



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Evaluación de la capacidad prebiótica del Biopolímero Bilac®**

**Liliana del Pilar Zambrano Pardo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2020

# **Evaluación de la capacidad prebiótica del Biopolímero Bilac®**

**Liliana del Pilar Zambrano Pardo**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magíster en Microbiología**

Directora:

MSc Olga Patricia Cobos de Rangel

Codirectora:

MSc Adelina del Pilar Meléndez Mejía

Línea de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Grupo de Investigación:

Biopolímeros y Biofuncionales

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades de Microbiología

Bogotá, Colombia

2020

## Resumen

Ciertas enfermedades crónicas no transmisibles, y enfermedades gastrointestinales pueden prevenirse y también tratarse con el consumo de alimentos funcionales como los probióticos y prebióticos. Estudios previos realizados tanto *in vitro*, como *in vivo* en animales y en humanos demuestran el efecto benéfico que proporciona al huésped el consumo diario de estos alimentos. Ya que los prebióticos incluyen fibras solubles selectivamente fermentables por la microbiota colónica, previene molestias intestinales como el estreñimiento, por lo que su consumo es recomendable.

En Colombia ciertos tipos de diarreas y enfermedades gastrointestinales en la población infantil son causa de morbimortalidad. Este tipo de enfermedades también afectan a los adultos y adultos mayores; ya que en estas poblaciones se dan cambios importantes en la flora intestinal hacia una composición potencialmente perjudicial. Por ello se han incrementado el número de estudios sobre prebióticos y probióticos para evaluar la modificación de la microbiota colónica hacia una composición favorable que presente efectos fisiológicos benéficos en el huésped.

El biopolímero Bilac® obtenido en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia presenta propiedades importantes para su uso como prebiótico, ya que tiene un alto contenido en fibra soluble, es un alfa – glucano, con enlaces  $\alpha$  2-6, un glucooligosacárido. Se ha reportado previamente que los glucoligosacáridos tienen efectos prebióticos debido a que son carbohidratos no digeribles en la parte superior del tracto gastrointestinal, llegando intactos al colon donde son fermentados por la microbiota intestinal benéfica.

En el presente estudio se buscó evaluar la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones *in vitro*, determinando la capacidad de algunas bacterias probióticas, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, de utilizar este biopolímero como fuente de carbono.

Se comprobó que en un uso conjunto entre probióticos y prebióticos es posible que la viabilidad de estas bacterias se mantenga alta en función del tiempo, para su uso en bebidas y alimentos. Además, el estudio contempló un componente *in vivo*, en el cual se realizó un estudio clínico en humanos en donde se proporcionó en la dieta de las personas dosis diarias del biopolímero. Los resultados de estos ensayos permitieron concluir que, al consumir este biopolímero en galletas y una bebida láctea, aumenta la microbiota intestinal benéfica, y mantiene o disminuye levemente los coliformes.

**Palabras clave:** Probiótico, prebiótico, inulina, biopolímero, microbiota intestinal.

## Abstract

Certain chronic non communicable diseases, and gastrointestinal diseases can be prevented and treated with the consumption of functional foods such as probiotics and prebiotics. Previous studies both *in vitro* and *in vivo* in animals and humans show the beneficial effect that gives the guest the daily consumption of these foods. Prebiotics include selectively fermentable soluble fibers by the colonic microbiota, prevents intestinal discomfort such as constipation, so its recommended consumption.

In Colombia certain types of diarrhea and gastrointestinal diseases in children are cause of mortality. These diseases also affect adults and the elderly, as significant changes occur in the intestinal flora towards a potentially harmful composition. Thus, we have increased the number of studies on prebiotics and probiotics to evaluate the modification of the colonic microbiota towards a favorable this beneficial physiological effects on the host composition.

The Bilac® biopolymer obtained at the Institute of Biotechnology of the National University of Colombia presents important for use as prebiotic properties, as it is high in soluble fiber, it is an alpha - glucan,  $\alpha$  2-6 linked a glucooligosaccharide. It has been previously reported to have prebiotic effects glucooligosaccharide because they are non-digestible carbohydrates in the upper gastrointestinal tract, reaching the colon intact where they are fermented by beneficial intestinal microbiota.

In the present study aimed to evaluate the ability prebiotic Bilac® biopolymer under *in vitro* by determining the capacity of some probiotic bacteria, such as *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, using this biopolymer as a source of carbon.

It was found that in a joint between probiotics and prebiotics use it is possible that the viability of the bacteria is kept high in terms of time, for use in beverages and foods.

In addition, the study included an *in vivo* component, in which a clinical study in humans in which it was provided in the diet of people daily dose of the biopolymer.

The results of these tests led to the conclusion that this biopolymer consuming cookies and milk drink, increases beneficial intestinal microbiota, and maintained or slightly decreased coliforms.

**Keywords:** Prebiotic, probiotic, inulin, biopolymer, intestinal microbiota.

# Contenido

Resumen .....	3
Abstract.....	4
Lista de figuras .....	7
Lista de fotografías.....	8
Lista de tablas .....	9
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	10
Introducción.....	11
1. Marco teórico.....	13
1.1 Prebióticos .....	13
1.2 Carbohidratos .....	16
1.2.1. Fructanos .....	17
1.2.2. Glucanos.....	18
1.3 Bipolímero Bilac® .....	20
1.3.1 Caracterización Química .....	20
1.4 Probióticos .....	22
1.6 Ecología Intestinal .....	27
1.6.1 Composición de la Microbiota .....	27
1.6.2 Funciones de la Microbiota Intestinal.....	30
2 Problema y Justificación.....	31
3 Objetivos .....	32
3.1 Objetivo General .....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32

4	Materiales y Métodos.....	33
4.1	Evaluación de la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones <i>in vitro</i> . .....	34
4.2	Evaluación del efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones <i>in vivo</i> .....	41
5	Resultados.....	47
5.1	Evaluación de la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones <i>in vitro</i> .....	47
5.2	Evaluación el efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones <i>in vivo</i> .....	68
6	Discusión .....	77
6.1	Evaluación de la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones <i>in vitro</i> . .....	77
6.2	Evaluación el efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones <i>in vivo</i> .....	100
7	Conclusiones .....	103
8	Recomendaciones .....	104
A.	Anexo: Consentimiento informado voluntarios del estudio de alimentación.....	105
B.	Anexo: Especificaciones Microscopia electrónica de Barrido SEM.....	107
C.	Anexo: Análisis Estadístico .....	109
D.	Anexo: Ficha Técnica Inulina Marca Tecnas S.A.....	116
E.	Anexo: Formato Evaluación sensorial.....	118
F.	Anexo: Formato Encuesta inicial ensayo biológico.....	119
G.	Anexo: Registro semanal de los voluntarios durante el estudio .....	120
H.	Anexo: Anamnesis voluntarios.....	123
I.	Anexo: Formato valoración medica .....	129
J.	Anexo: Valoraciones medicas .....	130
	Bibliografía .....	147

## Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de varios fructooligosacáridos.....	17
Figura 2. Principales rutas metabólicas de la Glucosa .....	26
Figura 3. Cuantificación de la Microbiota predominante en humanos .....	28
Figura 4. Esquema de la distribución de los componentes de la microbiota fecal .....	29
Figura 5. Proceso fermentación para <i>L. casei</i> . .....	38
Figura 6. Evaluación sensorial Triangular.....	38
Figura 7. Esquema metodológico para <i>L. casei</i> . .....	41
Figura 8. Esquema metodológico ensayo <i>in vivo</i> . .....	45
Figura 9. A. <i>Bifidobacterium bifidum</i> en MRS - Bilac®, B. MRS – inulina, C. MRS - Control .....	49
Figura 10. <i>Bifidobacterium bifidum</i> en glucosa, Bilac®, inulina, control.....	50
Figura 11. A. <i>Lactobacillus casei</i> en MRS - Bilac®, B. MRS – inulina, C. MRS - control.....	51
Figura 12. <i>Lactobacillus casei</i> en Bilac®, Inulina, Glucosa, control. ....	52
Figura 13. A. <i>Lactobacillus acidophilus</i> en MRS - Bilac®, B. MRS – inulina, C. MRS - control .....	53
Figura 14. <i>Lactobacillus acidophilus</i> en Bilac®, Inulina, Glucosa, control.....	54
Figura 15. Comportamiento del pH en el almacenamiento de la Bebida fermentada .....	63
Figura 16. Recuento (Log UFC/ml) durante el tiempo de almacenamiento. ....	64
Figura 17. Fermentación <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>B. bifidum</i> .....	67
Figura 18. Comportamiento de pH de materia fecal en el tiempo de estudio. ....	71
Figura 19. Log UFC/g <i>Bifidobacterium bifidum</i> en el tiempo y por sexo en el tiempo .....	72
Figura 20. Log UFC/g <i>Lactobacillus</i> sp. en el tiempo y por sexo en el tiempo.....	73
Figura 21. Log UFC/g Coliformes en el tiempo y por sexo, en el tiempo.....	74
Figura 22. Cromatograma de elución de carbohidratos .....	81
Figura 23. Concentración de galactooligosacáridos .....	84
Figura 24. Cromatograma HPLC – RID de inulina de extracto de desecho de alcachofa.....	86
Figura 25. Correlacion entre valor de OD 600 y UFC/ml de <i>L. amylovorus</i> .....	88
Figura 26. Influencia a nivel celular de 3.0% (p/v) NaCl.....	90
Figura 27. Cromatogramas HPLC de carbohidratos y curva de calibración.....	95
Figura 28. Cromatogramas para inulina de raíces de achicoria e inulina estándar .....	97

## Lista de fotografías

Fotografía 1. <i>Bifidobacterium bifidum</i> en agar MRS.....	33
Fotografía 2. <i>Lactobacillus casei</i> en agar MRS.....	34
Fotografía 3. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>B. bifidum</i> en Caldo MRS .....	35
Fotografía 4. A. Bebida fermentada después del almacenamiento a 4 °C por 35 días. B. Colonias de <i>L. lactis</i> y <i>L. cremoris</i> en agar MRS.....	40
Fotografía 5. A. Bebida fermentada. B. Galletas. C. Productos entregados. D. Ración diaria .....	42
Fotografía 6. Bilac® al 3% p/v, 5% y 7% en agua.....	47
Fotografía 7. Bilac® al 2%, 4%, 6%, 8%, 10% p/v en agua.....	47
Fotografía 8. <i>Bifidobacterium bifidum</i> en MRS glucosa y MRS - Bilac® .....	56
Fotografía 9. <i>Lactobacillus acidophilus</i> en MRS glucosa y MRS - Bilac® .....	57
Fotografía 10. <i>Lactobacillus casei</i> en MRS - glucosa y MRS - Bilac® .....	57
Fotografía 11. Colonias de Coliformes en Agar VRBA, <i>B. bifidum</i> en NNLP modificado y <i>L. casei</i> en MRS Vancomicina.....	70

## Lista de tablas

Tabla 1. Criterios para la clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico.....	14
Tabla 2. Características generales de los ONDs más comunes.....	16
Tabla 3. Análisis nutricional del biopolímero Bilac®.....	22
Tabla 4. Bebida láctea fermentada que presentó mayor similitud al control.....	59
Tabla 5. Bebida láctea fermentada que presentó mayor preferencia por los panelistas.....	60
Tabla 6. Bebida láctea fermentada que presentó mayor preferencia de acuerdo a su viscosidad.	60
Tabla 7. Evaluación sensorial sobre las características viscosidad, dulzor y acidez de la bebida....	60
Tabla 8. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada con Bilac® 1%....	61
Tabla 9. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada con inulina 1%... 61	
Tabla 10. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada con Bilac® 2%..	61
Tabla 11. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada con inulina 2% 62	
Tabla 12. Efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones <i>in vivo</i> .....	68
Tabla 13. Encuesta antes del consumo de la bebida fermentada con Bilac® y galletas.....	75
Tabla 14. Encuesta después del consumo de la bebida fermentada con Bilac® y galletas .....	76
Tabla 15. Índice prebiótico de lactulosa, inulina y Oligomate 55® .....	93
Tabla 16. Resultados HPLC análisis de contenido de oligosacáridos.....	98
Tabla 17. Crecimiento de microorganismos a 0, 24 y 48 horas.....	99
Tabla 18. Índice prebiótico a 24 y 48 horas de oligosacáridos .....	100

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
BAL	Bacterias ácido lácticas
<i>MRS</i>	Man, Rogosa y Sharpe
<i>NNLP</i>	Ácido nalidíxico, Sulfato de neomicina, Cloruro de litio, Sulfato de paramomicina.

## Introducción

El uso de alimentos funcionales progresivamente ha aumentado en la población colombiana, y dentro de estos el consumo de alimentos con adición de probióticos y prebióticos. La mayoría de los probióticos se hallan en el grupo de organismos conocidos como bacterias productoras de ácido láctico BAL y se consumen normalmente en bebidas como yogurt o leches fermentadas, aunque también se pueden encontrar otras preparaciones en el mercado. Según el Ministerio de Agricultura de Colombia (Min. Agricultura, 2018) entre 2013 a 2018 la industria láctea creció un 37% y ha movido \$10,6 billones COP, un colombiano destina cerca de \$214 mil COP anuales a productos lácteos y consume 41,6 kilogramos de esta categoría, incluyendo leche, quesos y yogur. Se espera que progresivamente aumente el consumo en los próximos años por lo que cada vez más se fortalece la industria láctea en Colombia (Min. Agricultura, 2018).

Los prebióticos son sustancias de la dieta, que están formados principalmente por carbohidratos no digeridos por enzimas humanas, una serie de di, oligo y polisacáridos, almidones resistentes y polioles de azúcar que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino (Bernal, 2017). Los prebióticos más estudiados son inulina tipo fructanos, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), isomaltooligosacáridos (IMO), xilooligosacáridos (XOS), glucooligosacáridos, lactulosa, transgalactooligosacáridos (TOS). Estos prebióticos son compuestos no digeribles que promueven selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon. Al consumo de prebióticos se han asociado algunos beneficios a la salud como prevención del cáncer de colon, disminución del colesterol sérico, regulación del sistema inmune, aumento en la absorción de algunos minerales y aumento en la producción de ácidos orgánicos. Los prebióticos tienen diversos efectos en los seres humanos en estado de enfermedad; varios estudios han demostrado el papel positivo de los prebióticos en diferentes trastornos, como trastornos cardiovasculares, enfermedad de Crohn, enfermedad del hígado graso alcohólico, etc. (Khangwal & Shukla, 2019). Es por ello que se ha estimulado cada vez más el estudio de sus propiedades para lograr potencializar sus beneficios en el bienestar humano. La industria alimentaria se ha esforzado por la inclusión de sustancias prebióticas que se ha realizado tradicionalmente en productos lácteos promoviendo a los consumidores hacia hábitos más saludables (Bernal, 2017).

Por los múltiples beneficios que tienen los prebióticos es que se evalúan constantemente posibles sustancias que tengan un cierto grado de efecto prebiótico, por lo que esta investigación se basa en indagar si un biopolímero de fibra soluble tiene una capacidad prebiótica significativa. El biopolímero Bilac® es un glucooligosacárido, que presenta propiedades como prebiótico, compuesto en su mayor parte por fibra soluble, y es considerado como GRAS (generalmente reconocido como seguro). En este estudio se evaluó el efecto prebiótico del biopolímero Bilac®, para su posterior uso en el desarrollo de alimentos funcionales.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Prebióticos

Por definición un prebiótico se clasifica como un nutriente específico en el colon. En 1995, Gibson y Roberfroid, definieron un prebiótico como un ingrediente alimenticio no digerible que influye benéficamente al huésped por estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon y mejorar la salud del huésped. Esta definición solo considera cambios microbianos en el ecosistema colónico humano. Más tarde, se consideró oportuno extrapolar esto en otras áreas que pueden beneficiarse de una manera selectiva de determinados microorganismos y de proponer una definición más completa de un prebiótico (Gibson *et al.* 2004) como: un ingrediente selectivamente fermentado que permite cambios específicos, tanto en la composición y/o actividad del microbiota gastrointestinal que confiere beneficios.

Estas definiciones aún tienen interés en el campo de la nutrición tanto en la investigación científica como en las aplicaciones alimentarias. La actividad prebiótica se ha atribuido a los componentes de muchos alimentos, en particular oligosacáridos y polisacáridos (incluyendo algunas fibras dietarias), pero muchas veces sin considerar los criterios exigidos. En particular hay que destacar que no todos los carbohidratos dietarios no digeribles y no todas las fibras dietarias son prebióticos. Por lo tanto, es necesario establecer criterios claros para la clasificación de un ingrediente alimentario como prebiótico. Esta clasificación requiere una demostración científica de que el ingrediente:

- Resiste la acidez gástrica
- No es hidrolizado por las enzimas de mamíferos
- No se absorbe en el tracto gastrointestinal superior
- Es fermentado por la microbiota intestinal
- Estimula selectivamente el crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar.

De acuerdo a lo anterior, los siguientes requisitos han sido clasificados como los tres criterios prebióticos (Tabla 1).

**Tabla 1. Criterios para la Clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico.****Criterios para la Clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico**


---

Resistencia a procesos digestivos en la parte superior del tracto gastrointestinal.
Fermentación por la microbiota intestinal.
Estimulación selectiva de crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias promotoras de la salud.

---

Fuente: Gibson &amp; Roberfroid, 1995.

Es importante demostrar la selectividad en la estimulación del crecimiento y/o actividad de las bacterias, siendo este criterio el más difícil de cumplir. Para comprobar este aspecto se requieren análisis microbiológicos confiables y cuantitativos de una amplia variedad de géneros bacterianos como: *Bacteroides*, *Bifidobacterias*, *Clostridios*, *Enterobacterias*, *Eubacterias*, *Lactobacilos*. Se utilizan muestras de material biológico, que por lo general son heces, aunque también se deberían incluir biopsias de materiales del colón.

En ocasiones, no se tienen en cuenta las interacciones bacterianas, y se cree erróneamente que con sólo informar sobre el proceso de fermentación *in vitro* en cultivos axénicos o incluso un aumento *in vitro* en un número limitado de géneros bacterianos en mezclas complejas de bacterias (por ejemplo, materia fecal) se prueba un efecto prebiótico.

Para medir la estimulación de la actividad bacteriana, se han utilizado patrones de producción de ácidos orgánicos, gases, y enzimas como biomarcadores específicos de géneros bacterianos.

Por otra parte, varios genes bacterianos específicos para el metabolismo de oligosacáridos se han identificado. Particularmente un gen en *Bifidobacterias* que codifica para una enzima que hidroliza la inulina tipo fructanos, expone la selectividad en la acción de los probióticos (Schell *et al.* 2002). A la luz de los tres criterios y las consideraciones anteriores, es importante revisar y discutir metodologías para demostrar un efecto prebiótico.

Los prebióticos pueden escapar al metabolismo y adsorción en el intestino delgado y al final influyen en la composición de la microbiota en el intestino grueso. Ellos son generalmente no digeribles por los humanos. Estudios experimentales han reportado una reducción en la incidencia de tumores y cáncer después de la alimentación con productos alimenticios específicos con un efecto prebiótico (Roberfroid *et al.* 2010). Algunos de esos estudios, demostraron que en tales condiciones la composición de la microbiota intestinal fue modificada (debido a un incremento en la concentración de *Bifidobacterias*).

Datos recientes de modelos experimentales y de estudios en el ser humano soportan el efecto benéfico de alimentos con propiedades prebióticas sobre la regulación de la saciedad y ganancia

de peso corporal y sostienen la hipótesis de que la composición de la microbiota intestinal (especialmente el número de *Bifidobacterias*) puede contribuir a modular procesos metabólicos asociados con obesidad y diabetes tipo 2 (Roberfroid *et al.* 2010). Es posible, aunque no exclusivo, que estos efectos estén asociados en cambios a la microbiota, y es probable concluir que sus mecanismos se ajustan dentro del efecto prebiótico.

Por sus atributos positivos las *Bifidobacterias* y los *Lactobacillus* son los organismos probióticos más frecuentemente utilizados, ya que fermentan sustancias que no pueden ser digeridas por el huésped en la parte intestinal superior. Estos incluyen almidones resistentes, carbohidratos no digeribles, oligosacáridos, otros carbohidratos y proteínas/aminoácidos, inulina y oligofructosa. Los dos últimos, son cada vez más usados en el desarrollo de nuevos productos alimenticios incluyendo bebidas y yogurt. Los 2 tipos principales de fermentación que son llevados a cabo en el intestino son la sacarolítica y la proteolítica. La fermentación sacarolítica es más favorable para el huésped que la proteolítica debido a los tipos de productos finales del metabolismo. Los principales productos del metabolismo de los carbohidratos son ácidos carboxílicos de cadena corta, acético, propiónico y butírico. El acetato es metabolizado en áreas sistémicas como músculos y se utiliza para generar ATP, mientras que el propionato puede ser transportado al hígado. El butirato es una fuente importante de energía para los colonocitos y tiene propiedades antitumorales. Los productos finales de la fermentación proteolítica, por el contrario, incluyen metabolitos tóxicos (por ejemplo, ciertos compuestos fenólicos, aminas y amonio), algunos de los cuales son carcinógenos. Algunos componentes del microbiota intestinal humana juegan un rol en los trastornos intestinales. Por el contrario, las bacterias benéficas pueden reducir el riesgo de enfermedades a través de la inhibición de patógenos y la producción de sus metabolitos.

La microbiota intestinal residente puede dividirse en benigna, y potencialmente perjudicial, aunque ciertos géneros contienen especies pertenecientes a los dos grupos, por ejemplo, el género *Bacteroides* puede ser sacarolítico (benéfico) o proteolítico (potencialmente nocivo). El metabolismo bacteriano puede dar lugar a una serie de efectos positivos, incluyendo la producción de vitaminas, la modulación del sistema inmune, mejora la digestión y la absorción, inhibición de especies nocivas, y eliminación de sustancias cancerígenas y otras toxinas. Los efectos negativos incluyen la producción de toxinas y carcinógenos, estreñimiento o diarrea, daño al hígado, predisposición hacia desordenes intestinales, y putrefacción intestinal. Más específicamente, la microbiota residente se sabe que contiene patógenos que, si se les permite crecer demasiado, pueden interrumpir la función intestinal normal y predisponer hacia desordenes (Gibson *et al.* 2008).

En la actualidad todos los prebióticos son descritos como carbohidratos de cadena corta con un grado de polimerización de entre dos y aproximadamente 60 y no son digeribles por el humano o enzimas digestivas animales.

Un prebiótico debe ser capaz de alterar la microbiota del huésped hacia una microbiota más saludable. Como prebióticos se han clasificado los oligosacáridos no digeribles (ONDs), dentro de los que se encuentran la inulina, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), soya-oligosacáridos (SOS), xilooligosacáridos (XOS), pirodextrinas e isomaltooligosacáridos (IMO) (Muñoz, 2011). La Tabla 2 presenta características generales de estos ONDs.

**Tabla 2. Características generales de los ONDs más comunes.**

Nombre	Composición	Método de Manufactura	Grado de polimerización
Inulina	$\beta(2-1)$ fructanos	Extraído de la raíz de achicoria	11-65
FOS	$\beta(2-1)$ fructanos	Transfructosilación de sacarosa ó hidrólisis de inulina de achicoria.	2-10 3-5
GOS	Oligo-galactosa (85%) con glucosa y lactosa	Producido por la $\beta$ -galactosidasa usando lactosa como sustrato	2-5
SOS	Mezcla de rafinosa (fructosa-galactosa-glucosa) y estaquiosa (fructosa-galactosa-galactosa-glucosa)	Se extrae de la harina de soya	3-4
XOS	Xilosas unidas por enlaces $\beta(1-4)$	Hidrólisis enzimática del xilano	2-4
Pirodextrinas	Mezcla de glucosa y oligosacáridos	Pirolisis del almidón de papa o maíz	Varios
IMO	$\alpha(1-4)$ glucosas y ramificaciones $\alpha(1-6)$ de glucosa	Transgalactosilación de maltosa	2-8

Fuente: Muñoz, 2011.

## 1.2 Carbohidratos

Es conocido que los carbohidratos en la dieta que escapan a la digestión en el tracto gastrointestinal alto, forman los sustratos predominantes para el crecimiento bacteriano en el colon. Los almidones resistentes, no son hidrolizados por las amilasas pancreáticas, pero pueden ser metabolizados por enzimas producidas por bacterias, por ejemplo, de *Clostridia saccharolítica*, *Bacteroides* y *Bifidobacteria*. Polisacáridos diferentes a almidones como celulosas, hemicelulosas, pectinas y gomas, pueden también ser fermentadas en el intestino grueso. Otros azúcares tales como lactosa, rafinosa, sorbitol y xilitol pueden contribuir también al grupo de los carbohidratos fermentables. El metabolismo de esos carbohidratos produce una variedad de productos tales como ácidos carboxílicos de cadena corta (por ejemplo, acetato, propionato y

butirato) gases ( $H_2$ ,  $H_2S$ ,  $CO_2$  y  $CH_4$ ) y ácidos orgánicos (lactato, succinato y piruvato) (Roberfroid *et al.* 1998). Esos efectos pueden variar los efectos sobre la salud del huésped.

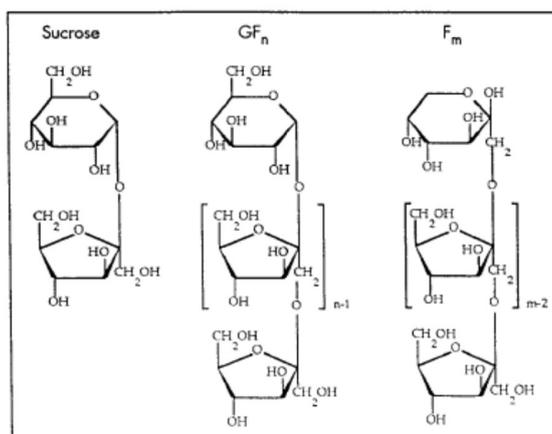
Un oligosacárido está caracterizado por el número, tipo, y secuencia de monosacáridos. En promedio 10 unidades monoméricas son contenidas en la cadena, la cual puede ser lineal o ramificada. Los oligosacáridos que no son hidrolizados por enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal alto no son digeribles y llegan intactos al colon. Los oligosacáridos no digeribles incluyen los que contienen fructosa, glucosa, xilosa y galactosa (Roberfroid *et al.* 1998).

### 1.2.1. Fructanos

Los fructanos extraídos de la raíz de achicoria han sido autorizados como ingredientes de alimentos en todos los países europeos también como en Estados Unidos, Canadá y Japón. Las propiedades nutricionales y biológicas de esos ingredientes alimenticios incluyen efectos de fibra dietaria, estimulación selectiva del crecimiento de *Bifidobacterias* en el colon, modulación sistemática del metabolismo de lípidos y futuro potencial como azúcares de baja energía o sustitutos de grasa (Roberfroid *et al.* 1998).

Cualquier ingrediente que entra al intestino grueso es un candidato a prebiótico. Sin embargo, para ser efectivo, la fermentación selectiva por la microbiota colónica es crucial. La inulina de achicoria y los productos de esta hidrólisis enzimática son mezclas de fructanos con enlaces  $\beta$  2-1 de los tipos  $GF_n$  y  $F_m$ , como se muestra en la Figura 1.

**Figura 1. Estructura química de varios fructo oligosacáridos. G glucosa F fructosa, n o m indica el número de fructosa en las moléculas.**



Fuente: Roberfroid *et al.* 1998.

En estudios previos han utilizado la inulina que es manufacturada por ORAFTI como Raftiline, esta contiene 92% de fructooligosacáridos, casi exclusivamente > 98% del tipo GF<sub>n</sub>, con un promedio de grado de polimerización de 10 unidades de hexosa.

