el medio.

Tabla 3. Conteo de bacterias lácticas y actividades de agua de las formulaciones

No	Tipo	% Humedad	Aw	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42	
1	C	15	1	4,00*10 ⁶	3,10*10 ⁶	1,10*10 ⁴	0	UFC/g
2	B	30	1	2,14*10 ⁷	1,96*10 ⁷	6,83*10 ⁷	1,10*10 ⁸	
3	A	45	1	2,80*10 ⁷	6,10*10 ⁶	2,22*10 ⁶	0	
4	A	15	0,88	1,22*10 ⁶	0	0	0	
5	C	30	1	1,45*10 ⁷	1,30*10 ⁷	4,30*10 ⁶	3,53*10 ⁴	
6	B	45	1	6,25*10 ⁷	1,36*10 ¹¹	5,80*10 ¹¹	8,00*10 ⁷	
7	B	15	0,99	1,33*10 ⁷	4,31*10 ⁶	1,16*10 ⁶	0	
8	A	30	1	2,01*10 ⁷	5,02*10 ⁶	1,25*10 ⁶	5,00*10 ⁴	
9	C	45	1	1,80*10 ⁷	1,59*10 ⁷	4,85*10 ⁶	1,10*10 ⁵	

En los formulados que presentan igual proporción de los represores en su composición se observó una disminución de la viabilidad en algunos casos y un incremento de la viabilidad en otros. El incremento se debe a la presencia de miel final. Esta fue utilizada como fuente de carbono por los microorganismos en sus procesos metabólicos, lo que les permitió desarrollarse y multiplicarse. La disminución, en los otros casos, estuvo condicionada por la presencia de sustancias inhibitoras del crecimiento celular, que forman parte de la composición de la miel. El predominio de un comportamiento u otro estuvo en dependencia, principalmente, del contenido de miel y la humedad en cada formulado. Para el mínimo valor de humedad se observó una disminución de la viabilidad menos acentuada que la observada en los formulados con CaCO₃ como único represor. Mientras que para mayores porcentos de humedad, se observó un crecimiento, que resultó más marcado mientras mayor fue el contenido de agua en el producto.

Las formulaciones que contienen a la miel como único represor químico tuvieron una disminución gradual de la viabilidad. El comportamiento se observó a pesar de que presentan un valor de Aw máximo. Los resultados están en correspondencia con el comportamiento señalado anteriormente, cuya causa es la presencia de inhibidores, en este caso, en mayores concentraciones por las propias composiciones de los formulados. Para los menores valores de humedad este efecto se tornó más acentuado.

3.2. Estudio preliminar de la contaminación microbiana.

La Tabla 4 muestra el período en días durante el cual las formulaciones se mantuvieron sin alteración aparente.

Tabla 4. Estabilidad de las formulaciones

<i>Formulado</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
Estabilidad (Días)	6	6	17	42	4	42	42	41	3

En la mayor parte de los casos se observó el desarrollo de hongos y levaduras. Solo las formulaciones 4, 6 y 7 se mantuvieron sin alteraciones visibles al término del estudio. En trabajos posteriores se hace necesario realizar una siembra en medios selectivos de muestras de estos tres formulados.

3.3. Influencia de la Aw sobre la viabilidad celular.

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA). Esta descompone la varianza de la viabilidad en dos componentes: Un componente entre grupos que analiza la varianza entre las distintas muestras y otro dentro de los grupos que sólo analiza la varianza dentro de cada muestra para las Aw correspondientes.

Tabla 5. Análisis de varianza para viabilidad

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Estimación de varianza</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	1,15*10 ¹⁵	2	5,74*10 ¹⁴	0,26	0,78
Dentro de grupos	1,3*10 ¹⁶	2,22*10 ¹⁵	-	-	-

El valor P para el análisis es mayor que 0,05, por tanto se puede afirmar con un nivel de confiabilidad de un 95%, que no existen diferencias estadísticamente significativas para el comportamiento de la viabilidad entre un nivel y otro de Aw.

3.4. Influencia de la Aw sobre la estabilidad.

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos en el análisis de varianza realizado.

Tabla 6. Análisis de varianza para estabilidad

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Estimación de varianza</i>	<i>Razón F</i>	<i>Valor P</i>
Entre grupos	1158,13	2	579,063	1,71	0,2578
Dentro de grupos	2027,43	6	337,905	-	-

En este caso se observa un valor P mayor que 0,05. La hipótesis nula del análisis de varianza puede ser rechazada. Se puede afirmar con un nivel de confiabilidad de un 95%, que no existen diferencias estadísticamente significativas para el comportamiento de la estabilidad entre un nivel y otro de Aw.