Los fructanos de inulina tienen un valor calórico bajo, son seguros y, en general, se toleran bien hasta un nivel de 20 g / d. Ejercen efectos directos en el intestino y la microbiota intestinal que se describen como bifidogénicos, estos dan mejora a los hábitos intestinales y a la función intestinal en sujetos estreñidos, aumento de la absorción colónica de minerales (Ca y Mg) y secreción de hormonas de saciedad. Los fructanos de inulina también producen efectos indirectos que alteran los lípidos sanguíneos, el contenido mineral óseo, el sistema inmunológico y la homeostasis energética. Aun se discuten estos temas y se argumenta que las investigaciones a futuro serán particularmente en las áreas de homeostasis energética e inflamación sistémica de bajo grado en relación con los cambios en la composición de la microbiota intestinal (Schaafsma & Slavin, 2014).

### **1.2.2. Glucanos**

Las formas poliméricas de la glucosa (glucanos) constituyen la mayor reserva de carbohidratos no estructurales en todos los campos de la biología. Se almacena en distintas formas en las bacterias (dextranos), los animales (glucógeno) y las plantas (básicamente como almidón) (García, 2006).

Evidencias *in vitro* e *in vivo* sugieren que los  $\beta$ -glucanos pueden ser usados como prebióticos debido a su capacidad de promover el crecimiento de microorganismos benéficos de la microbiota intestinal como los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Un ensayo clínico, aleatorizado y en doble ciego realizado en 52 adultos sanos de 39 a 70 años mostró que el consumo de 0,75 g de  $\beta$ -glucanos de cebada por porción de torta durante 30 días aumentaba las poblaciones fecales de bifidobacteria, comparado con los controles. Estas diferencias fueron mayormente marcadas en los sujetos de más de 50 años, siendo su consumo muy bien tolerado (Pizarro *et al.* 2014). Otro estudio evaluó el consumo diario de 3 g de  $\beta$ -glucano de cebadas en 125 g de pan durante 3 meses en sujetos colectomizados; se observó también una modulación de la microbiota intestinal, con una reducción significativa del recuento de coliformes totales, en comparación con el periodo basal. Asimismo, hubo un incremento significativo de los ácidos grasos volátiles

(butirato y acetato) en el grupo tratado, registrándose además menores puntuaciones de distensión y dolor abdominal a partir del día 30 de intervención (Pizarro *et al.* 2014).

### 1.2.2.1 Gluco-oligosacáridos

Existe un mercado emergente de oligosacáridos funcionales para su uso en alimentos, actualmente la tecnología para la producción de oligosacáridos está limitada a la extracción de fuentes de plantas, hidrólisis ácida o enzimática de polisacáridos o síntesis por reacciones de transglicosilación. Los oligosacáridos pueden también ser producidos usando una fermentación de *Leuconostoc* y limitando el tamaño del polímero por adición de maltosa. Los oligómeros producidos por este proceso son fácilmente catabolizados por *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*, pero no son fácilmente utilizados por *Salmonella* sp o *Escherichia coli*, apuntando hacia su uso en la modificación de la microbiota intestinal (Chung & Day, 2002).

Con la creciente demanda que se ha presentado en los últimos años, se espera que el valor de mercado de los ingredientes prebióticos alcance los 5,5 millones de dólares EE.UU. en 2020. Existe una gran necesidad de desarrollar tecnología eficiente para la producción económica de oligosacáridos prebióticos para satisfacer las necesidades del mercado global (Tingirikari, Gomes & Rodríguez, 2017).

Aunque hay muchos carbohidratos que se están investigando por su potencial prebiótico, se han acumulado datos in vitro recientes en torno a los  $\alpha$ -gluco-oligosacáridos como candidatos interesantes, sin embargo, muchos de estos están no disponibles comercialmente en la actualidad. Un estudio in vitro que utilizó cultivos fecales de una preparación comercial de gluco-oligosacáridos mostró aumentos en bifidobacterias y bacteroides y arrojó una disminución en *Faecalibacterium prausnitzii*, esto ha generado un gran interés debido a sus propiedades antiinflamatorias (Rastall, 2013).

Se ha investigado in vitro la selectividad de la fermentación de una fuente comercial de  $\alpha$ -gluco-oligosacáridos, en donde un estudio consistió en la fermentación por bacterias fecales de cuatro adultos sanos delgados y cuatro obesos, se determinó en cultivos fecales anaeróbicos con pH controlado, se utilizó inulina como control prebiótico positivo. Se obtuvieron muestras a las 0, 10, 24 y 36 h para la enumeración bacteriana mediante hibridación in situ fluorescente y análisis de ácidos grasos de cadena corta. Los  $\alpha$ -gluco-oligosacáridos aumentaron significativamente la

población de *Bifidobacterium* sp. en comparación con el control. Otros grupos bacterianos no se vieron afectados con la excepción de un aumento en el grupo Bacteroides-Prevotella y una disminución en *Faecalibacterium prausnitzii* tanto en los  $\alpha$ -gluco-oligosacáridos como en la inulina en comparación con el valor inicial. La fermentación de  $\alpha$ -gluco-oligosacáridos produjo menos gas total a una tasa de producción más gradual que la inulina. No se detectaron diferencias significativas al inicio del estudio (0 h) entre los individuos delgados y obesos en ninguno de los grupos de bacterias fecales estudiados (Sarbini *et al.* 2012).

### **1.3 Bipolímero Bilac®**

El biopolímero Bilac®, es un  $\alpha$  – glucano de alta pureza, estable a condiciones extremas de pH y a altas temperaturas. Es un gluco-oligosacárido (GOS) con una pureza superior al 99% en base seca. Este ingrediente corresponde a una sacarosa modificada reconocida como GRAS (generally recognized as safe).

Los nuevos ingredientes prebióticos presentan la característica de ser estables a condiciones extremas de procesamiento, incluyendo altas temperaturas y valores bajos de pH. Esto, a su vez, abre un mercado estable para los prebióticos para ser utilizados en una aplicación simbiótica. De igual forma estos nuevos ingredientes prebióticos que vienen en forma de polvo, y son altamente solubles, presentan propiedades texturales y sensoriales deseables. Por ello posibles aplicaciones para los nuevos prebióticos son las formulaciones para lactantes, alimentos para bebés, bebidas funcionales y suplementos.

Se han desarrollado estudios bioquímicos del biopolímero Bilac® en ratas sobre los efectos relacionados con el perfil lipídico y la glucosa sanguínea y estudios fisiológicos relacionados con el tiempo de tránsito intestinal, de igual forma se han realizado ensayos de toxicidad que permitieron determinar que el biopolímero Bilac® presenta una toxicidad similar a la sacarosa (6).

#### **1.3.1 Caracterización Química**

Bilac® es un biopolímero de glucosa, obtenido por tecnología de enzimas a partir de la sacarosa. El complejo enzimático empleado presenta dos tipos de actividad, hidrolítica y de transferencia (Ficha técnica Bilac, 2010).

- **Estructura Molecular**

El biopolímero Bilac® está conformado por unidades monoméricas del tipo  $\alpha$ -D glucopiranosil (2→6) glucopiranososa. El tipo de enlace ( $\alpha$  2→6) lo diferencia de otros biopolímeros de glucosa como goma xantana ( $\alpha$  1-4), almidón ( $\alpha$  1→4, y  $\alpha$  1→6), dextrana ( $\alpha$  1→6), celulosa ( $\beta$ 1→4) entre otros.

- **Peso Molecular**

Es un biopolímero con peso molecular promedio aproximado de 850.000 Da.

- **Solubilidad**

El biopolímero Bilac® es hidrosoluble, formando dispersiones homogéneas tipo hidrogel. Forma soluciones homogéneas en agua en concentraciones (peso/volumen) hasta del 20%. Es característica la forma de hidratación.

- **pH**

Una solución, con una concentración de 10 g/l del biopolímero en agua destilada, presenta un valor de pH de 6.6, medida a una temperatura de 22°C. El biopolímero es estable, así: en condiciones de hidrólisis ácida (ácido oxálico 2% y ácido clorhídrico al 30% por 1 hora, a 80°C), y en condiciones de hidrólisis básica (NaOH 5N, por 1 hora, a 100°C).

- **Estabilidad Térmica**

El biopolímero mantiene su integridad química y física hasta alcanzar una temperatura de 180°C, donde presenta su punto de fusión y descomposición.

- **Absorción de Humedad**

La capacidad de absorción de agua oscila entre 60 y 150 mg de agua por gramo de biopolímero, dependiendo de la humedad relativa a la cual este expuesto en el almacenamiento; esto lo hace un material ligeramente higroscópico (Ficha técnica Bilac®, 2010).

- **Compatibilidad con Biopolímeros y Plastificantes**

El biopolímero Bilac® es compatible con biopolímeros solubles en agua, formando mezclas homogéneas con gelatina, carragenina, almidones modificados, peptinas, carboximetil celulosa (CMC) y goma xantana. Forma mezclas homogéneas con glicerol, manitol, sorbitol, sacarosa, glucosa y fructosa. Forma películas rígidas y flexibles empleando diferentes formulaciones con plastificantes (Ficha técnica Bilac®, 2010).

- **Composición Nutricional**

La composición nutricional del biopolímero se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3. Análisis nutricional del biopolímero Bilac®**

Componente	%	Método de análisis
Agua	9.96	A.O.A.C. 932.12 gravimetría
Proteína	1.42	A.O.A.C. 920.152 Kjeldahl
Carbohidratos	84.74	
Minerales	1.51	A.O.A.C. 940.26
Fibra dietaria total (FDT)	86.17	A.O.A.C. 985.29
Fibra dietaria insoluble (FDI)	1.37	A.O.A.C. 1991.42
Fibra dietaria soluble (FDS)	84.79	FDT – FDI = FDS.

Fuente: Ficha técnica Bilac®, 2010.

## 1.4 Probióticos

La definición inicial de los probióticos propuesta en 1965 se refería a sustancias secretadas por los microorganismos que estimulan el crecimiento de otros (en oposición a los “antibióticos”). Tiempo después el término prebiótico hizo referencia a un preparado o a un producto que contiene cepas de microorganismos viables en cantidad suficiente como para alterar la microbiota en algún compartimento del huésped (por implantación o colonización) y que produce efectos beneficiosos en dicho huésped. La definición incluye bien productos que contienen microorganismos (por ejemplo, leches fermentadas) o un preparado de microorganismos (por ejemplo, comprimidos o polvos) (Oliveira G & González, 2007).

Recientemente, los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que siendo administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio sobre la salud del huésped (WHO, 2020).

Muchos organismos probióticos son *Lactobacilos* o *Bifidobacterias* los cuales son habitantes normales del intestino humano. La eficacia de los probióticos ha sido demostrada para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, infecciones respiratorias y síntomas de alergia. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más utilizadas como probióticos, pero también se utiliza la levadura *Saccharomyces boulardii* y algunas de las especies *E. coli* y *Bacillus* (Guarner *et al.* 2017). Entre los agentes nuevos también se incluyen *Clostridium butyricum*, aprobado como alimento nuevo en la Unión Europea. Las bacterias ácido lácticas, como la especie *Lactobacillus*, que han sido utilizadas para la conservación de alimentos por fermentación durante miles de años, pueden actuar como agentes fermentadores de alimentos

y, además, son potencialmente beneficiosos para la salud. Sin embargo, el término “probiótico” debería reservarse para los microbios vivos que han demostrado ser beneficiosos para la salud en estudios controlados en humanos. La fermentación se aplica a nivel mundial en la conservación de varias materias primas agrícolas (cereales, raíces, tubérculos, frutas y hortalizas, leche, carne, pescado, etc.) (Guarner *et al.* 2017).

La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies de *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales (Gonzales, Gómez & Jiménez, 2003).

Dentro de algunos de los mecanismos de acción de los probióticos se pueden mencionar los efectos relacionados con la influencia sobre la microbiota del huésped y las bacterias patógenas, producción de sustancias antibacterianas, efecto sobre la exclusión competitiva de bacterias patógenas, inducción en la producción de defensinas, efecto favorable sobre la función de barrera intestinal y modulación de la función inmune del huésped.

Los efectos benéficos atribuidos a los probióticos y a los prebióticos se dividen en varias áreas con distintos grados de apoyo experimental (Ortega *et al.* 2002):

- Intolerancia a la lactosa: hay evidencias de que los organismos presentes en el yogurt, atenúan los síntomas de la intolerancia a la lactosa en individuos deficientes en lactasa. Este efecto se debe a que las bacterias productoras del ácido láctico presentes en el yogurt incrementan la actividad de la lactasa en el intestino delgado (Ortega *et al.* 2002). *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* mejoran la digestión de la lactosa y reducen los síntomas relacionados con su intolerancia.
- Tratamiento de la diarrea aguda: Algunas cepas probióticas actúan reduciendo la gravedad y la duración de la diarrea infecciosa aguda en niños. La administración oral acorta la duración de la enfermedad diarreica aguda en niños aproximadamente 1 día. Varios metaanálisis de ensayos clínicos controlados sobre otras cepas probióticas muestran resultados consistentes, sugiriendo que los probióticos probablemente sean seguros y eficaces. Sin embargo, los mecanismos de acción pueden ser específicos para cada cepa (Guarner *et al.* 2017).
- Prevención de la diarrea asociada a antibióticos: existen fuertes evidencias de eficacia en adultos o niños que están recibiendo antibióticos (Guarner *et al.* 2017).

- Estreñimiento y tiempo de tránsito: los yogures enriquecidos con otros probióticos parecen ser más efectivos en sujetos de edad avanzada con estreñimiento y muestran mejoras sobre el tiempo de tránsito (Ortega *et al.* 2002).
- Respuesta inmunitaria: Existe evidencia que sugiere que varias cepas probióticas y el prebiótico oligofructosa son útiles para mejorar la respuesta inmunitaria. Se han obtenido evidencias de mejoras en las respuestas inmunitarias en estudios dirigidos a prevenir enfermedades infecciosas agudas (diarrea nosocomial en niños, episodios invernales de influenza) y estudios que analizaron las respuestas de anticuerpos a vacunas (Guarner *et al.* 2017).
- Enfermedad intestinal inflamatoria (EII):
  - Pouchitis o reservoritis: Existe una buena evidencia de la utilidad de ciertos probióticos en la prevención de un primer episodio de pouchitis y en la prevención de futuras recaídas de la pouchitis después de inducir la remisión con antibióticos. Se pueden recomendar probióticos a los pacientes con pouchitis de actividad leve, o como tratamiento de mantenimiento para aquellos pacientes que estén en remisión (Guarner *et al.* 2017).
  - Colitis ulcerosa: Algunos probióticos han demostrado ser seguros y tan eficaces como la terapia convencional para mejorar las tasas de respuesta y remisión en la colitis ulcerosa de leve a moderadamente activa, tanto en poblaciones adultas como pediátricas.
- Síndrome de intestino irritable (SII): Los estudios publicados muestran una reducción de la distensión abdominal y la flatulencia como resultado de tratamientos probióticos; algunas cepas pueden aliviar el dolor y dar un alivio general. La literatura sugiere que ciertos probióticos pueden aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida en pacientes con dolor abdominal funcional (Guarner *et al.* 2017).
- Enterocolitis necrotizante: La suplementación con probióticos reduce el riesgo de enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros. Los metaanálisis de ensayos controlados aleatorizados también han mostrado una reducción del riesgo de muerte en grupos tratados con probióticos, aunque no todas las preparaciones probióticas probadas son efectivas.
- Muchos estudios han demostrado que los probióticos pueden reducir la vaginosis bacteriana, prevenir la dermatitis atópica en los lactantes, reducir los patógenos orales y las caries dentales y reducir la incidencia y duración de las infecciones comunes del tracto respiratorio superior. El beneficio neto de los probióticos durante el período perinatal previniendo enfermedades alérgicas ha llevado a una recomendación de la Organización Mundial de Alergia sobre el uso de probióticos durante el embarazo, la lactancia materna y el destete en

familias con alto riesgo de enfermedad alérgica. También se están probando probióticos y prebióticos para la prevención de algunas manifestaciones del síndrome metabólico, incluyendo exceso de peso, diabetes tipo 2 y dislipidemia (Guarner *et al.* 2017).

Las funciones tanto de probióticos como de prebióticos están entrelazadas con los microorganismos que colonizan al ser humano. Los prebióticos sirven como fuente de alimento para los miembros beneficiosos de la comunidad de microorganismos comensales, promoviendo así la salud. La interacción entre los probióticos y las células anfitrionas, o los probióticos y los microorganismos residentes, ofrece un medio clave para influir en la salud del huésped (Guarner *et al.* 2017).

## 1.5 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas (BAL)

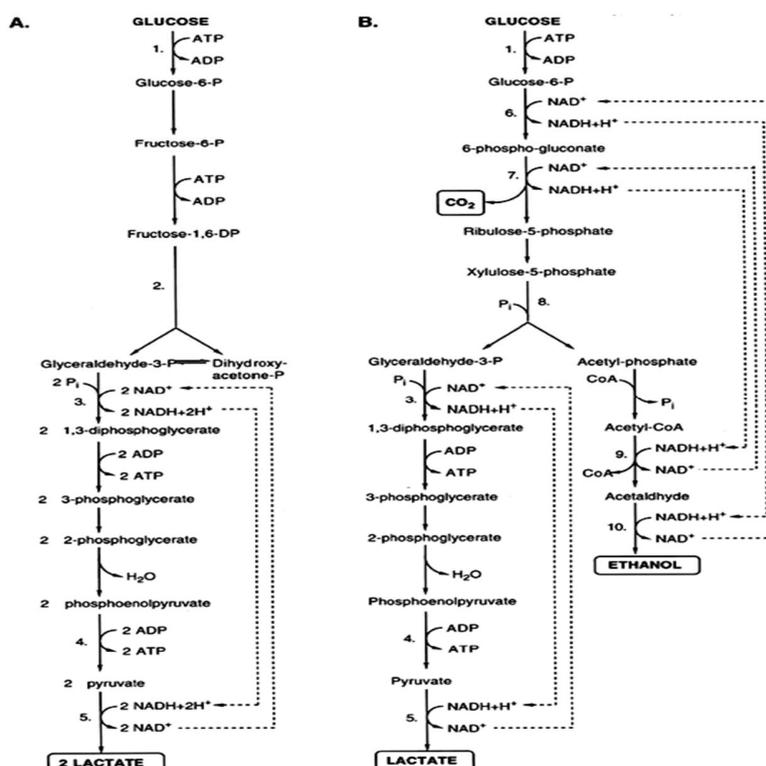
El grupo de las BAL, presenta una gran capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos afines, dando como producto predominante el ácido láctico. El transporte y la fosforilación de la glucosa puede ocurrir mediante el transporte libre y la fosforilación por una glucocinasa dependiente de ATP. En algunas especies se usa el sistema fosfoenolpiruvato: azúcar fosfotransferasa (PTS), en el cual el fosfoenolpiruvato es la molécula donadora del grupo fosforilo (Muñoz, 2011).

La principal ruta metabólica de las hexosas, por ejemplo la glucosa, es la glicólisis, o ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, usado por la mayoría de BALs. Se caracteriza por la formación de fructosa-1,6-difosfato (FDP) el cual es separado por una FDP aldolasa en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP). Luego el GAP y el DHAP son convertidos en piruvato en una secuencia metabólica que incluye la fosforilación del sustrato en dos sitios. En condiciones de exceso de azúcar y acceso limitado de oxígeno, el piruvato se reduce a ácido láctico por una lactato deshidrogenasa dependiente de NAD (nLDH). De ese modo se reoxida el NADH formado durante las etapas iniciales de la glicólisis. Dado que prácticamente el producto final del metabolismo de la glucosa es el ácido láctico, la ruta se denomina como fermentación homoláctica (Muñoz, 2011) (Ver figura 2).

La otra ruta metabólica empleada por las BALs es denominada la ruta pentosa fosfato, hexosa monofosfato, pentosa fosfocetolasa o 6-fosfogluconato fosfocetolasa (6-PG/PK). Esta ruta se caracteriza por una deshidrogenación inicial con la formación de 6-fosfogluconato, seguido por una descarboxilación. La pentosa-5-fosfato remanente es dividida posteriormente por la

fosfoacetolasa en GAP y acetil fosfato. La GAP es metabolizada de la misma forma que en la ruta de glicolisis, dando como resultado ácido láctico. Cuando no hay aceptores de electrones disponibles, el acetil fosfato es reducido a etanol vía acetil CoA y acetaldehído. Dado que en esta ruta se forman cantidades apreciables de otros productos finales ( $\text{CO}_2$  y etanol), adicionales al ácido láctico, es referida como una fermentación heteroláctica (Muñoz, 2011) (Ver figura 2). Cuando hexosas diferentes a la glucosa son fermentadas por BAL, estas entran a las rutas metabólicas descritas a nivel de glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato posterior a la isomerización y/o fosforilación. Una excepción a este procedimiento está en el metabolismo de la galactosa por las BAL, donde usa PTS para poder tomar este carbohidrato.

Figura 2. Principales rutas metabólicas de la glucosa. Ruta fermentativa homoláctica (a), y ruta fermentativa heteroláctica (b).



Fuente: Muñoz, 2011.

## 1.6 Ecología Intestinal

El término “flora intestinal” usado anteriormente, pasó a desuso desde finales de la década de los años 90s, al ser sustituido por “microbiota intestinal”, al considerar que la población bacteriana que la formaba, constituida por población bacteriana comensal, indígena o saprofita, no era solamente un conglomerado de bacterias, sino un conjunto de microorganismos vivos con acciones efectivas de importancia sobre la salud humana.

En la actualidad se reconoce a la “microbiota intestinal” como la población de microorganismos que habitan en el intestino y ayudan a digerir y asimilar los nutrientes que son ingeridos, incluido vitaminas, fibras y azúcares, lo que evidencia la activa participación de sus constituyentes. El mayor número se localiza en la porción distal del tubo digestivo, en el colon (Castañeda, 2017). El concepto de “Ecosistema Intestinal” desarrollado desde la década de los años 60s del pasado siglo presenta una interrelación entre la regulación cualitativa de la microbiota intestinal y su microbioma, expresado en las interacciones a que están sometidos los microorganismos que la constituyen, los sustratos digestivos y el sistema inmune; que representa un elemento de trascendencia para la comprensión de la fisiología del intestino y ha permitido que la microbiota intestinal sea interpretada como un “órgano metabólico” (Castañeda, 2017).

El intestino humano constituye el hábitat natural de bacterias, que han evolucionado y se han adaptado al ecosistema intestinal desde hace milenios. Este ecosistema se conoce como flora intestinal pero también se utiliza el término de microbiota, que se define como la colectividad de comunidades microbianas que habitan las superficies mucosas. Cada individuo alberga aproximadamente 100 billones de bacterias de unas 400 especies distintas. Más del 95% de esta población de bacterias vive en la luz del colon. En conjunto la población viva del colon puede alcanzar un peso variable entre 300 y 600 gramos (Ortega *et al.* 2002). La presencia de bacterias vivas en la luz del colon tiene un impacto importante en la fisiología del individuo.

### 1.6.1 Composición de la Microbiota

A finales del pasado siglo XX se postulaba que la microbiota intestinal estaba constituida entre 500 y 1000 microorganismos, sin embargo, los estudios más recientes realizados con técnicas de biología molecular han determinado que está formada entre 15.000 a más de 35.000 especies, según el método seguido (Castañeda, 2017).

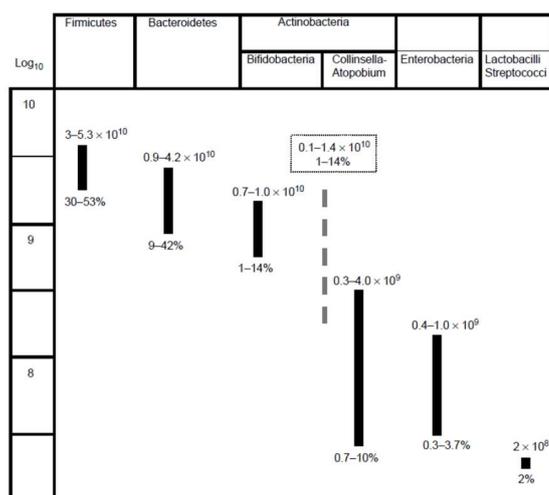
La microbiota intestinal se comienza a adquirir inmediatamente después del nacimiento. Inicialmente diversos géneros de aerobios colonizan el tubo digestivo, sobre todo enterobacterias

tipo *Escherichia coli* y también diversas especies del género *Lactobacillus*. Estas consumen el oxígeno del ambiente y se establece progresivamente un microsistema en el que hay un predominio de especies anaerobias obligadas sobre todo *Bacteroides*, *Clostridia*, *Eubacteria* y *Bifidobacteria*. A los dos años de edad la microbiota establecida es prácticamente definitiva, ya que suele ser muy estable a lo largo de la vida del individuo (Ortega *et al.* 2002).

En la microbiota del individuo adulto predominan géneros anaerobios. Con los métodos de cultivo tradicionales, pueden reconocerse modificaciones transitorias en la composición de la microbiota derivadas del uso de antibióticos o en relación a cambios dietéticos pero son cambios reversibles. Algunas especies bacterianas no son cultivables. Los métodos de biología molecular ofrecen una tecnología muy útil para superar estas limitaciones y avanzar en los conocimientos sobre la microbiota (Ortega *et al.* 2002). Estudios recientes (Roberfroid *et al.* 2010) (Gison & Roberfroid, 2008) (Tuohy *et al.* 2003) basados en el análisis del genoma bacteriano han identificado una gran proporción de cepas bacterianas que no habían sido descritas, y además se sugiere que cada individuo alberga cepas genéticamente únicas y distintas de las de otros individuos.

La identificación de nuevos filos, grupos y especies de microorganismos previamente no accesibles a los métodos basados en cultivo se muestran en la Figura 3. Basados en análisis taxonómicos de filos y grupos, la flora fecal humana dominante está compuesta de 3 filos: *Firmicutes*, *Bacteroides* y *Actinoacteria*, que representan el 75% de toda la microbiota y los grupos subdominantes son *Enterobacteriaceae*, *Streptococci* y *Lactobacilli* (Gison & Roberfroid, 2008).

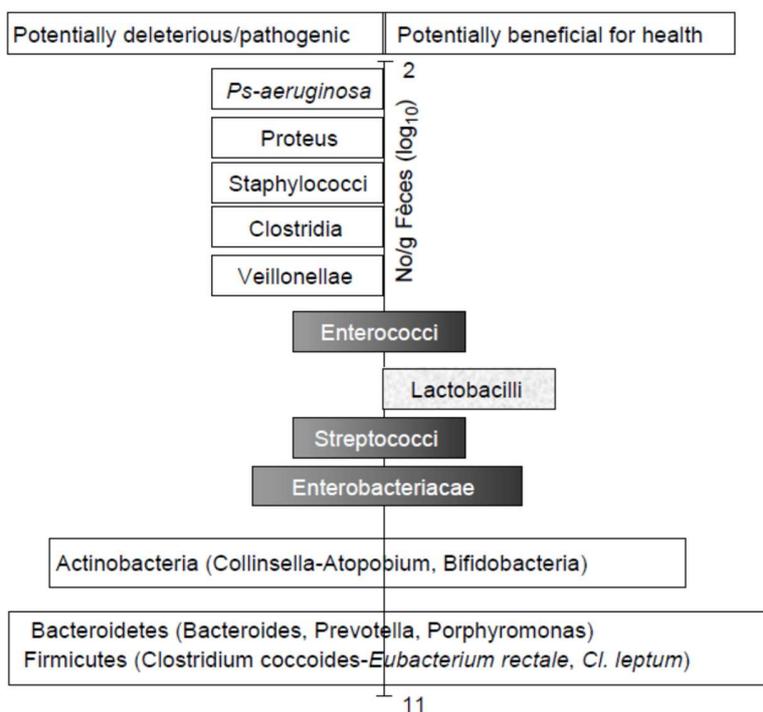
**Figura 3. Cuantificación de la Microbiota predominante en humanos, como resultado del análisis de filos y grupos.**



Fuente: Gison & Roberfroid, 2008.

Con el fin de mejorar las interacciones microbianas en el colon y en consecuencia la modulación colónica y la fisiología de todo el cuerpo, la microbiota del colon necesita tener una adecuada composición, en la que los filos/ grupos/ especies de bacterias que se sabe o se cree que promueven la salud predominen sobre aquellos que son o que podrían ser perjudiciales si se multiplican (Figura 4) (Gison & Roberfroid, 2008). En la figura 4 se muestra el esquema promedio de la distribución de los componentes dominantes, subdominantes, y menores de la microbiota fecal de humanos entre los grupos potencialmente nocivos (lado izquierdo) y potencialmente benéficos (lado derecho). Los filos principales dominantes: *Firmicutes*, *Bacteroides* y *Actinobacteria* son todavía difíciles de clasificar debido a la falta de conocimiento sobre las actividades de los diferentes grupos. Las *Bifidobacterias* son sin embargo, tradicionalmente clasificadas como beneficiosas para la salud. Sobre la base de datos preliminares, algunos miembros de los grupos *Eubacterium rectale* y *Cl. leptum* pueden clasificarse en el lado derecho del esquema.

**Figura 4. Esquema de la distribución de los componentes dominantes, subdominantes, y menores de la microbiota fecal de humanos entre grupos potencialmente nocivos (lado izquierdo) y potencialmente benéficos (lado derecho).**



Fuente: Gison & Roberfroid, 2008.

## 1.6.2 Funciones de la Microbiota Intestinal

Las funciones de la microbiota intestinal son metabólicas, tróficas y de protección. Funciones de metabolismo y de nutrición: como resultado de la actividad bioquímica de la microbiota. Fermentación de residuos no digestivos de la dieta y moco intestinal. Energía, con producción de ácidos carboxílicos de cadena corta, producción de vitamina K y ácido fólico, absorción de iones.

Funciones Tróficas: Control de la proliferación celular epitelial intestinal y su diferenciación.

Funciones de Protección: Efecto de barrera, protección contra los antígenos y prevención contra la invasión de microorganismos patógenos. Efecto sobre el desarrollo y la modulación del sistema inmune.

Las bacterias del colon generan una gran actividad metabólica, la principal función es la fermentación de los residuos de la dieta no digeribles y del moco producido por el epitelio intestinal (Ortega *et al.* 2002). La fermentación de carbohidratos da lugar a la generación de ácidos carboxílicos de cadena corta que tienen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal. La producción de ácido butírico constituye la principal fuente de energía para el epitelio del colon. La producción de ácido acético y propiónico interviene en la regulación del metabolismo hepático de la glucosa, reduce la glucemia postandrial y la respuesta insulínica (Ortega *et al.* 2002).

La microbiota residente en el tubo digestivo protege de la invasión de microorganismos patógenos por el llamado efecto barrera. Esta propiedad de la microbiota es muy relevante para la prevención de patologías infecciosas en el huésped.

Existe la posibilidad de mejorar la salud en Europa y en el mundo a través de la nutrición. Por consiguiente, ha aumentado la demanda de alimentos que mejoran el estado de salud llamados también alimentos funcionales. Un alimento funcional puede definirse como un ingrediente o suplemento alimentario que aporta un beneficio funcional adicional específico (fisiológico o psicológico) a su valor nutricional básico (Ortega *et al.* 2002).

En los años recientes el uso de alimentos funcionales, especialmente aquellos que contienen cultivos viables de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, llamados probióticos ha incrementado. Estas bacterias residen naturalmente en el intestino grueso. Aunque el mecanismo de acción no es entendido del todo la evidencia disponible indica que la ingestión de bacterias probióticas puede mejorar algunos de los procesos fisiológicos del hospedero.

## 2 Problema y Justificación

En los últimos años en la población colombiana y a nivel mundial se ha incrementado el interés y el consumo de alimentos conocidos como funcionales. Estos alimentos además de aportar un valor nutricional aportan beneficios a la salud del consumidor. Numerosos estudios (Roberfroid et al 2010) (Wang, 2009) (Kolida & Gibson, 2007) han demostrado que el consumo de alimentos funcionales es importante en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles y en enfermedades gastrointestinales. El uso de probióticos y prebióticos en alimentos infantiles reduce el riesgo de diarreas y enfermedades gastrointestinales, las cuales son responsables de morbilidad infantil (Ortega *et al.* 2002).

En los últimos años han sido evaluados numerosos ingredientes con fines de prebióticos principalmente carbohidratos no digeribles, muchos de estos se encuentran naturalmente en plantas y frutas y otros son obtenidos por transglucosilación enzimática. Aunque se han realizado varios estudios aún se necesitan numerosos ensayos que demuestren un efecto prebiótico definitivo de los nuevos candidatos a prebióticos.

El biopolímero Bilac® es un alfa – glucano, producido por una glucosiltransferasa, y presenta un contenido en fibra soluble de 84,79%, por lo tanto, se abre la posibilidad de su uso como prebiótico. Debido a lo anterior en este estudio se buscó evaluar el efecto prebiótico del biopolímero Bilac® de acuerdo a criterios científicos reportados que deben cumplir este tipo de ingredientes para que sean catalogados como prebióticos.

El estudio de este biopolímero incluyó evaluaciones tanto *in vitro* como *in vivo* que buscaron demostrar este efecto, y por consiguiente su uso en alimentos funcionales, que puedan favorecer la nutrición y aporten beneficios a la salud en la población colombiana.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo General**

- Evaluar la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac®.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones *in vitro*.
- Evaluar el efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones *in vivo*.

## 4 Materiales y Métodos

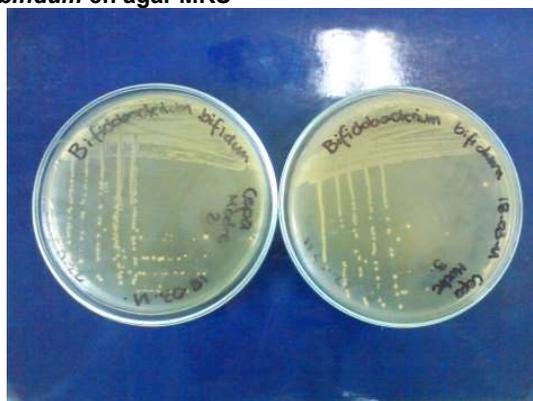
Se utilizó el biopolímero Bilac® proporcionado por el laboratorio de tecnología de enzimas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN). La inulina (fibra soluble obtenida de la raíz de achicoria, Tecnas S.A.) que se utilizó como control positivo en los ensayos, también fue proporcionada por el laboratorio en mención y la Inulina marca Tecnas S.A. Referencia 821AA. (Ficha Técnica Inulina Marca Tecnas S.A. Anexo D).

Se emplearon cepas de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, y *Lactobacillus acidophilus* provenientes del Laboratorio de tecnología de enzimas del IBUN y del laboratorio de Microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, respectivamente.

Para evaluar la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones *in vitro*: Caldo MRS (deshidratado comercial), caldo MRS modificado (se preparó por componentes y se sustituyó la glucosa por la fuente de carbono a analizar o se eliminó del medio en el caso del control negativo): Caldo MRS Bilac® 0,5%, caldo MRS Bilac 1%, caldo MRS inulina 0,5%, caldo MRS inulina 1%, Caldo MRS inulina 2%, caldo MRS sin glucosa. Igualmente se utilizó el cultivo iniciador del kumis con los microorganismos *Lactococcus Lactis* y *Lactococcus cremoris*, leche en polvo descremada.

Material: Frascos shott de 500 mL, tubos de ensayos grandes, cajas de Petri estériles, erlenmeyer de varios volúmenes, tubos de ensayo tapa rosca, cajas de Petri estériles de vidrio y desechables.

Fotografía 1. *Bifidobacterium bifidum* en agar MRS



Fuente: Elaboración propia

Fotografía 2. *Lactobacillus casei* en agar MRS



Fuente: Elaboración propia

Para evaluar el efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones *in vivo*: Recolectores de material fecal y guantes desechables para todos los voluntarios, a cada voluntario se le entregaron bolsas con kumis y galletas, adicionalmente se usaron cajas de Petri estériles, medios de cultivo específicos para *Lactobacilos*, *Bifidobacterias* y Coliformes.

#### **4.1 Evaluación de la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones *in vitro*.**

Con esta metodología se pretende comprobar si las bacterias prebióticas utilizadas en este estudio pueden utilizar el biopolímero Bilac® como fuente de carbono para sus actividades metabólicas. De igual forma con la segunda metodología se planteó incorporar el biopolímero Bilac® a un alimento en este caso una la matriz láctea para ser ofrecida a los voluntarios ya que, según la bibliografía un glucano es catalogado como prebiótico cuando cumple con estos requisitos, es decir, es utilizado por la bacterias probióticas para cumplir con sus funciones vitales y es posible incorporarlo a un alimento para que sea consumido por humanos permitiendo que de esta forma se modifique selectivamente la microbiota intestinal hacia una composición más favorable.

#### 4.1.1 Determinación del uso de biopolímero Bilac en condiciones *in vitro* por microorganismos probióticos

Se determinó el uso del Biopolímero Bilac® en condiciones *in vitro* por microorganismos probióticos, en primer lugar, se realizaron tres fermentaciones por lote, de manera independiente para cada uno de los probióticos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*. Se utilizaron cuatro medios de cultivo. Caldo MRS con glucosa al 2% (medio de cultivo comercial), caldo MRS sin glucosa con adición de Bilac® al 0.5%, al 1%, y al 2%, caldo MRS sin glucosa con adición de inulina al 0.5%, al 1% al 2%, y caldo MRS sin adición de prebiótico.

**Fotografía 3. Crecimiento de *Lactobacillus casei* y *B. bifidum* en Caldo MRS**



Fuente: Elaboración propia

El caldo MRS se preparó por componentes en los casos en los que no se utilizó caldo MRS comercial (contiene glucosa). Se utilizaron tubos de ensayo tapa rosca con poco espacio de cabeza y con una capa de aceite mineral propiciando condiciones anaeróbicas. Los tubos fueron inoculados con cultivos overnight a una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC /ml. Todos los ensayos se realizaron en condiciones estériles.

Los parámetros de crecimiento fueron monitoreados cinéticamente utilizando un espectrofotómetro. La densidad óptica se leyó a 600 nm a las 0, 4, 8, 16, 20, 24 horas de incubación a 37°C. Se realizó siembra en placa y se realizaron curvas de calibración de absorbancia y unidades formadoras de colonia. La siembra en placa se realizó en agar MRS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Se evaluó el consumo del biopolímero e inulina por medio de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y se evaluó el conteo de viables, por medio de recuento de unidades formadoras de colonia.

Adicionalmente se tomaron muestras del crecimiento de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en caldo MRS con Bilac® y en caldo MRS con glucosa, y se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) en la Universidad Nacional de Colombia para poder observar con detalle el crecimiento de estos microorganismos en estos medios de cultivo.

#### **4.1.1.1 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Los sobrenadantes de los ensayos de crecimiento de las cepas probióticas en biopolímero Bilac® al 0,5%, 1% y 2%, inulina al 0,5%, 1% y 2%, glucosa al 2%, sin adición de prebióticos, fueron obtenidos por centrifugación (6000 rpm/ 20 min) y filtrados (membranas éster de celulosa 0.22 µm de poro) para la eliminación de residuos. Los estándares utilizados fueron glucosa, fructosa, Bilac® e inulina. Las soluciones fueron analizadas por HPLC. La elución se realizó con agua HPLC a un flujo de 0,6 ml/min a 65°C. Presión 292 psi. Fase móvil Agua HPLC. (Método de azúcares, Laboratorio de tecnología de enzimas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá). Se utilizó una Columna para carbohidratos Shodex, Sugar SC-LG. SC1011. 4805004. WAT. 034238.

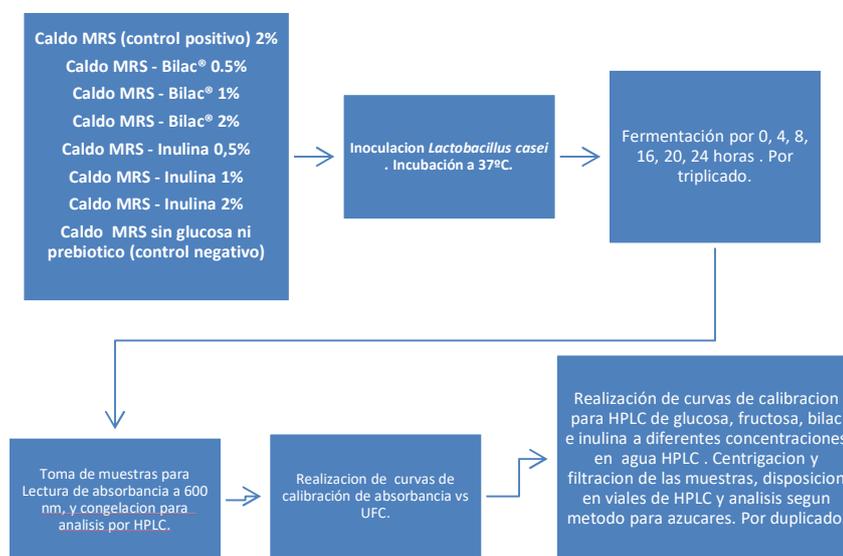
Elaboración de las curvas de calibración: Las curvas de calibración se elaboraron utilizando estándares de diferentes concentraciones; glucosa, fructosa, e inulina: 0.25%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 2.5% p/v y Bilac® 0.5, 0.4, 0.2, 0.1, 0,05 mg/ml.

El cromatógrafo utilizado fue Shimadzu Prominence, con las siguientes características: Detector RDI – 10 A, Horno de calentamiento CTO 20A, Auto sampler SIL 20A HT, Bomba LC 20 AD, Controlador CBM 20A, Desgasificador DGU 20A SR.

Los carbohidratos se determinaron con el detector de índice de refracción. Los análisis se realizaron por duplicado.

El proceso realizado en el siguiente diagrama se realizó individualmente para cada uno de los microorganismos, *L. casei*, *L. acidophilus*, *B. bifidum*.

**Figura 5. Proceso fermentación para *L. casei*.**



Fuente: Elaboración propia

#### 4.1.1.2 Observación por microscopía electrónica de barrido (SEM)

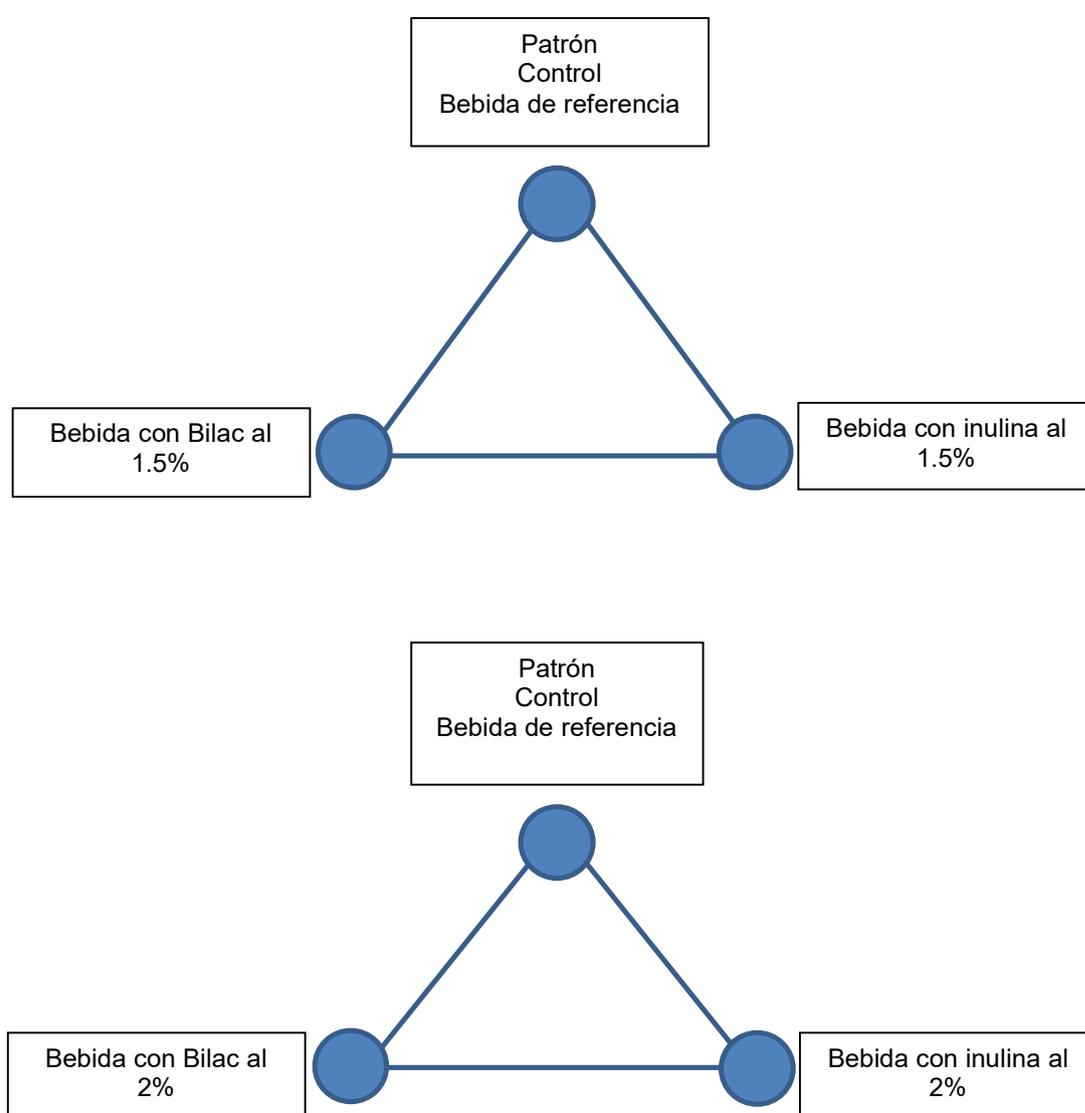
Para realizar pruebas de las estructuras y morfología de los microorganismos durante la fermentación se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM). Se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200 que consta de un cañón de electrones con su óptica, cámara de muestras, circuito de vacío, electrónica de detección y registro de imagen. Las micrografías se tomaron con el programa “xT microscope control versión 2.01 y el análisis se hizo con el programa “EDX Control Software versión 1.00”. Se tomaron muestras a las 16 horas de fermentación de *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* creciendo en MRS-glucosa utilizado como control y en Bilac 2%, se visualizaron las estructuras típicas y la morfología característica de cada género microbiano.

#### **4.1.2 Determinación de la viabilidad de bacterias probióticas en una bebida láctea fermentada con el biopolímero Bilac®**

**Ensayos previos:** Para establecer una concentración apropiada del biopolímero Bilac® en la bebida fermentada; se preparó una bebida láctea fermentada con Bilac® al 1.5% y al 2.0%; bebida láctea fermentada con inulina a las mismas concentraciones y bebida láctea fermentada

control (sin Bilac® y sin inulina). Posteriormente, se realizó una evaluación sensorial, que consistió en una evaluación triangular, en donde se disponía la bebida control, la bebida con Bilac® al 1,5%, y la bebida con inulina al 1,5%, y al lado la bebida control, la bebida con Bilac® al 2% y la bebida con inulina al 2% (ver figura 6), en este orden los participantes evaluaban sensorialmente el producto. En esta evaluación participaron 15 personas. (Laboratorio de nutrición, en la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional de Colombia). El formato de la evaluación sensorial se encuentra en el anexo E.

**Figura 6. Evaluación sensorial Triangular.**



Fuente: Elaboración propia

Adicionalmente se preparó bebida fermentada con Bilac® al 5% para observar el comportamiento del biopolímero en la leche y en la bebida fermentada a esta concentración.

#### 4.1.2.1 Viabilidad de bacterias probióticas en la bebida fermentada

Se utilizaron cepas de cultivos iniciadores, cultivos secos congelados: *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*.

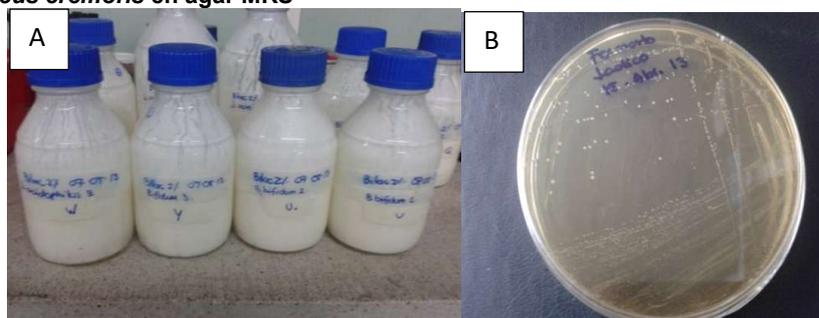
Preparación del inóculo: los cultivos secos congelados de *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris* (fermento láctico EZAL®, Rhodia food) fueron preparados por disolución en 100 ml de leche 12,5% (p/p), calentada a 90° C por 10 min. Cuando la temperatura descendió entre 30°C y 35°C se depositó el liofilizado y se mezcló. Se incubó a 30°C entre 12 a 18 horas aproximadamente. Con este pre-cultivo fueron inoculados los 500 ml de leche con Bilac® al 2%, con inulina al 2% y sin prebiótico.

Elaboración de la bebida fermentada: Se reconstituyó la leche en polvo, adicionando 12,5 g de leche en polvo en 100 g de agua destilada. A 9 frascos de 500 ml de leche se adicionó 2% (p/p) de Bilac®, a otros 9 frascos de 500 ml de leche se adicionó 2% (p/p) de inulina, y a otros 9 frascos no se adicionó ni Bilac® ni inulina. Las leches se sometieron a tratamiento térmico a 90°C por 10 minutos en baño de agua. Las leches tratadas por calor fueron enfriadas en baño de hielo e inoculadas con el pre-cultivo láctico al 2%.

Después de la inoculación del cultivo láctico, se inocularon por separado cada una de las bacterias probióticas, 9 frascos con *Lactobacillus casei*, 9 frascos con *Lactobacillus acidophilus* y 9 frascos con *Bifidobacterium bifidum* al 2%. Se realizaron fermentaciones en batch por triplicado a 30°C. Las fermentaciones fueron monitoreadas por determinaciones de pH. Una vez la fermentación de la leche se completó, la post acidificación se determinó después de 1, 7, 15 y 35 días, de almacenamiento a 4°C por mediciones de pH con potenciómetro (fotografía 4A).

Recuentos de bacterias probióticas en la bebida fermentada: Antes de seleccionar los medios de cultivo para evaluar el crecimiento de los probióticos, se realizó una prueba del fermento láctico en agar MRS, donde se determinaron los *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*, microorganismos involucrados en el cultivo para elaborar kumis, que presentaban unas colonias similares a las *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en el mismo medio de cultivo, lo cual podría involucrar un margen de error en la interpretación por tal razón se utilizaron los medios selectivos agar NNLP con TTC para *B. bifidum*, agar MRS vancomicina para *L. casei* y agar MRS Bilis para *L. acidophilus* (fotografía 4B). Los recuentos bacterianos se llevaron a cabo por triplicado después del día 1, 7, 15 y 35 de almacenamiento a 4°C en cuarto frío. Se realizaron diluciones seriadas de la bebida fermentada y las bacterias fueron contadas en las tres diluciones más apropiadas.

**Fotografía 4. A. Bebida fermentada después del almacenamiento a 4°C por 35 días. B. Colonias de *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris* en agar MRS**



Fuente: Elaboración propia

Las siembras de *Lactobacillus casei* se hicieron en agar MRS con vancomicina (1 mg/L), y las siembras de *Lactobacillus acidophilus* se hicieron en agar MRS con bilis 0,15% p/v, con incubación anaeróbica con sobres de anaerobiosis, a 37°C por 48 a 72 h, *Bifidobacterium bifidum* fue analizado en agar NNLP con TTC (sulfato de neomicina 100 mg/L, Acido nalidixico 15 mg/L, Cloruro de Litio 3g/L, TTC 25 mg/L), en condiciones de anaerobiosis (sobres de anaerobiosis) a 37°C de 48 a 72h.

Durante la fermentación se realizaron determinaciones de glucooligosacaridos y fructooligosacáridos por HPLC (tiempo 0, 8, 12, 16, y 24 horas) y determinación de acidez (tiempo 0, 8, 12, 16, y 24 horas), la acidez de la leche es valorada mediante titulación con solución valorada de hidróxido de sodio 0,1 N hasta viraje a la fenolftaleína. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 4.1.2.2 Cuantificación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Una cromatografía líquida de alta eficiencia se realizó para el análisis de carbohidratos durante las fermentaciones de la bebida láctea (tiempo 0, 8, 12, 16, y 24 horas), bebida con 2% de Bilac®, bebida con 2% de inulina y bebida control, para cada uno de los microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*.

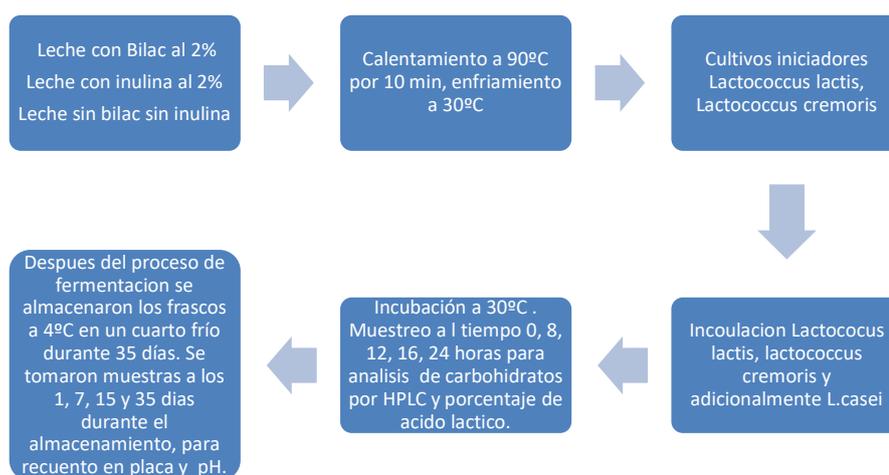
Las muestras del tiempo 0 y tiempo 8 de todas las fermentaciones se trataron con ácido tricloro acético (ATC) para precipitar proteínas de la leche. Se agregaron 130 µl de ácido tricloro acético a 4 ml de muestra de leche (tiempo 0 y 8 de fermentación), esto con el objetivo de digerir la proteína. A las muestras de bebida láctea (cuando el pH llegó a 4.5) no se le adiciono ATC; todas las muestras se centrifugaron a 6000 rpm por 20 minutos. Los experimentos se realizaron por triplicado. El sobrenadante se filtró a través de una membrana éster de celulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm, y alícuotas de 1 ml se recolectaron en viales HPLC y se analizaron.

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo HPLC. El cromatógrafo utilizado fue Shimadzu Prominence, con las siguientes características: Detector RDI – 10 A, Horno de calentamiento CTO 20A, Auto sampler SIL 20A HT, Bomba LC 20 AD, Controlador CBM 20A, Desgasificador DGU 20A SR.

Empleando una columna Shodex, Sugar SC-LG, SC1011, 4805004, bajo las siguientes condiciones: temperatura 65°C, fase móvil agua HPLC, flujo 0.6ml/min, un detector de índice de refracción. La fase móvil se filtró a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0.22µm (Método de azúcares, Laboratorio de tecnología de enzimas, IBUN, Universidad Nacional de Colombia).

Elaboración de las curvas de calibración: Las curvas de calibración se elaboraron utilizando estándares de diferentes concentraciones; glucosa, fructosa, e inulina: 0.250%, 0.5%, 1.0%, 2.0%, 2.5% p/v y Bilac® 0.5, 0.4, 0.2, 0.1, 0,05 mg/ml.

**Figura 7. Esquema metodológico para *L. casei*.**



Fuente: Elaboración propia

Este mismo procedimiento se realizó para cada uno de los microorganismos, *L. casei*, *L. acidophilus*, y *B. bifidum*.