A pesar de los resultados obtenidos se conoce que el factor actividad de agua es determinante en la conservación de los productos de humedad intermedia (Catalina y col., 2014). Para las variables respuesta, no existen diferencias significativas en su comportamiento entre un valor y otro del factor analizado. El resultado se debe a que los represores empleados no son capaces de actuar como agentes de control de la actividad de agua de manera eficiente, para las condiciones de humedad estudiadas. Otra causa es la incidencia de otros factores como compuestos inhibidores del crecimiento microbiano presentes en la miel final y que el método utilizado para el análisis de la estabilidad no permite determinar el comportamiento real de la variable respuesta. Como resultado se esperaba que aquellos formulados con mayores Aw se contaminaran primero y en mayor grado. Sin embargo existen muestras contaminadas y otras inalteradas que presentan una Aw máxima. Esto no quiere decir que en aquellas formulaciones en las que no se observó contaminación a simple vista, no se desarrollaron otros tipos de microorganismos a nivel microscópico (Graü y col., 2007). Se necesita realizar un estudio más profundo para determinar el momento en el que se comienza a desarrollar realmente la contaminación e identificar los formulados que se mantienen inalterados en el tiempo.

Los mejores resultados, se obtuvieron para el formulado seis, que presenta en su composición 116,5 gramos de bagacillo, 21,09 gramos de miel, 19,20 gramos de carbonato de calcio y 43,21 mL de probiótico. La viabilidad en este formulado tuvo un incremento hasta el orden de 10^{11} . El formulado tuvo una Aw máxima, sin embargo se mantuvo aparentemente sin contaminación durante el análisis.

4. CONCLUSIONES

1. Con el ajuste de modelos matemáticos a los datos experimentales, se obtuvo que un modelo polinomial de cuarto orden es el adecuado para describir el proceso de

adsorción acuosa de las formulaciones a la temperatura e intervalo de A_w en estudio.

2. Como resultado del estudio de la viabilidad en el tiempo para cada formulación, se obtuvo que el comportamiento de esta variable estuvo condicionado por el contenido de humedad, la presencia o no de nutrientes en el medio aportados por la miel final, y la presencia de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano provenientes de este represor.
3. Con la inspección diaria de los formulados se encontró que las formulaciones 4, 6 y 7 se mantuvieron sin alteraciones visibles al término del estudio.
4. A partir del análisis de varianza realizado para el día 42 se obtuvo como resultado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el valor que toman las variables viabilidad y estabilidad para los niveles del factor actividad de agua analizados, debido a que los represores empleados no son capaces de actuar como agentes de control de la actividad de agua de manera eficiente, para las condiciones de humedad estudiadas y que el método utilizado para el análisis de la estabilidad, no permite determinar el comportamiento real de la variable respuesta.
5. El formulado seis presentó el mejor comportamiento por tener un incremento hasta el orden de 10^{11} de la viabilidad y mantenerse aparentemente sin contaminación durante el análisis.

REFERENCIAS

- Catalina, D., Sierra, H., Díaz-Moreno, C., Evaluación de parámetros de calidad físico-química, microbiológica y sensorial en tomate deshidratado comercial (*Lycopersicon esculentum*), Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, Vol.17, No.1. enero - junio, 2014, pp. 131 - 138.
- Costales, R., Saenz, T. y Cabello, A., Ingeniería aplicada a la producción de alimento Formulado vía bagazo hidrolizado. Un caso de Estudio, Revista Centro Azúcar., Vol. 42, No. 1, Enero-Marzo, 2015, pp. 51-60.
- Gastón, C., Determinación de las isotermas de adsorción y desorción de probióticos a partir de bacterias ácido lácticas., Departamento de Química Analítica ICIDCA, 2005.
- Graü, C., Sánchez, D., Zerpa, A., y García, N., Influencia de la actividad del agua, pH y temperatura en el crecimiento de *Aspergillus penicillioides* y *A. Terreus* aislados de la carne seca y salada de atún listado (*Katsuwonus pelamis*), Revista Científica, Vol.17, No. 2, abril, 2007, pp. 193-199.
- Nava, R., Peña, A., y Belmar, R., Influencia de la melaza de caña de azúcar en la aceptación por cerdos de dietas con granos crudos o ensilados de frijol de canavalia., Revista Computadorizada de Producción Porcina., Vol. 22., No. 1., 2015, pp. 26-34.
- Navia P., Ayala A, Villada H., Determinación de isotermas de adsorción de agua en biocompuestos de harina termoplástica y fique., Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustria., Vol. 11, No. 1, enero – junio, 2013, pp.144 – 153.