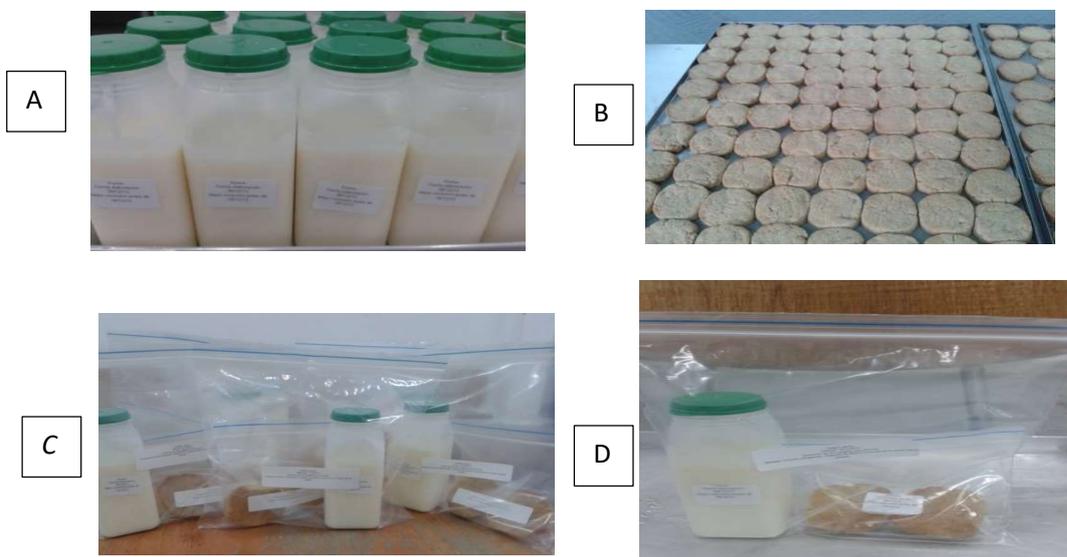
## 4.2 Evaluación del efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones *in vivo*

Uno de los parámetros más importantes a evaluar según la bibliografía es la capacidad de un compuesto de modificar de forma benéfica la microbiota intestinal, esto quiere decir que el compuesto al ser digerido por el ser humano pueda evadir la acción de las enzimas digestivas y

llegar intacto hasta el intestino donde puede ser degradado exclusivamente por las bacterias probióticas. Bajo este criterio se evaluó el efecto del Bilac® sobre la modificación del microbioma de los voluntarios, cuantificando el aumento de la cantidad de Lactobacilos y Bifidobacterias ya que estos microorganismos tienen la afinidad para utilizar este tipo de sustratos y por competencia por nutrientes y crecimiento acelerado lograr disminuir la cantidad de bacterias potencialmente patógenas o aquellas que debido a su metabolismo no generan productos benéficos para la salud del ser humano. Por lo tanto, con esta metodología se ofreció a los voluntarios kumis y galletas que contenían Bilac® y posteriormente se realizaron análisis de materia fecal de los voluntarios para evaluar los cambios en la microbiota benéfica y en la potencialmente perjudicial a través del tiempo y con un consumo continuo de los alimentos en cuestión.

La actividad prebiótica del biopolímero Bilac® fue evaluada con un estudio de alimentación humana. En el estudio participaron 20 personas, 10 hombres y 10 mujeres. Por un periodo de 14 días los dos grupos de personas consumieron 8g de Bilac® por día (2 galletas con 4g de Bilac® y kumis con 4 g de Bilac®). En el transcurso de estudio se retiraron voluntariamente 3 mujeres y 2 hombres.

**Fotografía 5. A. Bebida fermentada adicionada con 4g de Bilac®, B. Galletas con 2g de Bilac®, C. Productos semanales entregados a cada uno de los voluntarios, D. Ración diaria para cada voluntario.**



Fuente: Elaboración propia

Los voluntarios fueron seleccionados mediante una entrevista inicial, seguida de una evaluación nutricional (incluyo medidas antropométricas y anamnesis). Después de esta valoración nutricional se realizó una valoración médica general a todos los voluntarios.

Criterios de exclusión: embarazo/lactancia, participación en otro estudio prebiótico en menos de 3 meses, administración de antibióticos en los 6 meses previos, anemia, hiperlipidemia, dolencias gastrointestinales crónicas. Cualquier uso de medicamentos específicos sobre la motilidad intestinal, purgantes o laxantes de cualquier clase por 4 semanas antes al estudio.

La alimentación recomendada fue que los individuos consumieran una alimentación normal para su edad.

Selección: 20 voluntarios saludables, mayores de edad, fueron convocados dentro del estudio, 10 hombres y 10 mujeres, con un rango de edad de 18 a 47 años, y con un índice de masa corporal de  $22.4 \text{ Kg/m}^2$  ( $18,0-28,8 \text{ Kg/m}^2$ ).

El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices establecidas y todos los procedimientos en seres humanos fueron aprobados por el Comité de Ética. Todos los voluntarios firmaron el consentimiento informado escrito para la participación en el estudio y para la entrega de muestras de materia fecal.

Proceso de socialización: Se llevó a cabo con los voluntarios que participaron en el estudio, aquellos que cumplieron con los criterios de la valoración nutricional y de la valoración médica. Se procedió a:

- Informar sobre las características del trabajo, la importancia del mismo. Resolver Inquietudes.
- Dar a conocer, de manera detallada, las actividades a desarrollar por cada uno de ellos, dentro del trabajo.
- Solicitar su participación de manera voluntaria y su consentimiento, con aprobación escrita.
- En el consentimiento informado escrito las personas tuvieron conocimiento del tratamiento a realizar, la persona responsable de la recolección de las muestras tomadas y del suministro del alimento, así mismo se explicó en forma suficiente y adecuada en que consiste el tratamiento, cuáles serían sus consecuencias, ventajas, riesgos, posibles molestias que pudieran

presentarse y se permitió a las personas hacer las preguntas necesarias las cuales se respondieron en forma satisfactoria. Se señalaron que los riesgos más comunes y frecuentes del tratamiento podrían ser dolor abdominal, flatulencia, diarrea, estreñimiento, sensación de saciedad, distensión abdominal. La persona al firmar manifestó que comprendió las implicaciones del consentimiento y se encuentra en capacidad de expresarlo y dejar constancia.

El proyecto de investigación se presentó al Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y fue aprobado por el mismo.

Recomendación y compromisos durante el estudio: Se pidió a los voluntarios mantener registros semanales al inicio y durante el estudio para documentar frecuencia de las deposiciones, consistencia (estreñimiento, duro, formado, suave o diarrea), dolor abdominal (ninguno, leve, moderado o grave), flatulencia (ninguno, leve, moderado o grave) y sensación de saciedad.

A cada uno de los voluntarios se le pidió que llevara su dieta habitual sin exceder en el consumo de alimentos ricos en fibra.

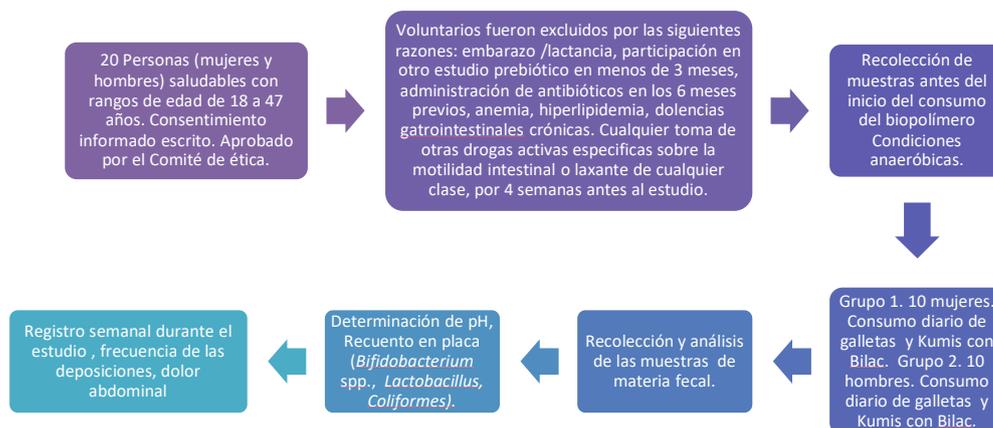
El proceso para la toma de muestras de materia fecal: a cada uno de los participantes se les proporcionaron frascos de recolección de materia fecal para exámenes de laboratorio clínico, en el cual se les pidió que recolectaran la muestra y se les explico detalladamente el proceso a seguir para la recolección de la misma durante la socialización. Inmediatamente fueron obtenidas las muestras fueron transportadas al laboratorio y se conservaron en refrigeración sin exceder las 24 horas hasta su análisis.

Se recolectó una muestra de materia fecal inicial antes del consumo del candidato a prebiótico, y cada 7 días, durante 14 días, de cada uno de los 15 voluntarios. Las muestras de materia fecal se evaluaron mediante la técnica de vertido en placa para los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y para el grupo Coliforme, y se realizaron determinaciones de pH.

Se utilizaron medios de cultivo selectivos para *Bifidobacterium* spp., para *Lactobacillus* spp, y para Coliformes. De las mismas muestras fecales se hicieron determinaciones de pH de cada una de las muestras por triplicado. Luego de la recolección de la muestra de materia fecal se realizaron diluciones seriadas con solución salina al 0,85% y se realizó la siembra en placa con los medios de cultivo selectivos: Agar MRS con vancomicina para *Lactobacillus* spp, agar NNLP

con TTC para *Bifidobacterium* spp., y Agar VRB para Coliformes, todas las siembras se realizaron por triplicado y se realizó el recuento en placa.

Figura 8. Esquema metodológico ensayo *in vivo*.



Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2.1 Análisis estadístico

Para probar el objetivo específico 1 (parte a) se utiliza un modelo completamente al azar con ocho tratamientos a saber: Bilac® 0,5%, Bilac® 1%, Bilac® 2%, inulina 0,5%, inulina 1%, inulina 2%, glucosa 2%, sin adición de carbohidrato.

Para probar los objetivos específicos 1 (parte b) y 2 se utiliza un modelo de medidas repetidas con dos factores, 1 de medida repetida: Tratamiento que está compuesto por Bilac® 2%, inulina 2%, control, y tiempo en 0, 7, 15 y 35 días; y 0, 8, 12, 16 y 24 horas. Estos modelos tienen como supuestos que el material experimental es homogéneo, el error experimental es una variable aleatoria independiente, con distribución normal, con media cero y varianza común. Los supuestos se demuestran con las pruebas indicadas para cada uno. A continuación, se especifican las hipótesis por objetivo y experimento.

**Objetivo 1 (a):** Las variables respuestas son: UFC y Concentración de consumo de sustrato.

H01: El promedio de la variable respuesta en las diferentes concentraciones de Bilac® e inulina son iguales al promedio del control.

H11: El promedio de la variable respuesta en las diferentes concentraciones de Bilac® e inulina son diferentes al promedio del control.

H02: El promedio de la variable respuesta en las diferentes concentraciones de Bilac® es igual al promedio de inulina en las diferentes concentraciones.

H12: El promedio de la variable respuesta en las diferentes concentraciones de Bilac® es diferente al promedio de inulina en las diferentes concentraciones.

H03: El promedio de la variable respuesta en las concentraciones 0.5% y 1% de Bilac® es igual al promedio de la concentración del 2% de Bilac®.

H13: El promedio de la variable respuesta en las concentraciones 0.5% y 1% de Bilac® es diferente al promedio de la concentración del 2% de Bilac®.

H04: El promedio de la variable respuesta en las concentraciones 0.5% de Bilac® es igual al promedio de la concentración del 1% de Bilac®.

H14: El promedio de la variable respuesta en las concentraciones 0.5% de Bilac® es diferente al promedio de la concentración del 1% de Bilac®.

H05: El promedio de la variable respuesta en las concentraciones 0.5% y 1% de inulina es igual al promedio de la concentración del 2% de inulina.

H15: El promedio de la variable respuesta en las concentraciones 0.5% y 1% de inulina es diferente al promedio de la concentración del 2% de inulina.

H06: El promedio de la variable respuesta en la concentración 0.5% de inulina es igual al promedio de la concentración del 1% de inulina.

H16: El promedio de la variable respuesta en la concentración 0.5% de inulina es diferente al promedio de la concentración del 1% de inulina.

H07: El promedio de la variable respuesta en el control negativo es igual al promedio del control positivo (glucosa).

H17: El promedio de la variable respuesta en el control negativo es diferente al promedio del control positivo (glucosa).

**Objetivo 1 (b):** Las variables respuestas son pH, ácido láctico y UFC.

H01: El promedio de la variable respuesta con Bilac® e inulina son iguales al promedio del control.

H11: El promedio de la variable respuesta con Bilac® e inulina es diferente al promedio del control.

H02: El promedio de la variable respuesta con Bilac® es igual al promedio de inulina.

H12: El promedio de la variable respuesta con Bilac® es diferente al promedio de inulina.

## 5 Resultados

### 5.1 Evaluación de la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones *in vitro*.

Se desarrollaron ensayos preliminares para determinar la concentración óptima de Bilac® en el medio de cultivo, teniendo en cuenta sus propiedades espesantes (Ver fotografía 6).

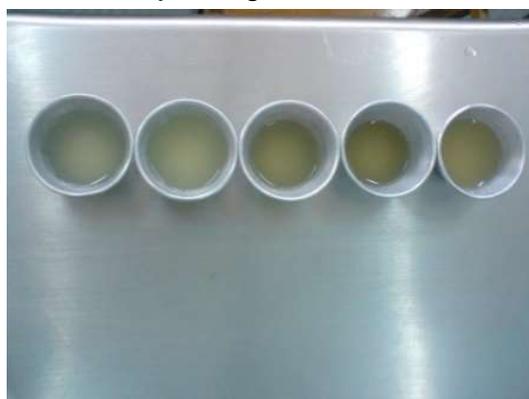
Se prepararon diferentes concentraciones de Bilac® en agua para establecer la más apropiada en el medio de cultivo, en donde se pudo comprobar que la concentración más alta para incorporar en el medio de cultivo era del 2%. Como se muestra en las fotografías 6 y 7 se establece que la mayor concentración a utilizar era del 2%.

**Fotografía 6.** Bilac® al 3% p/v, 5% y 7% en agua.



Fuente: Elaboración propia.

**Fotografía 7.** Bilac® al 2%, 4%, 6%, 8%, 10% p/v en agua.



Fuente: Elaboración propia.

- **Fermentaciones en los medios de cultivo (Caldo MRS y Caldos MRS modificados)**

La base para preparar los inóculos de este experimento fue la densidad óptica de 0.1 a 600 nm. Se debe tener en cuenta entonces que, el inóculo se estandarizó a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm correspondiente a un recuento de viables aproximado de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$ .

Para la estandarización de los inóculos se tomó en consideración que el microorganismo creciera durante 12 horas en caldo MRS sin fuente de carbono, en caldo MRS glucosa, en caldo MRS Bilac® y en caldo MRS con inulina. Al cabo de las 12 horas se ajustó la densidad óptica a 0.1. Los inóculos fueron diferentes para cada tratamiento (fuentes de carbono), porque los conteos de viables de cada uno de ellos fueron diferentes. Esto pudo deberse al cambio en la morfología celular que presentaron los microorganismos analizados en este estudio durante su crecimiento en los diferentes medios de cultivo.

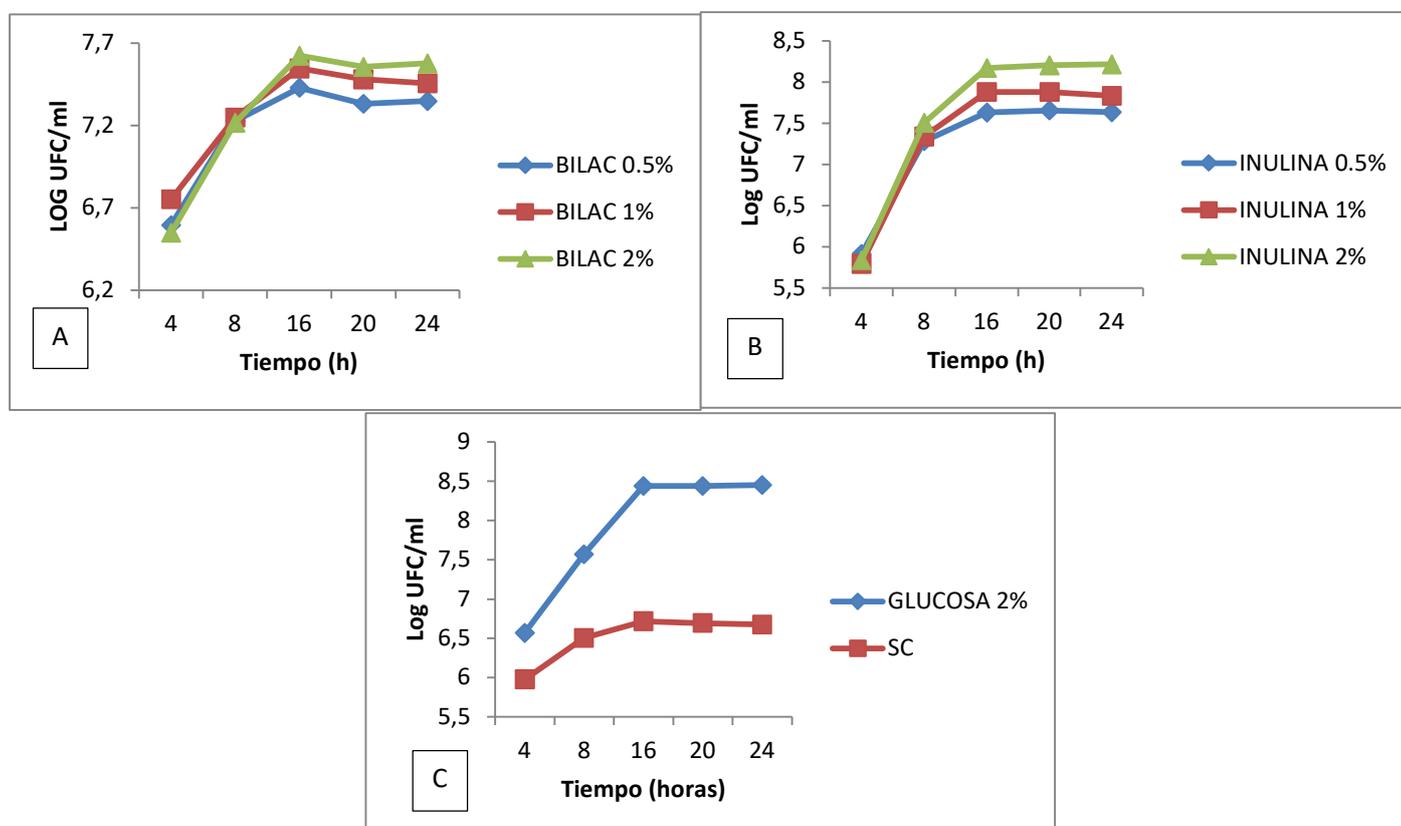
- **Fermentaciones de *Bifidobacterium bifidum*:**

El comportamiento de *Bifidobacterium bifidum* en MRS con Bilac® en diferentes concentraciones se puede observar en la figura 9.

El log UFC/ml de *Bifidobacterium bifidum* en Bilac® al 0,5% varía desde 6,59 a las 4 horas hasta 7,35 en un lapso de 24 horas, para Bilac® al 1% desde 6,75 a las 4 horas hasta 7,45 en un lapso de 24 horas, y para Bilac® al 2% de 6,54 a las 4 horas hasta 7,58 en un lapso de 24 horas. Estos resultados no muestran mayor diferencia entre las diferentes concentraciones usadas de Bilac®. En la figura 9, se observan cambios a las 16, 20 y 24 horas, entre concentraciones, mostrando un leve incremento en el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* con Bilac® al 2%.

En la Figura 9B se observa un incremento de 5,8 a 8,2 unidades logarítmicas de UFC/ml de *Bifidobacterium bifidum* en inulina al 2%, de 5,7 a 7,8 para inulina al 1% y de 5,9 a 7,6 para inulina al 0,5 %, en el lapso de tiempo entre las 4 horas y las 24 horas. Se observa un incremento en el crecimiento del microorganismo a partir de las 8 horas en inulina al 2%. En la figura 9C respecto al comportamiento en MRS con y sin glucosa, se evidencia que el microorganismo incremento de 6,56 a 8,45 unidades logarítmicas, en el medio de cultivo con glucosa al 2%; y de 5,97 a 6,67 en el medio de cultivo sin adición de carbohidrato, entre las 4 y 24 horas de incubación.

Figura 9. A. *Bifidobacterium bifidum* en MRS - Bilac®, B. *Bifidobacterium bifidum* en MRS – inulina, C. *Bifidobacterium bifidum* en MRS - Control

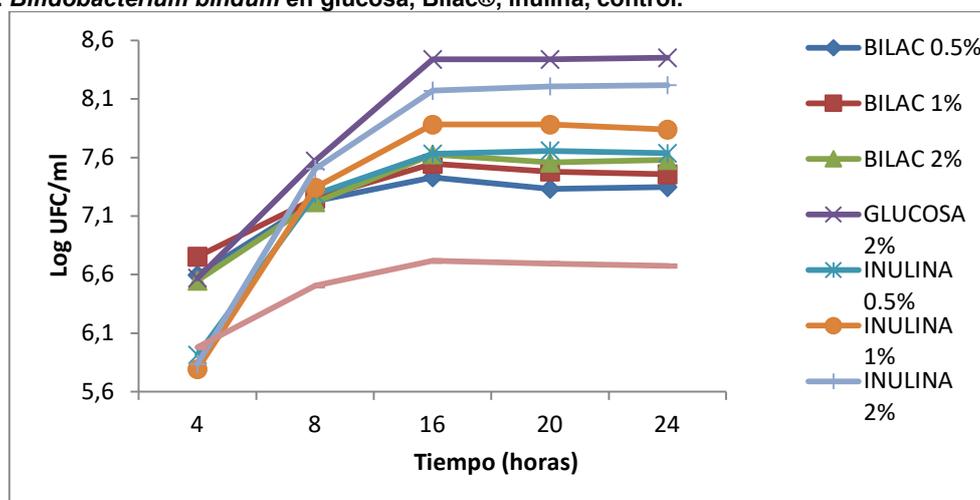


Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 10 se puede evidenciar que en el tiempo de evaluación de la fermentación los mayores recuentos en placa obtenidos fueron en el medio de cultivo con glucosa al 2%, seguido de inulina al 2%, 1% y 0,5% respectivamente. Los recuentos en placa para Bilac® fueron inferiores en comparación con el control positivo de glucosa y de inulina, seguido por Bilac® al 2%, 1% y 0,5% respectivamente. El crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* en la concentración más alta de Bilac® (2%) es similar a la de inulina al 0,5%.

El análisis de estos resultados indica que no hay diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas y que los mejores resultados se observan en los tratamientos empleando inulina y con glucosa que con Bilac®.

Figura 10. *Bifidobacterium bifidum* en glucosa, Bilac®, inulina, control.



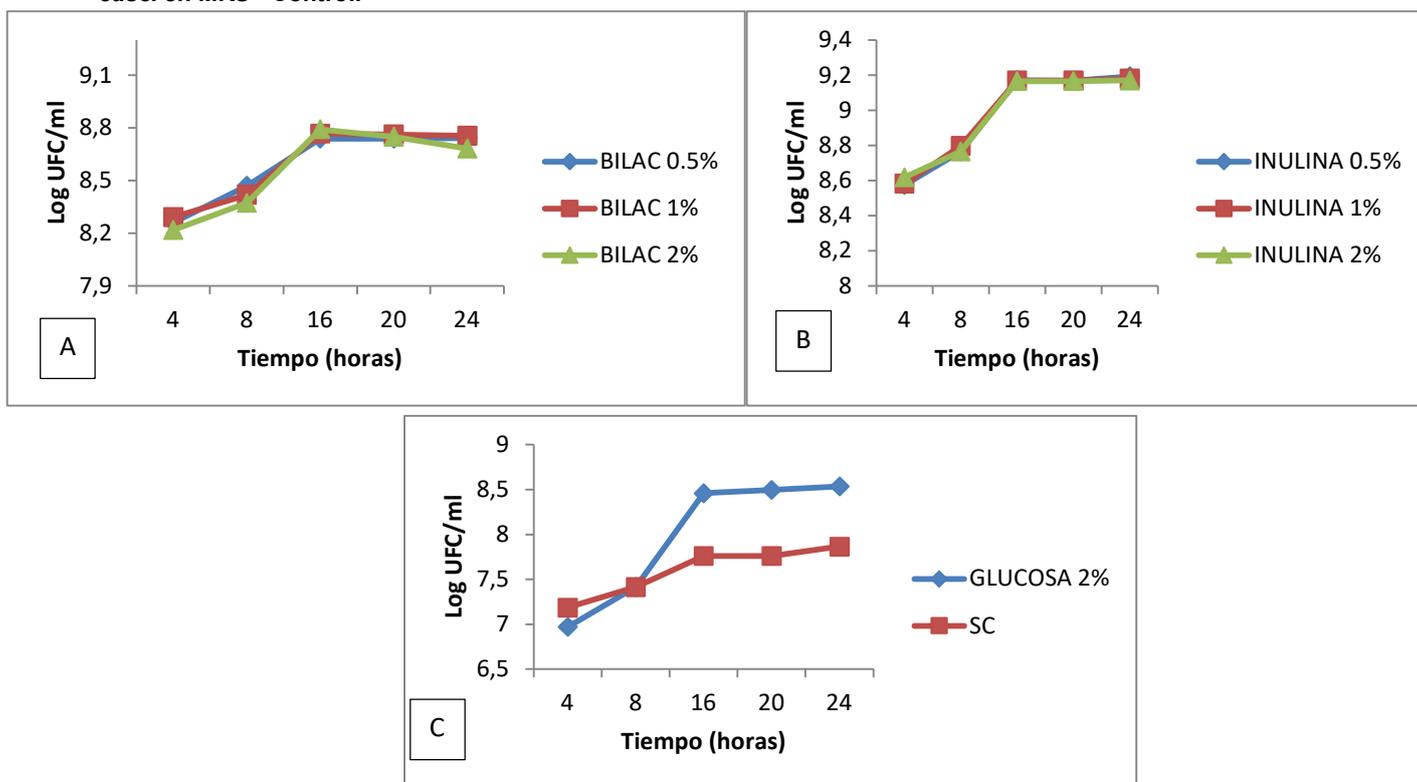
Fuente: Elaboración propia.

#### ■ Fermentaciones de *Lactobacillus casei*:

En la Figura 11A no se observa diferencia en cuanto al conteo de viables de *Lactobacillus casei* en las tres concentraciones evaluadas de Bilac®. En la Figura 11B, no se observan cambios en los recuentos del microorganismo *Lactobacillus casei* en inulina al 0,5%, al 1% y al 2%, en el lapso de 4 horas a 24 horas. Para *Lactobacillus casei* el conteo de viables en glucosa es menor que en inulina y Bilac® a las tres concentraciones evaluadas, durante las 24 horas, Figura 11C. El control negativo, MRS sin carbohidrato, presenta un menor recuento de UFC en comparación con el control positivo glucosa. Así mismo se puede establecer que para *Lactobacillus casei* el conteo de viables en glucosa es menor que en inulina y Bilac® a las tres concentraciones evaluadas, durante las 24 horas. El control negativo, MRS sin carbohidrato, presenta un menor recuento de UFC en comparación con el control positivo glucosa.

El análisis de estos resultados indica que para este microorganismo el tratamiento con Bilac® e inulina fue mejor que el presentado por la glucosa sin embargo, no hay diferencias significativas entre las 3 concentraciones evaluadas.

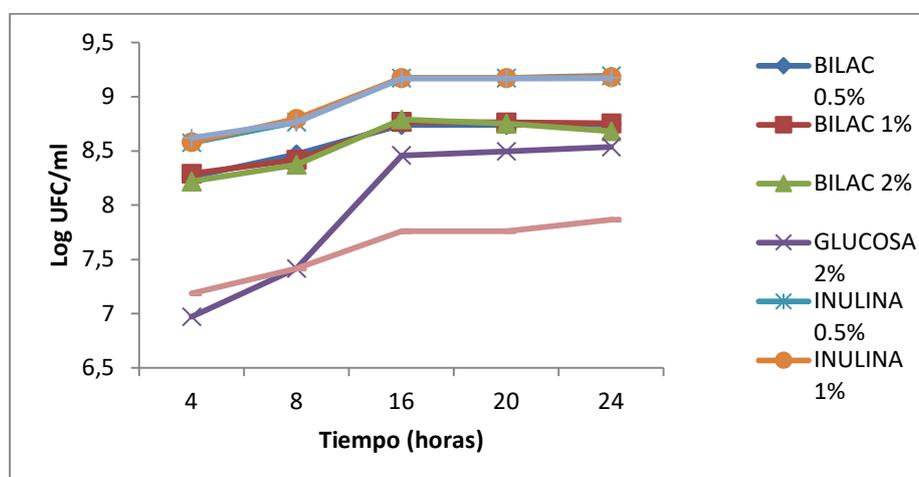
Figura 11. A. *Lactobacillus casei* en MRS - Bilac®, B. *Lactobacillus casei* en MRS – inulina, C. *Lactobacillus casei* en MRS - Control.



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 12 se puede observar que la biomasa viable de *Lactobacillus casei* con Inulina y con Bilac® fue más alta que con glucosa al inicio de la evaluación, sin embargo, el aumento en el número de unidades formadoras de colonia durante el tiempo de fermentación es más alto con glucosa (1.5 unidades logarítmicas aprox.) que con Bilac® e inulina (0.5 unidades logarítmicas aprox.) Al comparar Inulina contra Bilac® se puede evidenciar que se generó más biomasa viable al utilizar inulina que al utilizar Bilac®, sin embargo, el comportamiento es similar. No se observan cambios drásticos de viabilidad del microorganismo *Lactobacillus casei* entre concentraciones para ni con inulina ni con Bilac®. El control negativo, MRS sin carbohidrato, presenta un menor recuento de UFC en comparación con los tratamientos Bilac®, inulina y glucosa. Estos resultados indican que no hay una diferencia significativa ni entre las concentraciones, ni entre los tratamientos con Bilac®, ni con inulina, siendo mejor el conteo de viables al final de la fermentación con glucosa.

Figura 12. *Lactobacillus casei* en Bilac®, Inulina, Glucosa y control.

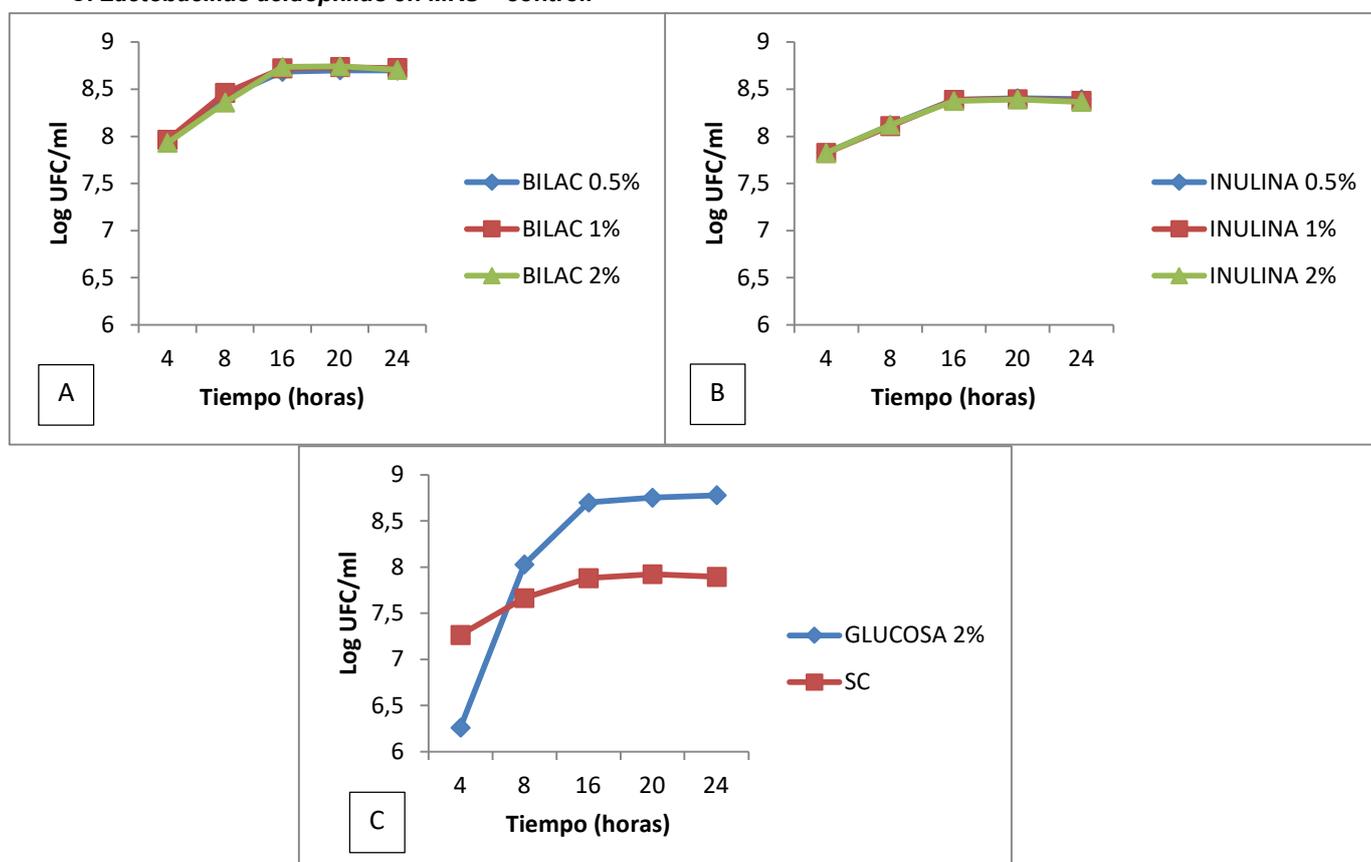


Fuente: Elaboración propia.

#### ▪ Fermentación *Lactobacillus acidophilus*

Los recuentos de *Lactobacillus acidophilus*, Figura 13A, son similares en las tres concentraciones de Bilac® 0.5%, 1% y 2%. No hay diferencias entre las tres concentraciones de Bilac® evaluadas. Los recuentos de *Lactobacillus acidophilus* presentan similitud y un mismo comportamiento, Figura 13B, para las tres concentraciones de inulina: 0.5%, 1% y 2%; o hay diferencias entre las tres concentraciones de inulina evaluadas para este microorganismo. En la Figura 13C se observa que los recuentos de *Lactobacillus acidophilus* fueron más altos en glucosa que en MRS sin carbohidrato. El microorganismo en glucosa presenta un mayor conteo de viables.

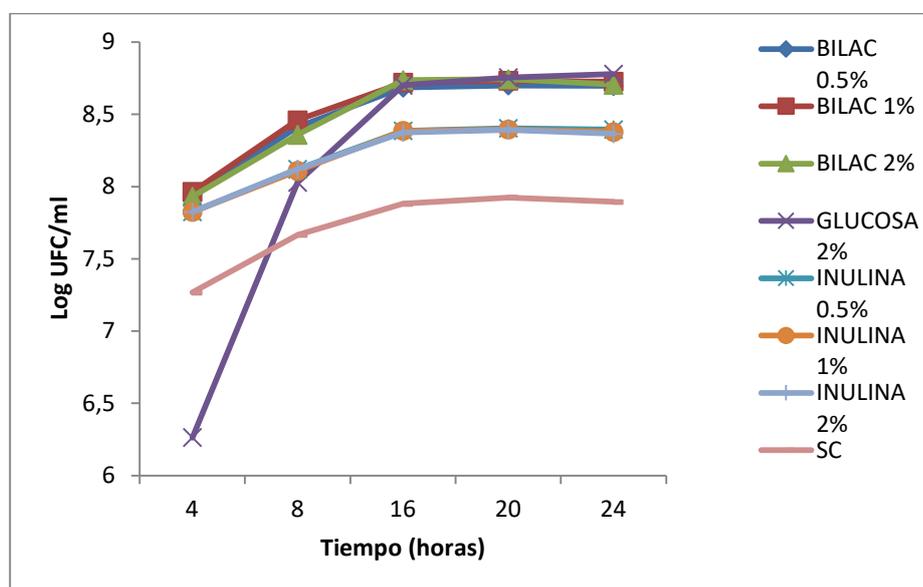
Figura 13. A. *Lactobacillus acidophilus* en MRS - Bilac®, B. *Lactobacillus acidophilus* en MRS – Inulina, C. *Lactobacillus acidophilus* en MRS – control.



Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 14, se observa que los recuentos iniciales de *Lactobacillus acidophilus* fueron un poco más altos en Bilac® que en inulina y que en glucosa. El microorganismo en glucosa presenta un menor recuento inicial. El control negativo MRS sin carbohidrato presenta un recuento mínimo en comparación con los tratamientos (Bilac® e inulina). El tratamiento sin fuente de carbono no presenta cambios significativos en el tiempo de fermentación. El mayor cambio en las unidades logarítmicas es para el tratamiento con la glucosa (presentó un aumento de 2.5 unidades logarítmicas aprox.). Inulina presentó un aumento de 0.5 unidades logarítmicas aprox.) y Bilac® un aumento de 0.7 unidades logarítmicas aprox.). Estos resultados ratifican que la glucosa es la que presenta un mayor conteo de viables, no siendo así ni para Bilac® ni para inulina en ninguna de las 3 concentraciones evaluadas.

Figura 14. *Lactobacillus acidophilus* en Bilac®, inulina, glucosa, control.



### 5.1.1 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia

#### Fermentaciones en MRS - Bilac®, MRS - inulina, MRS - glucosa, y control, por *Lactobacillus acidophilus*:

La concentración de los azúcares analizados decrecen durante las 24 horas de fermentación en cada uno de los tratamientos realizados (Bilac® 0,5%; Bilac® 1%; Bilac® 2%; inulina 0,5%; inulina 1%; inulina 2%, control), sin embargo la concentración decrece en cantidades bajas para estos tratamientos. Para el caso de la glucosa, se observa una gran disminución con respecto a la concentración inicial. Esto quiere decir que es evidente el consumo del sustrato glucosa por parte de este microorganismo por medio de la técnica de HPLC ya que fue notable la disminución en la concentración, no siendo así de evidente ni para bilac ni para inulina con esta técnica, lo cual permite inferir que es necesario reconsiderar esta metodología para evaluaciones de consumo de sustrato con Bilac® y con inulina.

En razón a que las propiedades de Bilac® impedían su filtración a las mismas concentraciones de los demás tratamientos, la curva patrón de Bilac® se realizó con concentraciones más bajas (mg/ml) en comparación con los otros tratamientos analizados, y además todas las muestras de Bilac® fueron diluidas para poderlas filtrar por la membrana de éster de celulosa de 0.22 µm de poro.

El control (que no tenía ningún carbohidrato solo los componentes del medio de cultivo (extracto de carne, extracto de levadura, peptona universal, etc) ) puede contener trazas de glucosa por que la técnica de HPLC lo evidencia, se comparo este control contra Bilac®, inulina y glucosa, y estas muestras contienen concentraciones de glucosa, lo cual demuestra que el medio de cultivo o el inóculo contenían glucosa que el microorganismo pudo utilizar.

La concentración de Bilac® decrece gradualmente para Bilac® al 2%, y disminuye levemente para Bilac® al 1% y al 0,5%.

Para cada uno de los tratamientos la concentración de azúcares disminuye durante el tiempo de fermentación. Se evidencia una mayor disminución en el caso de glucosa, control negativo, e inulina al 1%, y una menor disminución para el caso de inulina 2%, inulina 0,5%, Bilac® 2%, Bilac® 1% y Bilac® 0,5%.

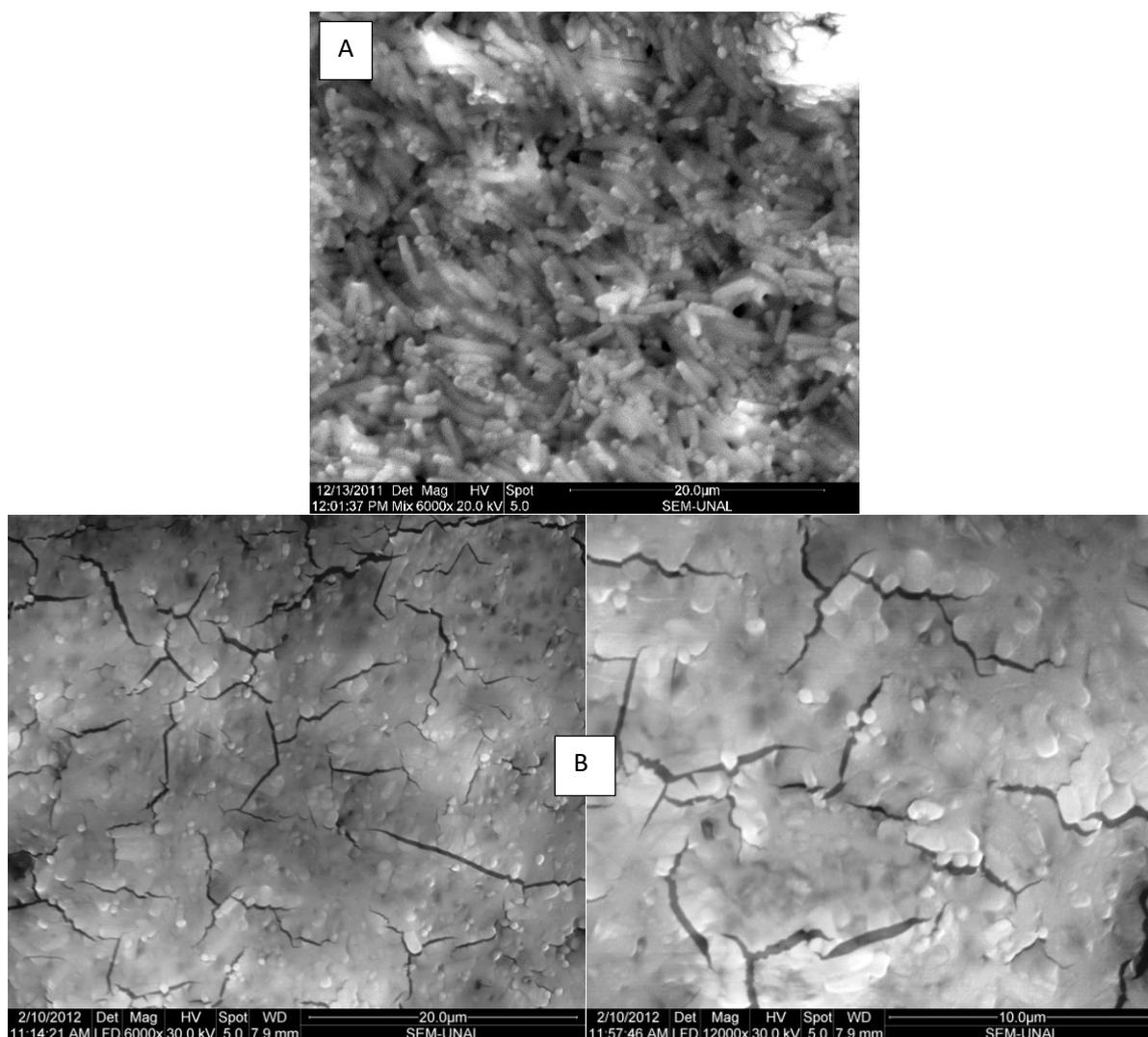
Comportamientos similares a los obtenidos para el microorganismo *Lactobacillus acidophilus* se observan en los microorganismos *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* bajo las condiciones analizadas en este estudio.

### **5.1.2 Observación por microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las especificaciones de la microscopía SEM se indican en el anexo B.

En la Fotografía 8A se puede visualizar la *Bifidobacterium bifidum* creciendo en MRS glucosa. apreciándose como bacilos largos, y algunos bifurcados como es característico. Presentan un tamaño de aproximadamente 6,7 µm. Así mismo, en la fotografía 8B se observa a *Bifidobacterium bifidum* creciendo en Bilac® al 2%, se aprecia una morfología similar a cocos con un diámetro aproximado de 1 µm.

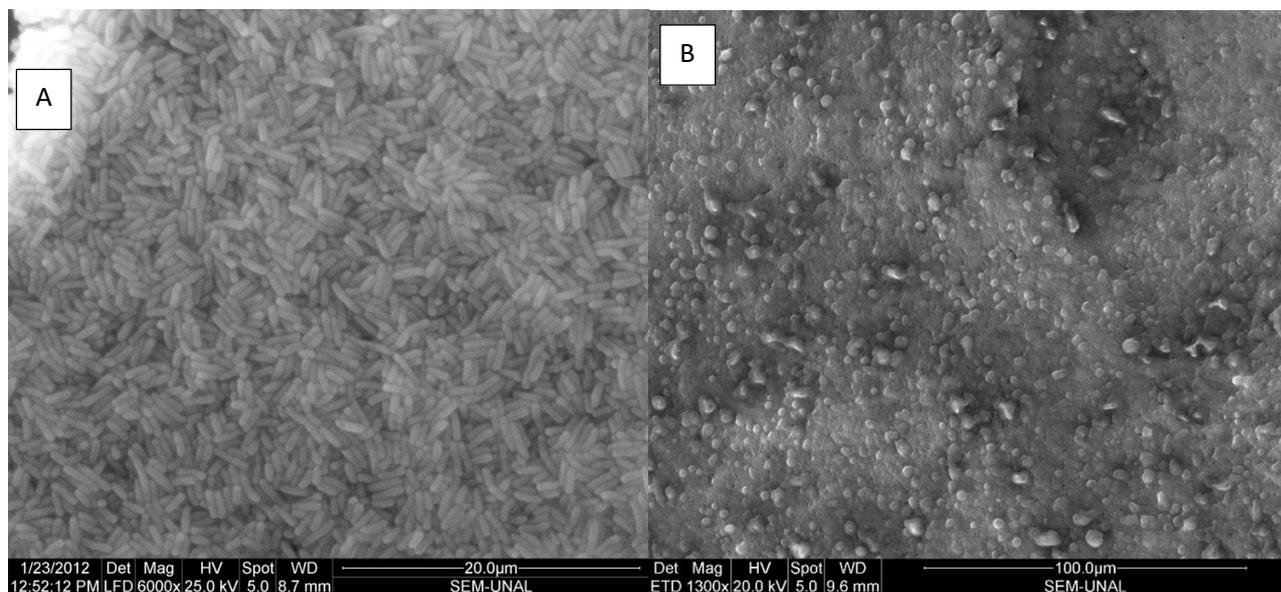
Fotografía 8. *Bifidobacterium bifidum* en A. MRS - glucosa, B. MRS - Bilac®.



Fuente: Elaboración propia.

En las fotografías 9A y 9B, se observan respectivamente a *Lactobacillus acidophilus* como bacilos de 2 µm aproximadamente, creciendo en MRS glucosa y *Lactobacillus acidophilus* en MRS Bilac® células más pequeñas similares a cocos, en comparación con el crecimiento del microorganismo en MRS glucosa. El tamaño de las bacterias es de aproximadamente 1 µm.

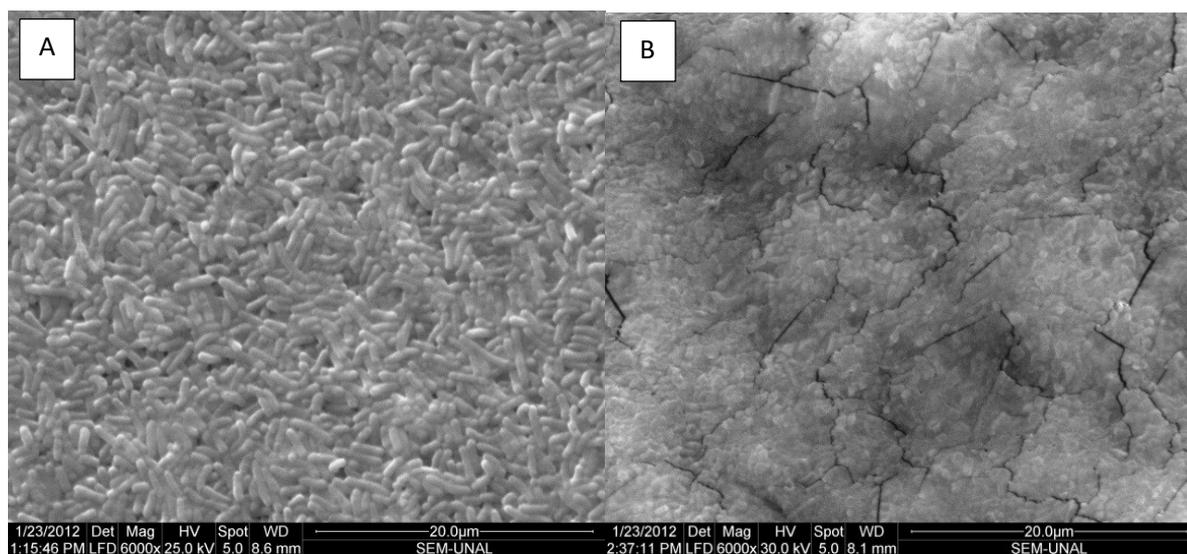
Fotografía 9. *Lactobacillus acidophilus* en A. MRS glucosa, B. MRS Bilac®.



Fuente: Elaboración propia.

*Lactobacillus casei* presenta un crecimiento importante en MRS glucosa, fotografía 10A, observándose bacilos cortos de 2 µm aproximadamente. En la fotografía 10B a pesar de que se ve la muestra fracturada, se puede percibir que las células de *Lactobacillus casei* son redondeadas similares a cocos y pequeñas, en MRS con Bilac® al 2%. Presentan un diámetro de 1 µm aproximadamente.

Fotografía 10. *Lactobacillus casei* en A. MRS – glucosa, B. MRS - Bilac®.



Fuente: Elaboración propia.

A partir de la microscopía electrónica de barrido se pudo comprobar que las bacterias probióticas, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, crecieron en el medio de cultivo MRS que contenía Bilac® presentando una morfología similar a cocos y que tienen la mitad del tamaño celular en comparación con el crecimiento en MRS glucosa; y una diferencia de 5,7  $\mu\text{m}$  aproximadamente para el caso de *Bifidobacterium bifidum*, creciendo en MRS glucosa y creciendo en MRS Bilac®.

Los recuentos de *Bifidobacterium bifidum* en medio de MRS con Bilac® e inulina, presentan un conteo de viables similar, entre Bilac® al 2% y los de inulina al 0,5%, lo cual indica que este microorganismo utiliza el biopolímero como fuente de carbono con un comportamiento similar al de inulina al 0,5%. Al evaluar componentes como prebióticos el interés radica en conocer la cantidad de microorganismos viables a fin de evaluar la influencia que tiene el prebiótico sobre la población.

Al realizar las curvas de densidad óptica contra el tiempo se observó que la densidad óptica para inulina era muy baja en comparación con el control positivo de glucosa, lo cual llevó a establecer la importancia de analizar recuentos de microorganismos viables en los medios de cultivo utilizados. Se realizaron las curvas patrón de crecimiento para cada uno de los medios de cultivo MRS, MRS Bilac® y MRS inulina y se observó que el microorganismo a pesar de tener la misma lectura de densidad óptica presentaba un recuento de microorganismos viables diferente. Mientras para lecturas de absorbancia muy bajas para glucosa el conteo de viables era bajo, para la misma absorbancia en Bilac® e inulina fueron iguales o incluso superiores a los valores más altos de absorbancia obtenidos en MRS - glucosa.

Lo anterior permitió indicar que en los medios de cultivo con el prebiótico reconocida inulina y con el prebiótico en evaluación Bilac® se estaba presentando un cambio en la morfología celular. Por lo tanto, se realizó microscopía electrónica de barrido para los microorganismos probióticos que crecieron en glucosa y en Bilac®, y se pudo confirmar que el tamaño celular en el medio de cultivo con glucosa es mayor, que el tamaño celular obtenido en el medio de cultivo con Bilac®.

Esto demuestra porque a pesar se presentar absorbancias similares en los tres medios de cultivo para el mismo microorganismo los conteos de viables son totalmente diferentes. Es muy importante resaltar estos resultados obtenidos en este estudio porque en la bibliografía consultada se presenta información muy limitada referente a estos cambios en la morfología de

las bacterias probióticas en los medios de cultivo con prebióticos. Esto puede atribuirse a que con este tipo de sustratos en el medio de cultivo las bacterias pueden utilizar el sustrato disponible y empezarlo a almacenar para periodos de carencia y de esta forma cambiar su morfología típica de bacilos a una más redondeada tipo cocos; también podría plantearse que este tipo de condiciones de cultivo generan un estrés en las bacterias y las llevan a protegerse induciendo un cambio morfológico; o bien puede ser que debido a un exceso de sustrato inducen una configuración más pequeña con lo cual pueden aumentar más en número ya que ocupan menos espacio.

### 5.1.3 Determinación de la viabilidad de bacterias probióticas en una bebida láctea fermentada con el biopolímero Bilac®

La evaluación sensorial realizada, con la participación de 20 personas, quienes consumieron una bebida láctea fermentada con adición de concentraciones variables de Bilac® permitió establecer no solo cual fue el porcentaje de Bilac® de mayor preferencia, sino también evaluar el efecto prebiótico del biopolímero adicionado. Según los resultados observados en la tabla 4, el 50% de las personas eligieron la bebida láctea fermentada adicionada con Bilac® al 1% como la muestra que tiene mayor similitud al control (bebida láctea fermentada sin prebiótico), y el otro 50% selecciono la bebida láctea con inulina 1% como la que mayor similitud al control tenia, este mismo comportamiento se observó con Bilac® e Inulina al 2%. Resultados que permitirían indicar que ninguno de los dos polímeros a estas concentraciones ejerce un efecto importante sobre los atributos evaluados que puede ser percibido por los participantes.

**Tabla 4. Bebida láctea fermentada adicionada con Bilac® que presentó mayor similitud al control (bebida láctea fermentada sin prebiótico)**

Alimento	Similitud al control (% de panelistas)
Bebida láctea con Bilac® al 1%	50%
Bebida láctea con inulina al 1%	50%
Alimento	Similitud al control (% de panelistas)
Bebida láctea con Bilac® al 2%	50%
Bebida láctea con inulina al 2%	50%

Fuente: Elaboración propia.

En general, las bebidas lácteas de preferencia, tabla 5, fueron aquellas adicionadas con Inulina al 1% y 2 % respectivamente.

**Tabla 5. Bebida láctea fermentada adicionada con Bilac® que presentó mayor preferencia por los panelistas**

Alimento	Preferencia de panelistas (% de panelistas)
Bebida láctea con Bilac® al 1%	14,29%
Bebida láctea con inulina al 1%	35,71%
Bebida láctea con Bilac® al 2%	7,14%
Bebida láctea con inulina al 2%	28,57%
Patrón	14,29%

Fuente: Elaboración propia.

Al evaluar específicamente y de manera separada cada uno de los resultados sobre los atributos de la bebida láctea fermentada con Bilac® al 2% se establece que ésta corresponde a la bebida láctea fermentada preferida en términos de viscosidad, tabla 6; razón por la cual se seleccionó esta concentración para adicionar Bilac® en la bebida fermentada, y ofrecer este producto a los participantes del ensayo biológico.

**Tabla 6. Bebida láctea fermentada adicionada con Bilac® que presentó mayor preferencia de acuerdo a su viscosidad**

Alimento	Preferencia en términos de viscosidad (% de panelistas)
Bebida láctea con Bilac® al 1%	21,43%
Bebida láctea con inulina al 1%	7,14%
Bebida láctea con Bilac® al 2%	35,72%
Bebida láctea con inulina al 2%	28,57%
Patrón	7,14%

Fuente: Elaboración propia.

Como puede observarse en la tabla 7, Para los participantes, la bebida fermentada control presentaba una viscosidad media, un dulzor medio, y una acidez media.

**Tabla 7. Evaluación sensorial sobre las características de viscosidad, dulzor y acidez de la Bebida patrón**

Característica	Porcentaje de panelistas que evaluó el alimento patrón según las características dadas		
	Alta	Media	Baja
Viscosidad	7,14%	85,71%	7,14%
Dulzor	0%	78,57%	21,43%
Acidez	7,14%	85,71%	7,14%

Fuente: Elaboración propia.

Según la percepción de los participantes, la bebida fermentada adicionada con Bilac® al 1% (tabla 8) presentó una viscosidad y dulzor medio, y una acidez baja.

**Tabla 8. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada adicionada con Bilac® al 1%**

Característica	Porcentaje de panelistas que evaluó la bebida según las características dadas		
	Alta	Media	Baja
Viscosidad	28,57%	50,00%	21,43%
Dulzor	0%	78,57%	21,43%
Acidez	28,57%	28,57%	42,86%

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 9 se detalla que la bebida fermentada adicionada con inulina al 1% presento la misma percepción para viscosidad, un dulzor entre media y alta y una acidez media.

**Tabla 9. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada adicionada con inulina al 1%**

Característica	Porcentaje de panelistas que evaluó la bebida según las características dadas		
	Alta	Media	Baja
Viscosidad	42,86%	42,86%	14,29%
Dulzor	50,00%	35,71%	14,29%
Acidez	7,14%	78,57%	14,29%

Fuente: Elaboración propia.

La evaluación de las bebidas fermentadas con adición del 2% de biopolímero en la Tabla 10, permiten establecer que la adición de Bilac® al 2% confiere una viscosidad, dulzor medio y una acidez baja, comparando con la percepción de la adición de inulina 2%, presenta una similitud con relación a los atributos de viscosidad y dulzor y una diferencia en la percepción de la acidez.

**Tabla 10. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada adicionada con Bilac® al 2%**

Característica	Porcentaje de panelistas que evaluó la bebida según las características dadas		
	Alta	Media	Baja
Viscosidad	42,86%	50,00%	7,14%
Dulzor	21,43%	50,00%	28,57%
Acidez	21,43%	28,57%	50,00%

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 11 se detalla que en general, la bebida fermentada adicionada con inulina al 2% presenta una viscosidad, dulzor y una acidez media, indicando un equilibrio en la percepción general.

**Tabla 11. Evaluación sensorial sobre las características de la bebida fermentada adicionada con inulina al 2%**

Característica	Porcentaje de panelistas que evaluó la bebida según las características dadas		
	Alta	Media	Baja
Viscosidad	28,57%	42,86%	28,57%
Dulzor	28,57%	57,14%	14,29%
Acidez	0,00%	64,29%	35,71%

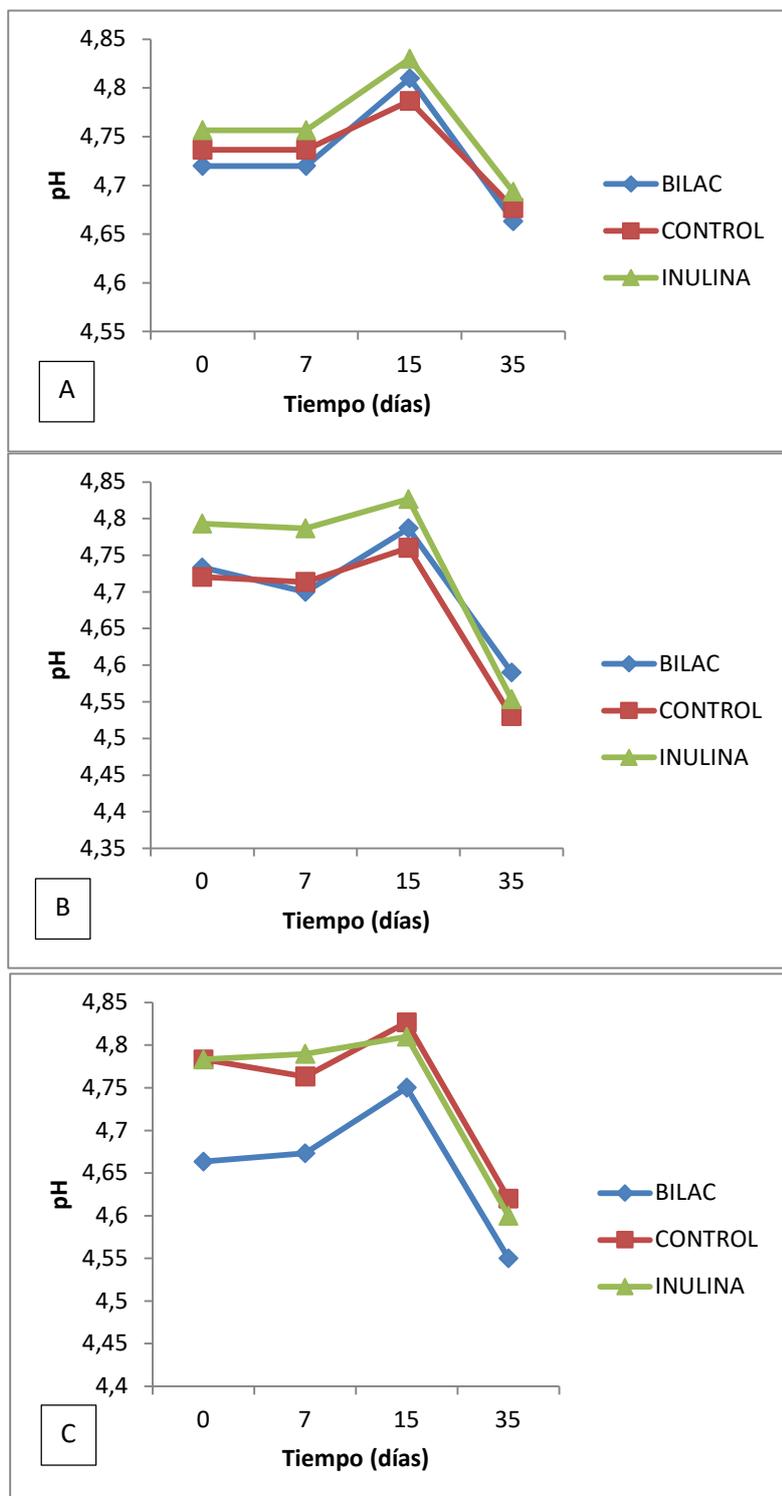
Fuente: Elaboración propia.

Con los anteriores resultados se pudo establecer que la principal diferencia en la percepción de los atributos evaluados de los dos biopolímeros fue la correspondiente a la acidez, siendo la concentración del 2% la de mayor preferencia. También se puede evidenciar que los productos con Bilac® en comparación con los demás presentan una baja acidez y dulzor ya que Bilac® se caracteriza por enmascarar su percepción. Se seleccionó la concentración de 2% de Bilac® para el desarrollo de la bebida láctea fermentada a ofrecer en el ensayo *in vivo*.

#### 5.1.4 Viabilidad de bacterias probióticas en la bebida fermentada

En la figura 15A, se puede evidenciar el comportamiento de pH durante el almacenamiento de la bebida fermentada con *Bifidobacterium bifidum*, se evidencia un aumento leve del pH a los 15 días de almacenamiento a 4°C en los tres tratamientos, y una disminución a los 35 días de almacenamiento, para los dos tratamientos y el control. El comportamiento del pH para *Lactobacillus casei* durante el almacenamiento permanece constante, figura 15B, desde el inicio del almacenamiento hasta los 15 días en los tres tratamientos, y disminuye considerablemente hacia los 35 días de almacenamiento. La figura 15C, indica que el pH de la bebida fermentada con *Lactobacillus acidophilus* no parece variar en comparación a las otras dos.

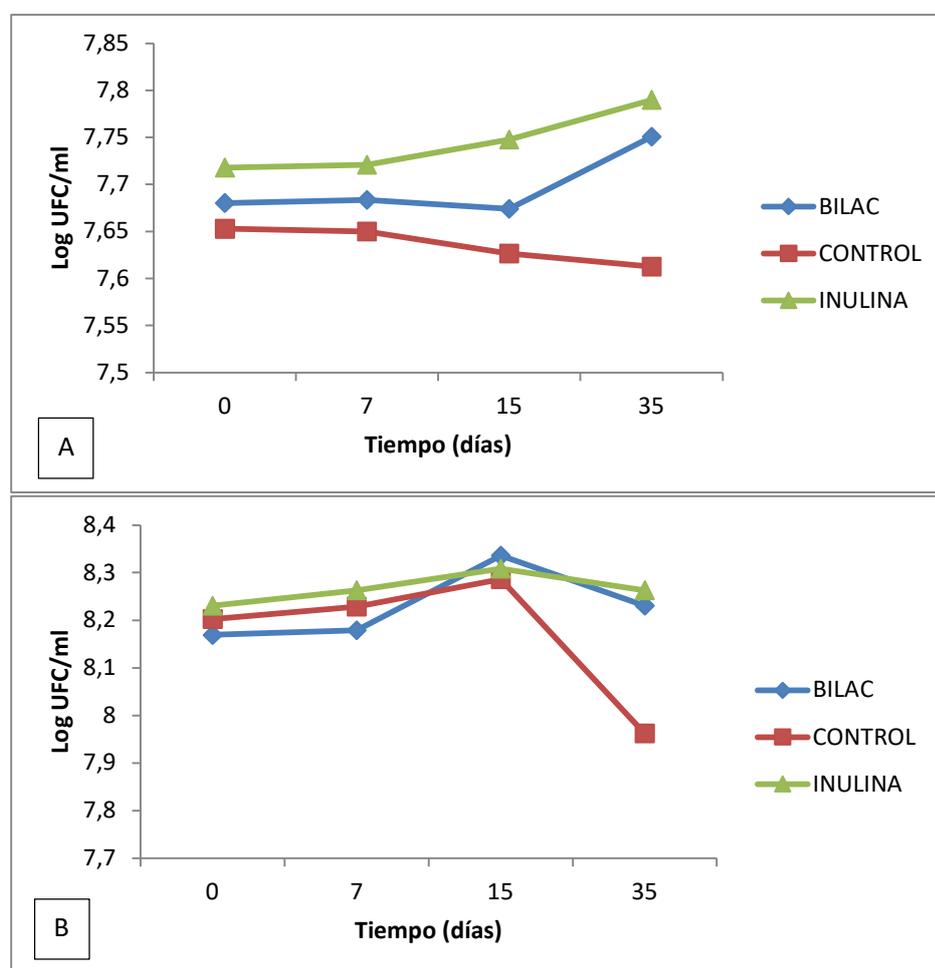
Figura 15. Comportamiento del pH durante el almacenamiento de la Bebida fermentada con inulina, Bilac® y control, en A. *Bifidobacterium bifidum*, B. *Lactobacillus casei*, C. *Lactobacillus acidophilus*.

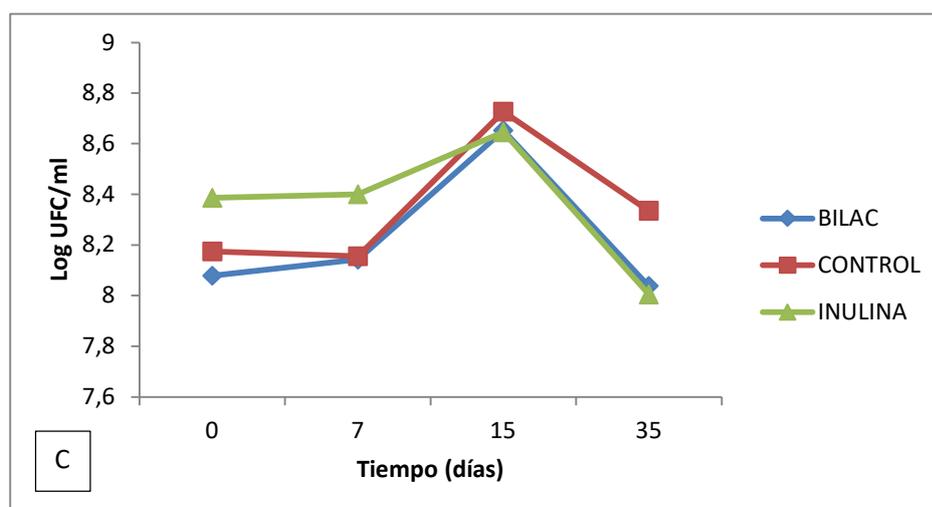


Fuente: Elaboración propia.

En la figura 16A se puede observar que la población en el alimento se mantiene viable durante los 35 días de almacenamiento a 4°C, con un leve incremento en el recuento en la bebida fermentada con inulina y en la bebida fermentada con Bilac®. El probiótico en Bilac® y en inulina presenta un comportamiento similar. El control negativo presenta menor conteo de viables en el tiempo. Después de 35 días de almacenamiento a 4°C, la bebida fermentada con inulina y Bilac®, figura 16B, proporcionan un conteo de viables de *Lactobacillus casei* mayor que en el control (bebida fermentada sin adición de prebiótico). En la figura 16C se aprecia que para *Lactobacillus acidophilus* el control presenta un mayor conteo de viables a los 35 días de almacenamiento, seguido de Bilac® y de inulina.

Figura 16. Recuento de unidades formadoras de colonia (Log UFC/ml) durante el tiempo de almacenamiento de A. *Bifidobacterium bifidum*, B. *Lactobacillus Casei*, C. *Lactobacillus acidophilus*.





Fuente: Elaboración propia.

#### ▪ Fermentación del Kumis:

En la figura 17A, se evidencia el incremento del porcentaje de ácido láctico en el tiempo con *L. acidophilus* y es similar para los dos tratamientos Bilac® e inulina y el control. Según el comportamiento visualizado en la figura 17B, en la fermentación con *L. casei*, el porcentaje de ácido láctico aumenta hasta las 16 horas para Bilac® y el control y después disminuye, para inulina aumenta hasta las 24 horas. Para *Bifidobacterium bifidum* se presenta un aumento en el porcentaje de ácido láctico en el tratamiento con inulina y el control, sin embargo para el tratamiento con Bilac® el % de ácido láctico a las 24 horas de fermentación es menor en comparación con inulina y control. Figura 17C

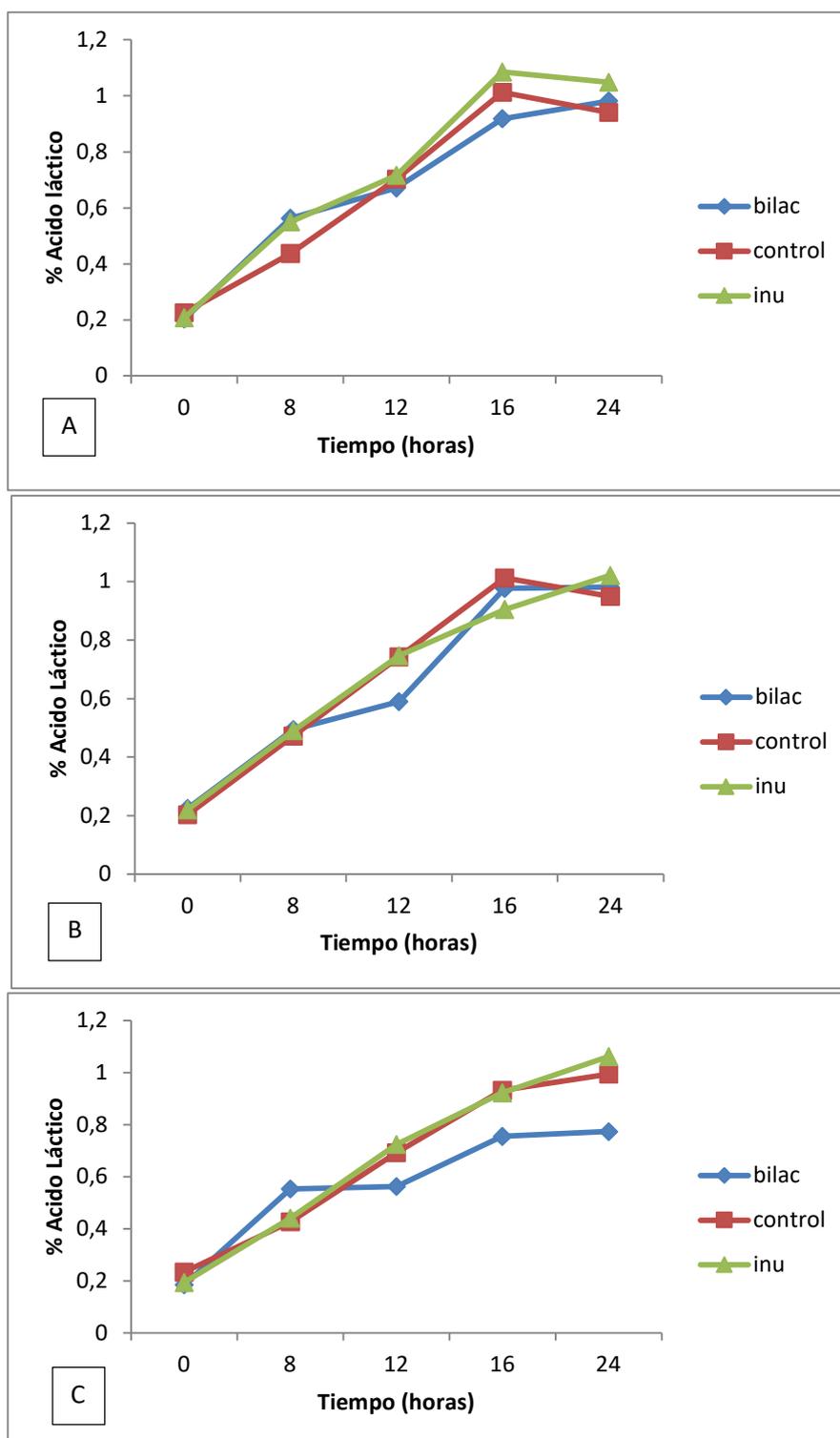
El *Lactobacillus acidophilus* con Inulina al 2% presenta el mayor % de ácido láctico con respecto a las demás, seguido del control y Bilac® al 2% respectivamente; entre las 8 y 16 horas es el rango donde más se presenta un aumento acelerado para las 3 muestras; entre las 16 a 24 horas tiende a estabilizarse y mantenerse casi igual y finalmente entre la 0 a 8 horas aparentemente aumento más que el Bilac® al 2% que el Control. Sin embargo fue superado el porcentaje de ácido láctico horas después. También es importante resaltar que aunque se produjo una mayor cantidad de ácido láctico por parte de este microorganismo en el tratamiento con inulina y el control en comparación con Bilac®, el tratamiento con este compuesto muestra una tendencia a seguir aumentando.

Para el microorganismo *Lactobacillus casei*, el control muestra un pequeño aumento en comparación con los otros tratamientos a las 16 horas, sin embargo, la mayor producción de ácido láctico fue para el tratamiento con inulina al 2% a las 24 horas. El Bilac® al 2% presenta una leve disminución a las 12 horas debido posiblemente a errores en la toma de la muestra o en la titulación, a las 16 horas vuelve a estabilizarse y continúa la tendencia de incremento. El control y Bilac® al 2% aumentan hasta las 16 horas y en el rango entre 16 a 24 horas se estabiliza manteniendo casi el mismo valor. Inulina al 2% muestra una tendencia ascendente hasta las 24 horas.

Para el microorganismo *Bifidobacterium bifidum* el control e Inulina al 2% mantienen casi los mismos datos y una tendencia al aumento siendo muy superiores en comparación con Bilac® al 2%. El mayor rango de producción de ácido láctico se da entre las 8 y las 16 horas para las 3 muestras, entre las 16 a 24 horas tiende a estabilizarse y mantener casi los mismos datos, entre las 0 a 8 horas se produjo más ácido láctico en el tratamiento con Bilac® al 2% sin embargo después este valor fue superado ampliamente por el otro tratamiento y el control.

Todos estos resultados son indicativos del proceso de fermentación realizado por estos microorganismos bajo estas circunstancias pues son productos derivados de su metabolismo y por lo tanto pueden evidenciar las vías metabólicas utilizadas. Así mismo un incremento en la producción de ácido láctico bajo las condiciones aquí proporcionadas como son control, Bilac® e inulina, indica que los microorganismos usaron los sustratos disponibles en el medio (bebidas lácteas) para continuar con su ruta metabólica típica y de esta forma llegar a obtener los altos valores alcanzados.

Figura 17. Fermentación para A. *Lactobacillus acidophilus*, B. *Lactobacillus casei*, C. *Bifidobacterium bifidum*.



Fuente: Elaboración propia.

### 5.1.5 Cuantificación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Una cromatografía líquida de alta eficiencia se realizó para el análisis de carbohidratos durante las fermentaciones de la bebida láctea (tiempo 0, 8, 12, 16, y 24 horas), bebida con 2% de Bilac®, bebida con 2% de inulina y bebida control, para cada uno de los microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*.

Los resultados obtenidos no son concluyentes debido a que se presentaron deficiencias en la determinación de las curvas patrón para este tipo de muestras que contienen leche – kumis, por lo tanto al hacer el análisis de los resultados con la curvas patrón obtenidas y las muestras evaluadas se llegó a la conclusión de que no es posible bajo estas condiciones evidenciar una disminución en los azúcares a través del tiempo de fermentación en esta matriz de leche y bajo estas condiciones específicas.

## 5. 2 Evaluación el efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones in vivo

Las muestras de materia fecal recolectadas periódicamente, correspondientes a cada uno de los voluntarios fueron evaluadas como se describió previamente en la metodología.

Los resultados consignados en la tabla 12, permiten observar la tabulación de los datos obtenidos de los análisis realizados a las muestras de materia fecal de los voluntarios donde se encuentran los valores de pH, y las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) para Coliformes, *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium sp.*, en función del sexo (hombres y mujeres) y en función del tiempo de estudio.

Tabla 12. Efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones *in vivo*.

PERSONAS	pH	Coliformes	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>
		LOG UFC	LOG UFC	LOG UFC
<b>HOMBRES</b>				
<b>SEMANA 0</b>				
1	6	6,70	4,00	5,30
2	6	7,69	5,00	5,70
3	6	6,23	2,75	3,90
4	5	6,40	5,18	5,15
5	6	6,94	6,20	3,41
6	6	7,26	5,84	5,88
7	6	6,70	5,32	5,28

PERSONAS	pH	Coliformes	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>
		LOG UFC	LOG UFC	LOG UFC
<b>SEMANA 0</b>				
<b>MUJERES</b>				
1	6	7,32	6,23	5,52
2	3	5,83	4,76	3,70
3	6	7,59	5,52	5,46
4	4	6,15	4,73	4,93
5	6	7,65	4,76	5,73
6	6	7,04	3,82	5,64
7	5	7,20	5,36	5,11
<b>SEMANA 1</b>				
<b>HOMBRES</b>				
1	6	6,38	5,81	7,51
2	7	5,00	6,40	6,36
3	7	7,00	7,57	7,78
4	6	7,58	5,79	6,43
5	6	5,99	7,57	6,30
6	7	7,45	6,34	6,28
7	7	6,26	5,81	5,34
<b>SEMANA 1</b>				
<b>MUJERES</b>				
1	5	5,85	7,81	7,66
2	7	6,48	7,90	7,54
3	7	8,04	6,91	7,41
4	6	6,51	7,30	6,95
5	7	7,38	5,63	6,75
6	7	7,26	7,00	6,23
7	8	6,87	7,59	7,34
<b>SEMANA 2</b>				
<b>HOMBRES</b>				
1	6	7,98	7,51	5,86
2	7	7,41	7,18	7,32
3	6	8,08	8,15	8,34
4	6	6,96	6,15	7,15
5	6	7,38	7,56	5,23
6	7	7,28	7,23	6,62
7	5	5,36	5,51	7,43
<b>SEMANA 2</b>				
<b>MUJERES</b>				
1	5	6,15	8,89	8,43
2	7	6,61	8,51	8,23
3	7	8,75	8,56	8,78
4	7	7,20	7,94	8,53
5	7	7,83	7,89	5,41

PERSONAS	pH	Coliformes	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>
		LOG UFC	LOG UFC	LOG UFC
6	7	8,72	7,40	8,08
7	5	7,30	7,59	7,23

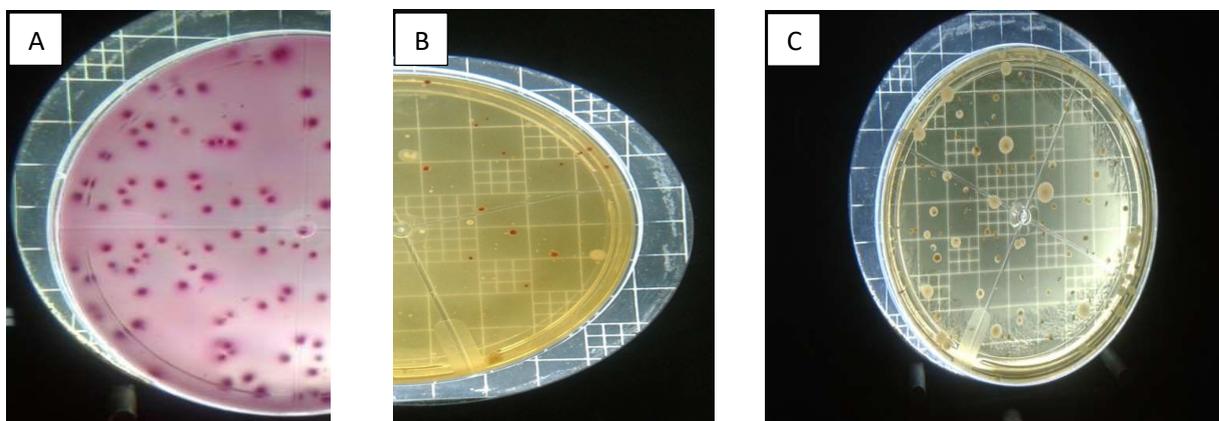
Fuente: Elaboración propia.

Como se describió previamente en la metodología se utilizaron tres medios de cultivo diferentes específicos para cada uno de los tres géneros microbianos evaluados. Se realizó el recuento en placa (UFC) de cada una de las muestras. Adicionalmente se verificó y monitoreo el crecimiento de estos microorganismos en los agares selectivos, cuyas fotografías se relacionan a continuación.

En la Fotografía 11 obtenida a partir del análisis de las muestras de materia fecal de los voluntarios durante el estudio *in vivo* se observan las colonias características de Coliformes en agar VRBA, *B. bifidum* en agar NNLP modificado + TTC, y de *L. casei* en agar MRS Vancomicina.

Es importante destacar en este punto que la materia fecal humana contiene gran cantidad de microorganismos que no solo pertenecen a los géneros aquí evaluados, sino que se encuentra una mezcla muy compleja de diversidad de géneros y especies microbianos. Esto hace muy difícil en cualquier estudio de materia fecal llegar a obtener y clasificar un solo género bacteriano por las técnicas tradicionales de cultivo, por ello hoy en día se utilizan técnicas moleculares con las cuales se obtiene una mayor precisión. Por esta razón es importante resaltar el empleo de medios de cultivo selectivos para estos tres grupos microbianos con los cuales se pudieran aislar estos microorganismos deseados, e inhibir a los microorganismos acompañantes y poder llegar a resultados concluyentes con las técnicas de cultivos tradicionales en microbiología.

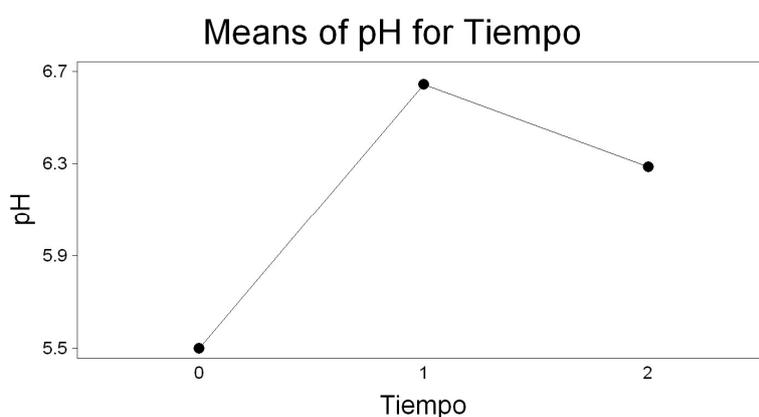
**Fotografía 11. Crecimiento de colonias en muestras de materia fecal de A. Colonias de Coliformes en Agar VRBA, B. *B. bifidum* en NNLP modificado + TTC, C. *L. casei* en agar MRS Vancomicina.**



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 18, se presentan los valores de las mediciones de pH de las muestras de materia fecal de los voluntarios antes y durante el consumo de Bilac®. Se puede observar que al inicio del estudio (antes del consumo de Bilac®) el promedio del pH de todos los voluntarios (hombres y mujeres) estuvo alrededor de 5,5. Después de una semana de tratamiento consumiendo 8 gramos de Bilac® al día el promedio del pH para los voluntarios fue cercano a 6.7, para la segunda semana de tratamiento con la misma dosis de 8 gramos, el pH disminuyó a 6,3 aproximadamente, lo cual indica que en la primera semana de estudio se presentó una adaptación al polímero lo cual aumento el pH, pero en la segunda semana de tratamiento el pH bajo, demostrando una adaptación por parte de los voluntarios tanto hombres como mujeres.

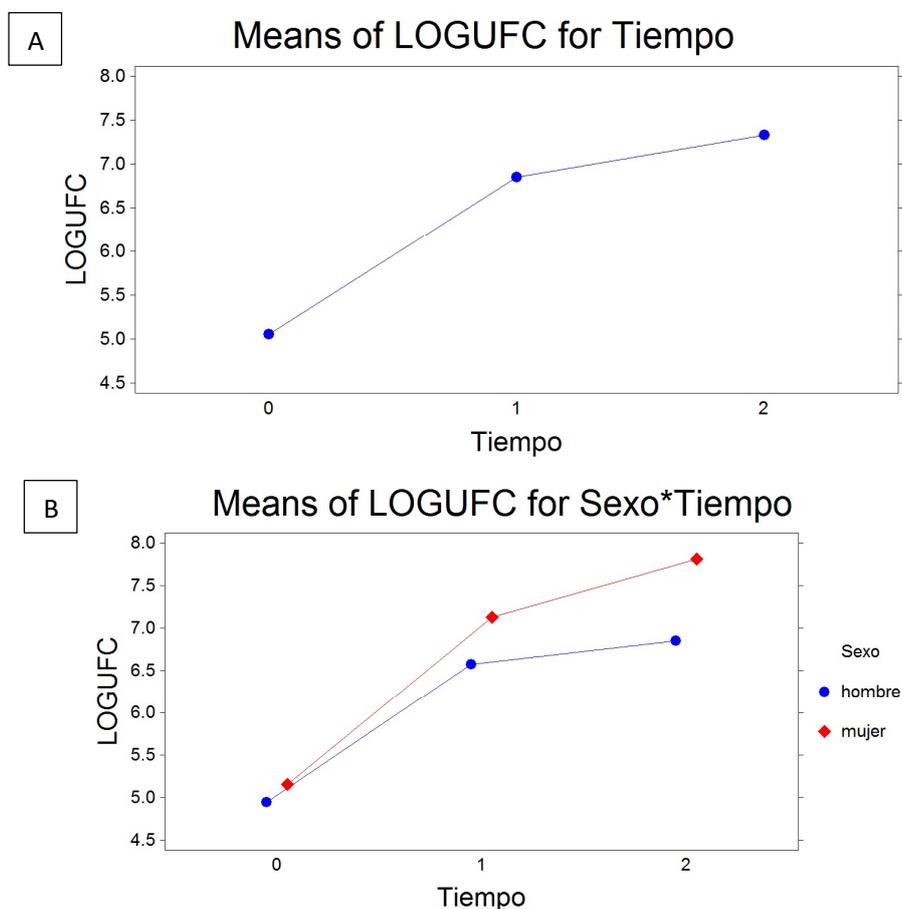
Figura 18. Comportamiento del pH de la materia fecal antes y durante el consumo de Bilac®.



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 19A, se puede evidenciar que antes del consumo del polímero se presentaba un recuento promedio de *Bifidobacterium bifidum* de 5.0 Log UFC/g, para todos los voluntarios. Después de la primera semana de tratamiento aumento el recuento de *B. bifidum* aproximadamente a 6,7 log UFC/g, y a las 2 semanas de tratamiento con Bilac® aumento el recuento a 7,4 Log UFC/g. Lo cual demuestra que el consumo de 8 gramos diarios de Bilac® (4 g en bebida láctea fermentada y 4 gramos en galletas) durante dos semanas favorece el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* tanto en hombres como en mujeres en un rango de 18 a 43 años. En la figura 19B, es posible ver que tanto hombres como mujeres presentan un incremento en el recuento de *Bifidobacterium sp* durante el tratamiento con el polímero, aunque en la semana 2, se observa un mayor aumento en las mujeres, para el caso de este microorganismo.

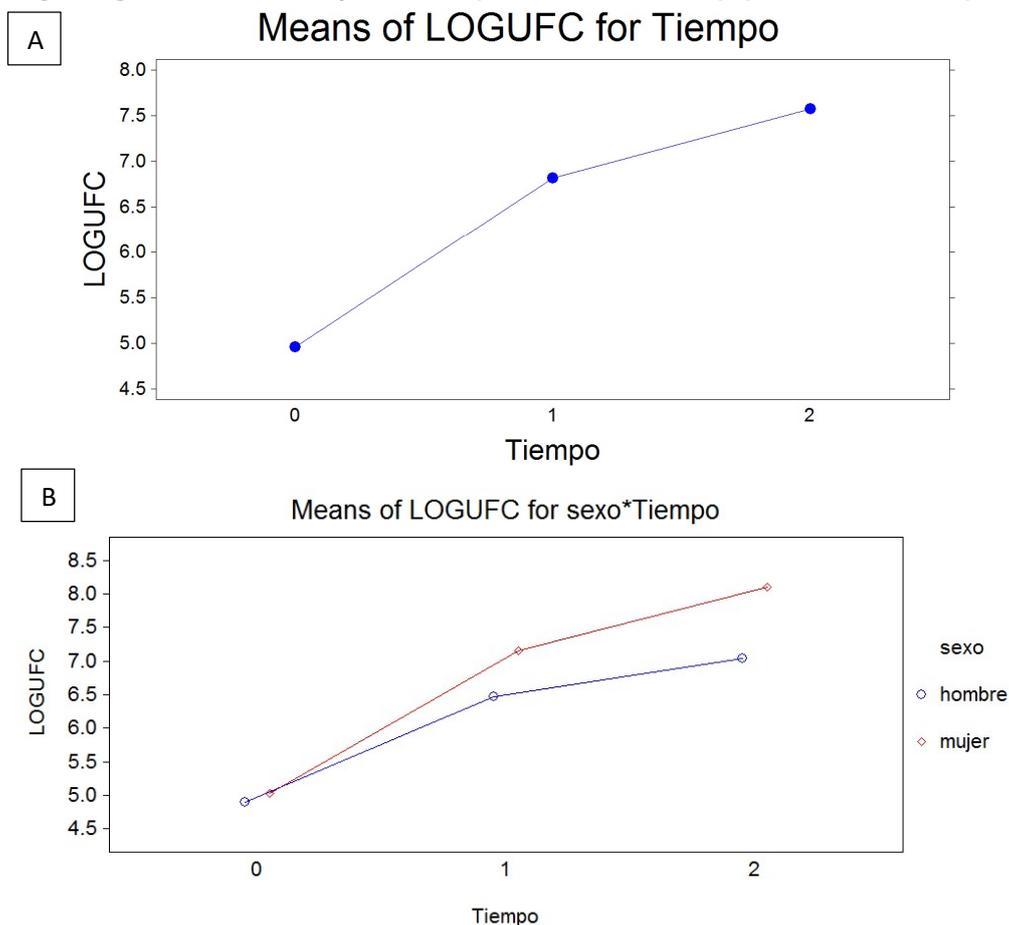
Figura 19. Log UFC/g A. *Bifidobacterium bifidum* en el tiempo, B. *Bifidobacterium sp.* por sexo, en el tiempo.



Fuente: Elaboración propia.

Se puede observar que para el microorganismo *Lactobacillus sp* después del tratamiento a la semana 1 y a la semana 2 del consumo del polímero hay un aumento en el recuento de este microorganismo, en comparación con el recuento inicial antes del consumo del polímero, Figura 20A, se aprecia una tendencia a aumentar en el tiempo a medida que se consume el polímero. En la figura 20B se puede evidenciar que durante el consumo de Bilac® un aumento considerablemente el recuento de *Lactobacillus sp.* y que el recuento es mayor en las mujeres que en los hombres para las dos semanas de tratamiento.

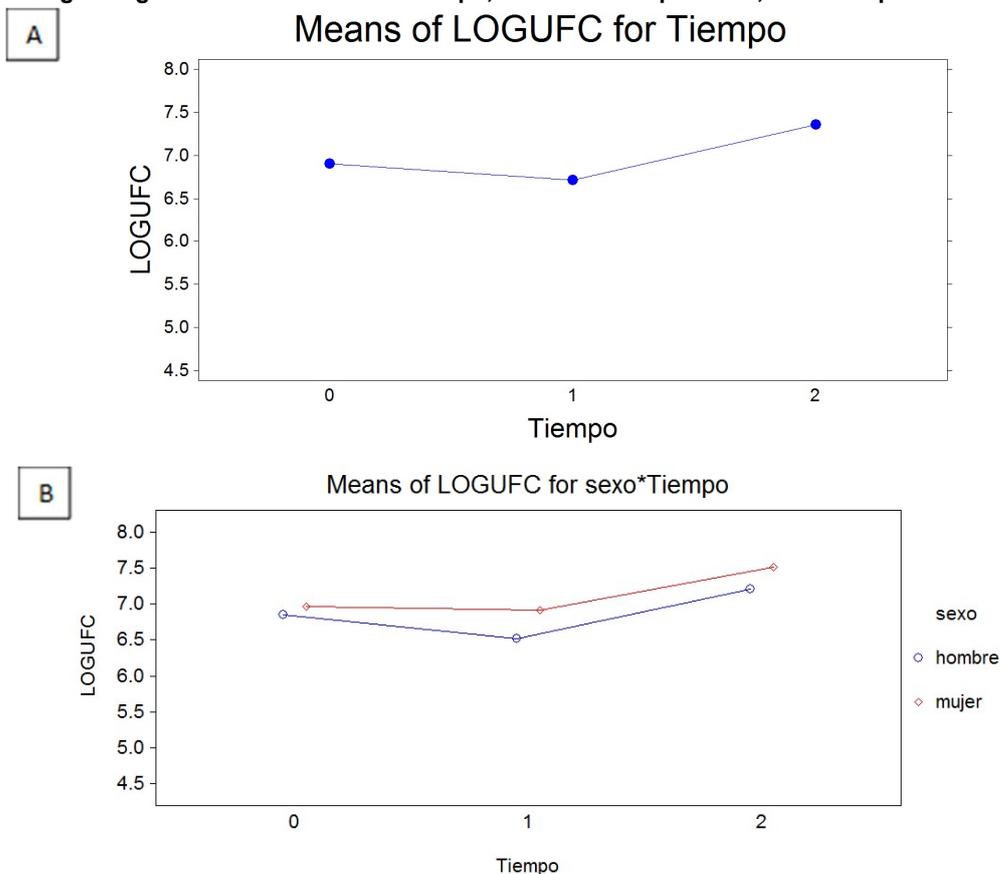
Figura 20. Log UFC/g. A. *Lactobacillus sp.* en el tiempo, B. *Lactobacillus sp.* por sexo, en el tiempo.



Fuente: Elaboración propia.

El recuento de Coliformes presento una leve disminuci3n en la semana 1 con respecto al an3lisis inicial cuando no se hab3a consumido el biopol3mero, y presento un leve aumento en la semana 2 del estudio, figura 21 A, indicando que las variaciones en el tiempo son m3nimas. En la figura 21B, se puede evidenciar que los recuentos de Coliformes se mantuvieron estables durante el tiempo tanto para hombres como para mujeres, y llego a disminuir en la semana 1 m3s en los hombres que en las mujeres, y en la semana 2 los recuentos de Coliformes en los hombres son menores que en las mujeres.

Figura 21. Log UFC/g en A. Coliformes en el tiempo, B. Coliformes por sexo, en el tiempo.



Fuente: Elaboración propia.

### Registro semanal por parte de los voluntarios

Al iniciar el estudio biológico previo al suministro y consumo de los productos con compuesto bioactivo adicionado, se realizó una encuesta a los participantes para evaluar: frecuencia, cantidad y consistencia de las deposiciones, lo que permitió elaborar una línea de base requerida para el seguimiento y evaluación del efecto ejercido por el consumo de la bebida y galleta. En la tabla 13 se puede evidenciar que antes del consumo de Bilac®, el 85,71% de los hombres y las mujeres presentaba una frecuencia diaria de deposición, con una cantidad mediana de heces y. la consistencia de las heces difería según sexo, para las mujeres blanda y para los hombres de consistencia dura.

Tabla 13. Encuesta antes del consumo de la bebida fermentada adicionada con Bilac® y las galletas.

		Hombres	Mujeres
<b>Frecuencia de las deposiciones</b>	Cada tres días	0%	0%
	Cada dos días	0%	0%
	Una vez al día	85,71%	85,71%
	Más de dos veces al día	14,29%	14,29%
<b>Cantidad de heces</b>	Grande	14,29%	14,29%
	mediano	85,71%	71,43%
	pequeño	0%	14,29%
<b>Consistencia de las heces</b>	Duro	57,14%	28,57%
	Blando	42,86%	71,43%
	liquido	0%	0%

Fuente: Elaboración propia.

Así mismo se evidenció que en las semanas 1 y 2 del estudio el 71,43% de los hombres y las mujeres presentaron deposiciones una vez al día, la consistencia fue *formada* para los hombres y *suave* para las mujeres, la cantidad de las heces fue *mediana* para los hombres y *grande* para las mujeres. El 71,43% de los hombres y el 57,14% de las mujeres no reportaron ningún tipo de dolor abdominal; el 57,14% de los hombres presento *flatulencia moderada* y el 42,86% de las mujeres *no reporto flatulencia*. El 57,14% de los hombres y el 42,86% de las mujeres presentaron *saciedad moderada*.

Antes del consumo del polímero los hombres presentaban una consistencia *dura* en las deposiciones y después del consumo reportaron *formado* mas no duro, la cantidad de heces en las mujeres evolucionó de *mediano* a *grande*. La frecuencia de las deposiciones permaneció constante como una vez al día. Adicionalmente después del consumo ninguno reporta ni dolor abdominal, ni flatulencia (mujeres), los hombres reportan flatulencia *moderada*.

Tanto hombres como mujeres reportaron sensación de saciedad a las dos semanas del estudio distribuida de la siguiente manera: *moderada* para el 57,14% de los hombres, *leve* para el 42,86% de los hombres; y *moderada* para el 42,86% de las mujeres, *severa* para el 28,57% de las mujeres y *leve* para el 14,29% de las mujeres.

Tabla 14. Encuesta después del consumo de la bebida fermentada adicionada con Bilac® y las galletas.

		Semana 1		Semana 2	
		Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
<b>Frecuencia de las deposiciones</b>	Cada tres días	0%	0%	0%	0%
	Cada dos días	0%	0%	0%	0%
	Una vez al día	85,71%	42,86%	71,43%	71,43%
	Más de dos veces al día	14,29%	42,86%	14,29%	14,29%
	Dos veces al día	0%	14,29%	14,29%	14,29%
<b>Consistencia</b>	estreñimiento	0%	14,29%	0%	0%
	Duro	14,29%	0%	0%	14,29%
	Formado	57,14%	28,57%	57,14%	28,57%
	Suave	28,57%	42,86%	42,86%	42,86%
	diarrea	0%	14,29%	0%	14,29%
<b>Cantidad de heces</b>	Grande	28,57%	42,86%	42,86%	57,14%
	mediano	71,43%	28,57%	57,14%	42,86%
	pequeño	0%	28,57%	0%	0%
<b>Dolor abdominal</b>	Ninguno	71,43%	28,57%	71,43%	57,14%
	Leve	0%	57,14%	14,29%	28,57%
	moderado	28,57%	14,29%	14,29%	14,29%
	Grave	0%	0%	0%	0%
<b>Flatulencia</b>	ninguno	0%	28,57%	14,29%	42,86%
	Leve	28,57%	14,29%	28,57%	28,57%
	moderado	71,43%	42,86%	57,14%	14,29%
	Grave	0%	28,57%	0%	14,29%
<b>Sensación de saciedad</b>	ninguno	0%	14,29%	0%	14,29%
	Leve	28,57%	14,29%	42,86%	14,29%
	moderado	71,43%	42,86%	57,14%	42,86%
	Severo	0%	28,57%	0%	28,57%

Fuente: Elaboración propia.

## 6 Discusión

### 6.1 Evaluación de la capacidad prebiótica del biopolímero Bilac® en condiciones in vitro.

El microorganismo *Bifidobacterium bifidum* en comparación entre Bilac® e inulina, presentan un conteo de viables similar, los viables de Bilac® al 2% fueron similares a los de inulina al 0,5%, lo cual indica que este microorganismo utiliza el biopolímero como fuente de carbono con un comportamiento similar al de inulina al 0,5%. Al evaluar componentes como prebióticos es importante saber qué cantidad de los microorganismos probióticos con este sustrato son viables. Por tal razón no se hicieron curvas de peso seco sino de viables, requerimiento indispensable para usar este tipo de componentes con el fin de prebiótico.

Inicialmente, al realizar las curvas con absorbancia y tiempo se observó que las absorbancias para inulina eran muy bajas en comparación con el control positivo de glucosa, lo cual indico la importancia de analizar viables en los medios de cultivo utilizados. Cuando se realizaron los patrones en los medios de cultivo MRS, MRS Bilac® y MRS inulina se evidencio que el microorganismo en estos tres medios de cultivo a pesar de tener la misma absorbancia, tenía conteo de viables diferentes, y se pudo evidenciar que mientras en absorbancias muy bajas para glucosa el conteo de viables era bajo, para la misma absorbancia en Bilac® e inulina fueron iguales o incluso superiores a los valores más altos de absorbancia obtenidos en MRS-glucosa.

Esto llevo a pensar que en los medios de cultivo con el reconocido prebiótico inulina y con el prebiótico en evaluación Bilac®, se estaba presentando un cambio en la morfología celular. Por lo tanto, se realizó microscopia electrónica de barrido para los microorganismos probióticos con crecimiento en glucosa y en Bilac®, y se pudo confirmar que el tamaño celular en el medio de cultivo con glucosa es mucho más grande, que el tamaño obtenido en el medio de cultivo con Bilac®.

Esto demuestra porque aun presentando absorbancias similares en los tres medios de cultivo para el mismo microorganismo los conteos de viables son totalmente diferentes.

Los inóculos del microorganismo *Lactobacillus casei* para cada uno de los tratamientos de este estudio presentaron un mayor recuento de viables con Bilac<sup>®</sup> e inulina, sin embargo en el tiempo de fermentación la glucosa presentó un mayor aumento en las unidades formadoras de colonia.

Para el microorganismo *Lactobacillus acidophilus*, se presenta un mayor cambio en el recuento de viables para las tres concentraciones de Bilac<sup>®</sup> en comparación con las 3 concentraciones de inulina, sin embargo, la glucosa a pesar de iniciar con un bajo recuento de viables, a través del tiempo de fermentación presenta un mayor crecimiento en comparación con los demás tratamientos analizados. Esto puede indicar que durante las 24 horas de fermentación con los tratamientos de Bilac<sup>®</sup> e inulina la población se mantiene viable y no decrece, manteniendo de esta forma el conteo de viales e incluso presentando un leve aumento, lo cual es ideal para su potencial uso como prebiótico ya que en el tiempo mantiene la población de los probióticos viable o incluso aumenta un poco.

Roberfroid *et al.* 1998 muestran que tanto la inulina como la oligofruktosa fueron rápida y completamente metabolizados por los microorganismos en los fermentadores. La tasa relativa de fermentación fue similar para ambos sustratos. Un análisis más detallado reveló que la tasa de degradación de oligómeros con un grado de polimerización menor a 10 fue de aproximadamente el doble que de moléculas con un alto grado de polimerización. En el presente estudio se evidenció un resultado similar pues la glucosa fue rápida y completamente metabolizada, lo cual se demostró por la técnica de HPLC, mientras que el metabolismo de Bilac<sup>®</sup> e inulina no presentó una disminución significativa.

Los datos de (Roberfroid *et al.* 1998) indican que la utilización de inulina por *Bacteroides spp*, *Clostridia*, *Enterococci*, *Klebsiellae*, *Lactobacilli*, *Proteus* y *Staphylococcus*, fue más baja que en glucosa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio para el caso de los microorganismos analizados (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*).

Así mismo referencian que ni la oligofruktosa ni la inulina fueron fermentadas en toda su extensión por *Bifidobacterium bifidum*, pero cuando las incubaciones fueron realizadas usando bacterias fecales humanas como inóculo, tanto inulina como oligofruktosa fueron bien fermentadas. Este resultado de los autores coincide con los resultados aquí expresados pues las

fermentaciones se realizaron con cepas de los microorganismos puras, donde tampoco se pudo evidenciar que los polímeros tanto de Bilac® como de inulina fueran fermentados en su totalidad.

Los microorganismos pueden catabolizar muchos hidratos de carbono además de glucosa. Estos hidratos de Carbono pueden proceder del exterior de la célula o de fuentes internas. A menudo, los pasos iniciales de la degradación de polímeros de hidratos de carbono externos difieren de los utilizados con las reservas externas (Prescott, 2005).

Dentro de los monosacáridos (azúcares simples) glucosa, fructosa, manosa y galactosa, los tres primeros son fosforilados utilizando ATP y entran fácilmente en la vía glucolítica. Por el contrario, la galactosa debe convertirse en uridina-difosfato-galactosa después de la fosforilación inicial, y a continuación transformarse en glucosa-6-fosfato en un proceso de tres pasos. Los disacáridos comunes son escindidos en monosacáridos mediante al menos dos mecanismos. La maltosa, la sacarosa y la lactosa pueden hidrolizarse directamente en los azúcares constituyentes. Muchos disacáridos (p. ej. maltosa, celobiosa y sacarosa) también pueden ser escindidos por un ataque con fosfato en el enlace que une los dos azúcares, proceso denominado fosforólisis. Los polisacáridos, al igual que los disacáridos, son escindidos mediante hidrólisis y fosforólisis. Las bacterias y hongos degradan los polisacáridos externos mediante la secreción de enzimas hidrolíticas que escinden los polisacáridos en moléculas más pequeñas que pueden ser asimiladas (Prescott, 2005).

En cuanto a los polímeros de reserva, los microorganismos pueden sobrevivir durante largos periodos en ausencia de nutrientes exógenos. En estas circunstancias catabolizan reservas intracelulares de glucógeno, almidón, poli- $\beta$ -hidroxibutirato y otras reservas de energía. El glucógeno y el almidón son degradados por fosforilasas. Estas enzimas catalizan una reacción de fosforólisis que acorta la cadena polisacáridica en 1 molécula de glucosa y produce glucosa 1-fosfato. Con respecto a los requerimientos nutritivos esenciales por parte de los microorganismos, los análisis de la composición de la célula microbiana revelan que más del 95% del peso seco de la célula está constituido por unos pocos elementos: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio y hierro. Estos se denominan macroelementos o macronutrientes, porque los microorganismos los captan en cantidades relativamente grandes. Los seis primeros (C, O, H, N, S y P) son componentes de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los cuatro macroelementos restantes se encuentran en la célula en forma de cationes y desempeñan diversos papeles (Prescott, 2005).

Es importante destacar que factores ambientales como temperatura, nivel de oxígeno y concentración osmótica del medio son críticos para cultivar con éxito los microorganismos. Además de los macroelementos comunes y elementos traza, los microorganismos pueden tener necesidades especiales que reflejen la naturaleza especial de su morfología o de su hábitat natural.

El carbono es necesario para construir el esqueleto de todas las moléculas orgánicas y, además, las moléculas que sirven como fuente de carbono aportan también, normalmente, átomos de oxígeno e hidrógeno. Es decir, los compuestos de carbono constituyen la fuente de los tres elementos. Por otra parte, ya que estos compuestos orgánicos se encuentran casi siempre reducidos y pueden donar esos electrones a otras moléculas, pueden servir como fuentes de energía. En definitiva, las fuentes de carbono frecuentemente se utilizan además como fuentes de energía, aunque ésta no fuera su utilidad inicial. Con respecto a los factores de crecimiento, normalmente los microorganismos podrán crecer y multiplicarse cuando dispongan de fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo y azufre. Estos organismos tienen las enzimas y vías necesarias para sintetizar todos los componentes celulares que precisan para su mantenimiento adecuado (Prescott, 2005).

Ahora bien, con respecto a las cinéticas de crecimiento celular se puede considerar que en ausencia de formación de productos todo el sustrato que entra a la célula se utiliza para el crecimiento y las funciones de mantenimiento (Doran, 1995).

La velocidad de consumo de sustrato depende en parte de la velocidad de crecimiento pero varía con la concentración de células presentes. Cuando el sustrato se agota, la energía para el mantenimiento es suministrada por medio de un metabolismo endógeno.

#### **6.1.1 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

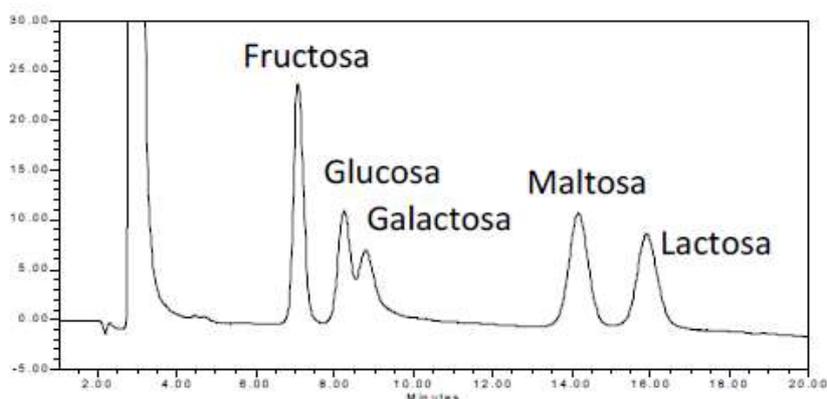
En los últimos años se han desarrollado métodos eficaces para la separación de carbohidratos con ayuda de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La analítica de los carbohidratos no resulta sencilla por que presentan una acumulación de grupos funcionales iguales, los grupos hidroxilo, y además poseen un gran número de estereoisómeros que a menudo sólo se diferencian en la posición de un único grupo hidroxilo. Este aparte concuerda con los resultados aquí obtenidos debido a que fue bastante difícil evidenciar la disminución en la concentración de los carbohidratos a través de las horas de fermentación, específicamente para Bilac® y para Inulina, bajo las condiciones aquí analizadas.

En la literatura se han descrito distintos principios cromatográficos para la separación de azúcares. Los azúcares libres se separan mejor por cromatografía de reparto o sus complejos con borato por cromatografía de intercambio iónico. El método a emplear depende también de si se van a determinar además oligosacáridos de elevado peso molecular o azúcares alcohol. En este caso y según la ficha técnica del Bilac® es bien conocido que Bilac® presenta un alto peso molecular así como muchas ramificaciones.

Para detectar los carbohidratos ya separados se utilizan por lo general detectores de índice de refracción (RI). Para que la determinación sea sensible y selectiva son muy importantes las derivaciones postcolumna (con reactivo de bicinconinato-cobre o de ácido sulfúrico-orcina o reactivo de yodato-acetilacetona) (Matissek *et al.* 1992). En este estudio se utilizó este mismo detector descrito en la literatura.

Al momento de utilizar un equipo HPLC se debe tener en cuenta los parámetros que requiere el fabricante para realizar una cuantificación más acertada, un ejemplo sería los parámetros para un equipo HPLC modelo Waters - 26090 acoplado a un detector de índice de refracción modelo Waters-2414 que según (Abásolo, 2014) debe tener 3 optimizaciones en cuenta para el estudio de carbohidratos los cuales son: Efecto del flujo de fase móvil, efecto de la temperatura de la columna y efecto de la polaridad de la fase móvil. Según los resultados obtenidos existe concordancia con lo descrito en este apartado ya que el manejo de muestras como Bilac® requiere un mayor cuidado debido a que sus características no permitían una filtración apropiada sino a diluciones muy altas.

**Figura 22. Cromatograma de elución de carbohidratos con los 3 parámetros estudiados optimizados (Flujo = 1mL /min, Temperatura de columna= 30° C, % ACN en fase móvil = 75%).**



Fuente: Abásolo, 2014.

Según el autor los parámetros óptimos para una separación correcta de una mezcla de carbohidratos para este equipo HPLC es Flujo fase móvil = 1mL/min, Temperatura de columna = 30° C, % Acetonitrilo en fase móvil = 75% (Abásolo, 2014). Estos parámetros difieren de los utilizados durante la práctica, principalmente por el tipo de HPLC utilizado en las instalaciones es un modelo Shimadzu Prominence con una columna Shodex, Sugar SC-LG, SC1011, por lo que parámetros como utilizar ACN al 75% en fase móvil (Abasolo, 2014) contrastan con el método de azúcares usado en este estudio, en el cual se especifica usar agua como fase móvil para cuantificación de carbohidratos.

Las *Bifidobacterias* consumen más carbohidratos que los *Lactobacilos*, esto se ha demostrado realizando la comparación entre los productos de fermentación de varios tipos de *Bifidobacterias* y *Lactobacilos* en los cuales se han cuantificado la cantidad de ácido láctico y ácido acético que produce cada especie, aunque la fermentación de carbohidratos fue variable entre las cepas analizadas de la misma especie para ambos géneros. Al comprobarse que las cepas de *Bifidobacterias* muestran perfiles de utilización de carbohidratos más diversos en comparación con las especies de *Lactobacillus*. El crecimiento de *Lactobacillus casei* obtenidos no solo por las técnicas de HPLC si no en general de toda la investigación muestran un leve comportamiento superior en comparación con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus*, principalmente el crecimiento se observa para Bilac y inulina, la glucosa tuvo un crecimiento un poco mas discreto pero no estadísticamente nulo, esto se puede comparar con autores como (McLaughlin *et al.* 2015) donde justifica la cepa *Bifidobacterium bifidum* como gran dominante en el crecimiento bacteriano, en ese estudio realizaron un análisis por HPLC para cuantificar la relación de niveles de lactato: acetato producidos por cepas de *Bifidobacterias* durante las fermentaciones de carbohidratos, para este proceso se seleccionaron muestras de medio gastado de cepas que exhibieron un crecimiento  $\geq 0,5$  OD 600 nm en un carbohidrato particular. Los autores utilizaron un sistema HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) con un detector de índice de refracción para cuantificar la producción de lactato y acetato como resultado de la fermentación de carbohidratos, el medio mMRS no fermentado que contenía carbohidratos sirvió como control. Se utilizó una columna de ácido orgánico REXEX 8  $\mu$  8% H (300 mm  $\times$  7,8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.) Y se mantuvo a 65°C. La elución se realizó durante 25 min utilizando una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M a un caudal constante de 0,6 ml/min. Al realizar la cuantificación se observó la tendencia a que la mayoría de las relaciones molares de lactato / acetato para la mayoría de las combinaciones cepa-carbohidrato oscilaron entre 1:2 y 1:10. A pesar de las proporciones molares de lactato / acetatos variables, se observó que en la mayoría

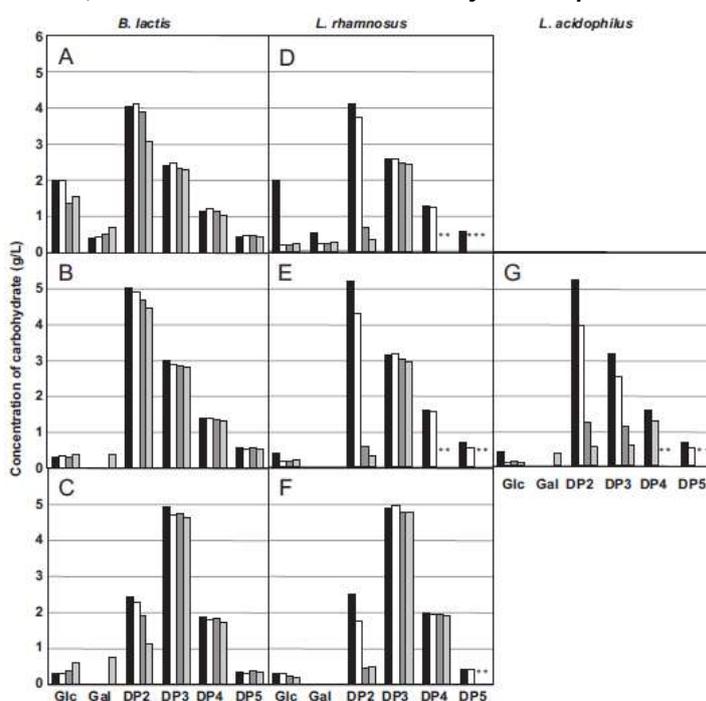
de los casos el ácido acético era el metabolito predominante producido, la especie *Bifidobacteria bifidum* produjo lactato como el principal metabolito de la fermentación de glucosa con relaciones molares de lactato: acetato de 23.326:1 (McLaughlin *et al.* 2015).

El biopolímero Bilac® ha mostrado ser un oligosacárido apto para cumplir una función prebiótica competitivamente con la inulina, por lo que también no se podría descartar en futuros estudios medir la capacidad prebiótica de mezclas Bilac®/inulina en diferentes proporciones con diferentes cepas bacterianas como lo realizó (Watson *et al.* 2013) en un estudio mucho más robusto y complejo donde midió capacidades prebióticas de oligosacáridos como galactoolisacaridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS). Utilizando 68 cepas bacterianas que representan 29 *Lactobacilos* de origen humano y 39 *Bifidobacterias* determinó su capacidad para metabolizar 10 carbohidratos diferentes, el análisis del crecimiento y la actividad metabólica se realizó utilizando una combinación de parámetros de diagnóstico, como la DO 600 final, el pH final, los productos finales de fermentación y la tasa de crecimiento. Este estudio utilizó cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAE). Al realizar las diferentes pruebas se determinó que los galactoolisacaridos (GOS) prebiótico muy importante en la leche materna y la lactulosa un isómero de la lactosa que se forma en el calentamiento intenso de la leche, apoyan las características de crecimiento para *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*, en cambio prebióticos como la inulina, maltodextrina y polidextrosa se observó un crecimiento muy pobre por lo que no se les realizó cuantificación por HPAE. Las mezclas de GOS / inulina (9:1) y fructooligosacáridos (FOS) / inulina apoyaron en su mayoría capacidades de crecimiento similares a las obtenidas para GOS y FOS, respectivamente (Watson *et al.* 2013).

Es importante conocer las cantidades y concentraciones adecuadas para lograr tener una capacidad prebiótica óptima, además de determinar con cual cepa bacteriana tiene un comportamiento simbiótico superior, el Bilac® mostro que a mayor concentración mayor es el consumo por parte de las cepas bacterianas, entre la que destaca *Lactobacillus Casei*. Se sugiere la realización de estudios de actividad prebiotica de Bilac con diferentes grados de polimerización para determinar si la cantidad de monómeros del biopolímero influye en la capacidad prebiotica con diferentes cepas bacterianas incluyendo *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*, algo muy parecido a como (Sims *et al.* 2014) hizo con varios oligosacáridos prebióticos por cepas probióticas de *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* con el fin de determinar el potencial simbiótico de varias combinaciones prebióticas / probióticas. Ese estudio se realizó con análisis por HPLC y cromatografía de intercambio

aniónico de alto rendimiento del medio libre de células tomado durante el crecimiento de las tres bacterias probióticas mostró diferencias en el consumo de los diversos oligosacáridos. Los oligosacáridos unidos se eluyeron de la columna con etanol al 50% v/v hasta que no se pudieron detectar más carbohidratos, se redujo el volumen del eluyente mediante evaporación rotatoria y se liofilizó. *B. lactis* HN019, *L. rhamnosus* HN001 y *L. acidophilus* NCFM se obtuvieron del Centro de Investigación y Desarrollo de Fonterra (Palmerston North, Nueva Zelanda) y se mantuvieron en medio MRS cultivado a 37°C en frascos anaeróbicos que generan una atmósfera anóxica. El análisis por HPLC se realizó en una columna Rezex RNO con los oligosacáridos con sus grados de polimerización (DP) que varían entre 1-5. A continuación se observa la concentración de galactooligosacáridos en diferentes tiempos de incubación con las bacterias tratadas.

**Figura 23.** La concentración de galactooligosacáridos a 0 (negro), 6 (blanco), 18 (gris oscuro) y 30 h (gris) por *Bifidobacterium lactis* HN019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *L. acidophilus* NCFM.



Fuente: Sims *et al.* 2014.

A y D, Vivinal GOS; B, E y G, Vivinal GOS [-glc]; C y F, azúcar Nissin GOS. \* Indica que la cuantificación no es posible debido a la coelución con otros componentes en el medio.

Cuando se cultivó en Vivinal GOS, *B. lactis* consumió aproximadamente el 13% del total de carbohidratos en el medio. La concentración de glucosa en el medio de estos cultivos disminuyó, mientras que la de galactosa aumentó (Fig. A). La concentración de disacárido disminuyó de 4.0 g/L a 3.1 g/L a las 30 h, mientras que la concentración de los oligosacáridos superiores (DP 3 a

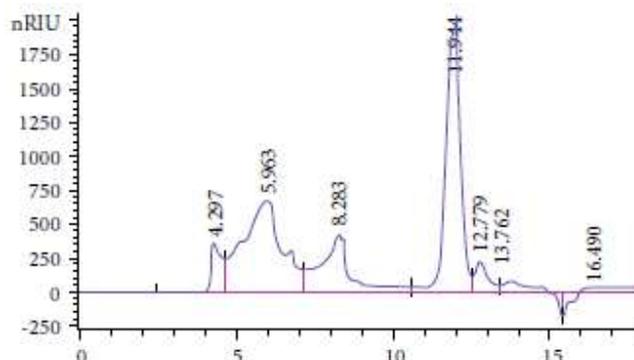
5) disminuyó en un grado mucho menor (Fig. A). Se observaron patrones similares de consumo de oligosacáridos para *B. lactis* que crece en Vivinal GOS [-glc] y Nissin GOS, con disminuciones en las concentraciones de disacáridos, pero sólo reducciones muy pequeñas en las concentraciones de oligosacáridos superiores (Fig. B y C).

Los dos *Lactobacilos* probados consumieron la mayoría de los mono y disacáridos en el medio cuando se cultivaron en GOS, con o sin glucosa (Fig. D a G). El análisis de HPLC indicó que las concentraciones de oligosacáridos superiores (DP 3 a 5) disminuyeron solo en una pequeña medida (6%) durante la fermentación por *L. rhamnosus* (Fig. D a F), pero *L. acidophilus* también consumió más del 80% del trisacárido presente en el medio (Fig. G). La coelución de oligosacáridos superiores (DP 4 y 5) con otros compuestos presentes en el medio significó que la cuantificación de estos oligosacáridos por HPLC no era posible.

El análisis de galactooligosacáridos mostró que tanto *L. rhamnosus* como *B. lactis* consumían principalmente mono y disacáridos, mientras que *L. acidophilus* consumía oligosacáridos hasta trisacáridos. Tanto *B. lactis* como *L. acidophilus* utilizaron fructooligosacáridos e inulina, pero mostraron diferentes patrones de consumo de oligosacáridos. Sólo *L. rhamnosus* creció sobre oligosacáridos de  $\beta$ -glucano y preferentemente consumió el trisacárido. Los resultados indican el potencial simbiótico de las diversas combinaciones de probióticos / prebióticos, en particular *L. acidophilus* / galactooligosacáridos, *L. acidophilus* / fructooligosacáridos o inulina y *L. rhamnosus* / oligosacáridos  $\beta$ -glucano (Sims *et al.* 2014).

Así como anteriormente se sugirió trabajar el Bilac® en diferentes grados de polimerización para optimizar la capacidad prebiótica en función de la cantidad del biopolímero, también se sugiere efectuarlo con inulina como lo reporta Zeaiter *et al.* 2019, en el cual determino el grado de polimerización de inulina mediante HPLC Agilent 1100 equipado con un detector de índice de refracción Agilent. Se utilizó una columna PolySep-GFC-P 5000 Phenomenex (7,8 mm x 300 mm) con agua desgasificada ultra pura como fase móvil a un caudal de 0,8 ml / min. La temperatura de la columna se fijó en 25 ° C y el volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l. Por tanto, se eligieron 4 patrones de polisacáridos, 3 dextranos y 1 nistosa, por sus pesos moleculares específicos y por su similitud con la estructura molecular de la inulina. En ese estudio se utilizó inulina obtenida de brácteas y tallos de alcachofa.

Figura 24. Cromatograma HPLC-RID de inulina de extracto de desecho de alcachofa (tallo).



Fuente: Zeaiter *et al.* 2019.

Se determinó el PM de los fructanos de tipo inulina de los extractos de desecho de bráctea y tallo estableciendo el tiempo de retención de los picos en el cromatograma y luego calculando el PM. Dado que la estructura de la inulina consta de un esqueleto lineal de restos de fructosa repetidos unidos a un resto de glucosa terminal, el DP se determinó dividiendo el PM del polímero de inulina por el PM del monómero de fructosa.

El gráfico muestra un pico principal con un promedio de DP de 32-42 que representa la inulina; los otros picos muestran tiempos de retención que no corresponden al DP máximo de los polímeros de inulina que se encuentran en la alcachofa de globo.

Los resultados muestran que este método proporciona extractos de alcachofa con un contenido de fructanos tipo inulina del 70% con un DP promedio entre 32 y 42 tanto en brácteas como en tallos. El efecto prebiótico de las inulinas de cadena larga de los desechos del extracto de alcachofa se demostró por su capacidad para apoyar el crecimiento de cinco especies de *Lactobacillus* y cuatro de *Bifidobacterium*, previamente caracterizadas como probióticos. Además, se consideró la posibilidad de industrializar el proceso desarrollando un método más simple para la producción de fructanos de tipo inulina a partir de los desechos de alcachofa, de modo que la preparación de inulina de alcachofa pudiera ser adecuada para su uso en formulaciones (Zeaiter *et al.* 2019).

### 6.1.2 Observación por microscopía electrónica de barrido (SEM)

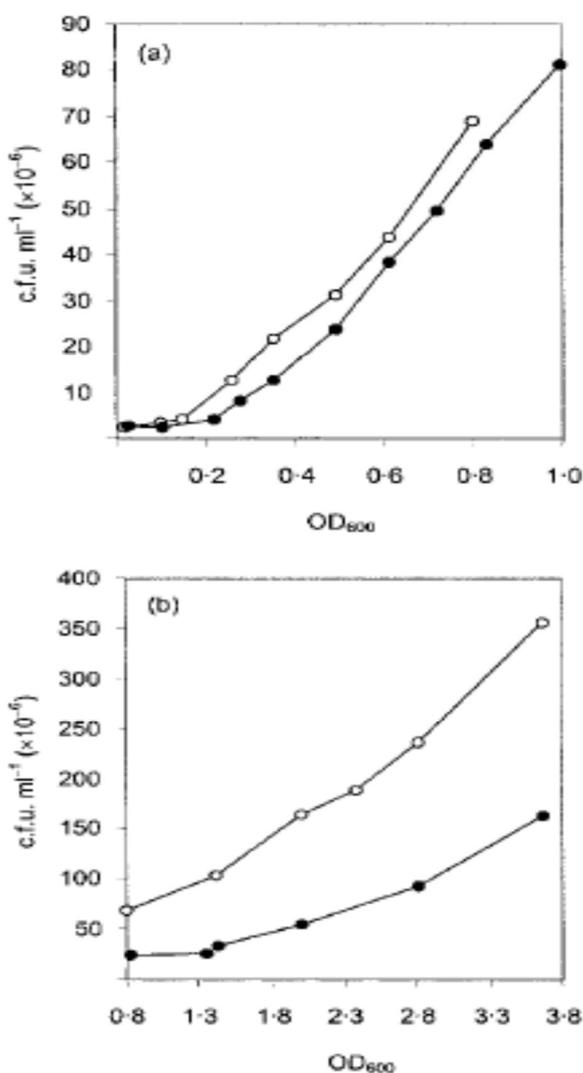
Los *Lactobacilos* son células que varían de bastoncillos muy cortos (casi cocoides) a muy largos, de delgados a moderadamente gruesos. Con frecuencia se doblan y pueden estar presentes como células simples o en cadenas cortas o largas.

En artículos previos se menciona que los microorganismos usados durante la producción de alimentos fermentados son sujeto de stress abiótico. La supervivencia microbiana durante esos procesos depende fuertemente de la habilidad de las células para adaptarse y llegar a ser tolerantes a las condiciones medioambientales. Relacionando lo anteriormente descrito, el estudio de las bacterias probióticas con Bilac® en caldo MRS mostro la tendencia a formar estructuras tipo cocos, mientras que en caldo MRS (glucosa) se evidencio la formación de bacilos cortos pero con un tamaño celular mayor a el Bilac®, para poder tener un mejor estudio morfológico de los microorganismos en la fermentación de Bilac® sería pertinente hacer un estudio en donde se determine el crecimiento microbiano con Bilac® a diferentes parámetros como temperatura y pH como el estudio de (Neysens *et al.* 2003) los cuales fueron realizados con *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, una cepa potencial por su comportamiento en fermentaciones bajo condiciones desfavorables como bajas temperaturas, pH desfavorable y altas concentraciones de sales. Este estudio mostro patrones de crecimiento bifásicos. En ese caso la microscopia electrónica fue usada para investigar el cambio en la morfología observada al nivel celular. Las células en forma de bacilos cambiaron a células elongadas que crecían en cadenas. Los cambios en las colonias y en la morfología celular coincidían con el patrón de crecimiento bifásico (Neysens *et al.* 2003).

El crecimiento limite y la capacidad frente al stress de *L. amylovorus* DCE 471 fue explorado desde un punto de vista cinético. Primero, los parámetros biocinéticos característicos para el crecimiento y la producción de bacteriocinas fueron calculados para describir la influencia del stress medioambiental causado por temperatura, pH y condiciones de sales desfavorables que resultaron en cinéticas de fermentación bifásicas. Segundo, las cinéticas de fermentación bifásicas fueron explicadas por una respuesta al stress y resistencia al stress que coincidió con una alteración en las colonias y en la morfología celular. Para explicar el inusual comportamiento de crecimiento bifásico de *L. amylovorus* DCE 471 bajo condiciones subóptimas de crecimiento, los autores (Neysens *et al.* 2003) realizaron una fermentación en presencia de 3% NaCl. Basados en ese experimento, concluyeron que el número y la forma de las diferentes colonias eran afectadas por las condiciones de stress a las cuales la bacteria fue sometida. Las placas de las muestras tomadas durante la primera fase de crecimiento, en agar con maltosa y fructuosa, presentaban colonias relativamente grandes y planas, mientras que las colonias durante la segunda fase de crecimiento fueron visualmente más pequeñas y lisas.

Los autores muestran en la figura 25 la correlación entre el valor de densidad óptica a 600 nm y el recuento en placa en UFC/ml. Durante la primera fase de crecimiento los números de UFC de los dos tipos de colonias bacterianas fueron comparables (figura a). Por ejemplo, a un valor de densidad óptica de 0.6, encontraron recuentos de  $3.8 \times 10^7$  y  $4.4 \times 10^7$  UFC/ml en medio SSM conteniendo 3% de NaCl y un medio no suplementado respectivamente (Neysens *et al.* 2003).

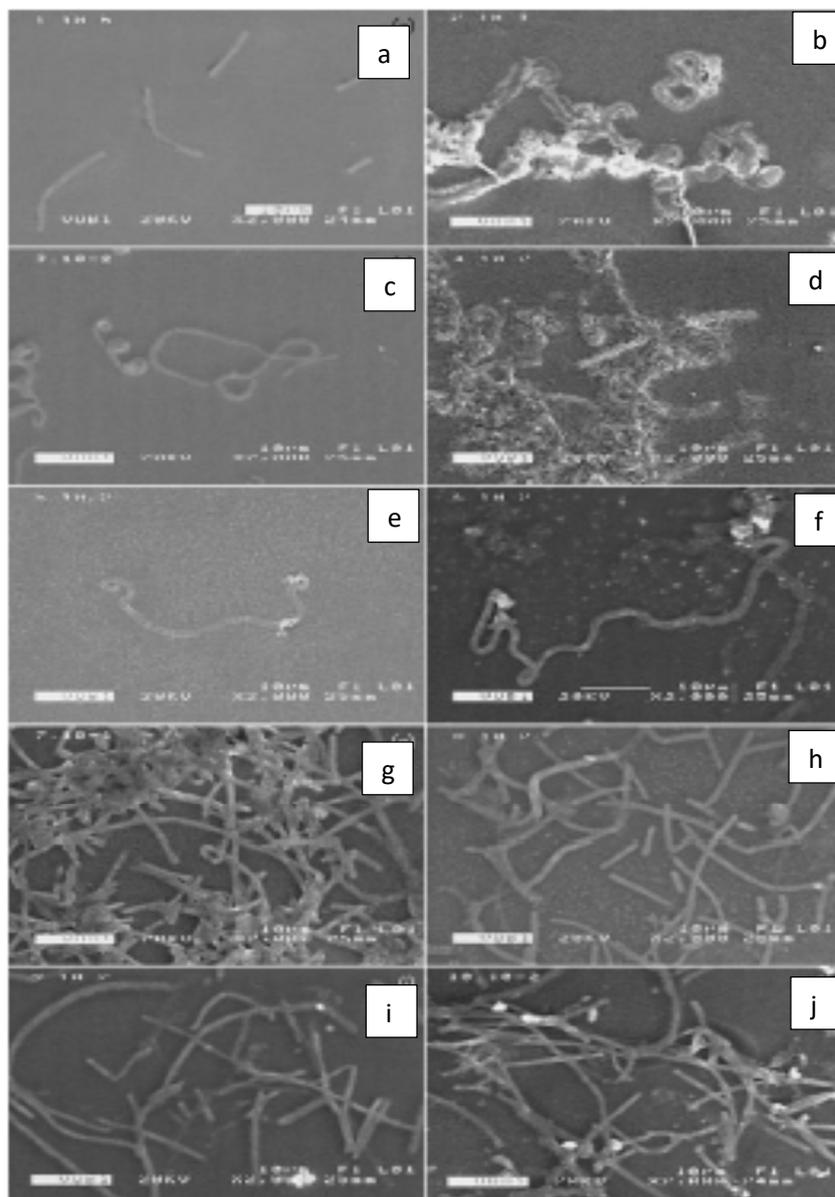
**Figura 25. Correlación entre valor de OD 600 y UFC/ml de *L. amylovorus* DCE 471 creciendo a una temperatura controlada de 37°C y una constante de PH 5.4 en la ausencia (○) y en la presencia (●) de 3.0% (p/v) NaCl durante (a) la primera fase de crecimiento y (b) la segunda fase de crecimiento.**



Fuente: Neysens *et al.* 2003.

Según los autores del estudio (Neysens *et al.* 2003), a nivel de microscopía electrónica, las células bacterianas presentes en el inóculo preparadas en medio sin sal, se mostraron como células con forma de bastón (figura 26a). Después de la inoculación, en un medio enriquecido con NaCl las células tuvieron que adaptarse al medio de crecimiento. Inicialmente se presenta la lisis de las células que no son capaces de adaptarse (figura 26b), mientras que algunas células viables obtenidas durante la primera fase de crecimiento activo tuvieron una forma más rizada y trenzada (figura 26c). El crecimiento de este biotipo de forma irregular cesó después de 9 horas de fermentación, el cual fue seguido de una fase estacionaria perdurable hasta las 37 horas. Al comienzo de esta fase, la lisis celular podría ser claramente observada (Figura 26d), seguido por la recuperación gradual de la población bacteriana restante (figura 26e). Durante la fase estacionaria, un cambio al mejor adaptado, menos sensible al NaCl, mostro el biotipo regular. Los resultados de la microscopia electrónica de este biotipo liso mostraron una morfología elongada, menos curvas, filamentosas formando grupos con las células bacterianas con tendencia a formar cadenas. Esta morfología resulto en la reducción del conteo de células. Estos experimentos y observaciones fueron reproducibles y similares para stress generado por valores de pH y temperaturas subóptimas (Neysens *et al.* 2003).

Figura 26. Influencia a nivel celular de 3.0% (p/v) NaCl sobre las características morfológicas de *L. amylovorus* DCE 471 en medio SSM a una temperatura constante de 37°C y pH 5.4 determinado por microscopía electrónica.<sup>1</sup>



Fuente: Neysens *et al.* 2003.

<sup>1</sup> Todas las observaciones fueron hechas a una magnificación de 2000. Las muestras fueron tomadas a intervalos de tiempo específicos después del comienzo de la fermentación (a). Pre cultivo usado para la inoculación (b) después de 6 horas (c) después de 10 horas (d) después de 21 horas (e) después de 33 horas (f) después de 45 horas (g) después de 56 horas (h) después de 63 horas (i) después de 74 horas (j) después de 80 horas.

### 6.1.3 Determinación de la viabilidad de bacterias probióticas en una bebida láctea fermentada con el biopolímero Bilac®

Se utilizaron los microorganismos *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*, para la elaboración del kumis. La subespecie *cremoris* puede diferenciarse de la subespecie *lactis* por su incapacidad para crecer a 40°C en NaCl a 4%. Fermenta la ribosa e hidroliza la arginina para producir NH<sub>3</sub>. Los estreptococos son anaerobios facultativos y en un extracto de glucosa pueden reducir el pH a 4,0 y producir ácido L (+) láctico. Fermentan fructosa, manosa y lactosa, pero no suelen fermentar galactosa ni sucrosa. Las células pueden sobrevivir a 60°C por 30 minutos. Se desconoce su hábitat natural, aunque se encuentran en la leche.

Los *Lactobacilos* son anaerobios facultativos gram positivos. En la vía homofermentativa estricta se produce sobre todo ácido láctico y en la heterofermentativa se produce ácido láctico y grandes cantidades de otros productos. La vía heterofermentativa estricta produce lactato, acetato, etanol, CO<sub>2</sub> y la vía heterofermentativa facultativa produce lactato, o lactato, acetato, etanol, CO<sub>2</sub>, formiato. *Lactobacillus casei* ssp. *casei* utiliza la vía heterofermentativa facultativa produciendo, lactato, o lactato, acetato, etanol, CO<sub>2</sub>, formiato. Los lactobacilos mientras crecen en glucosa dependiendo de la especie, producen solo ácido láctico (L+ D- o DL) o una mezcla de ácido láctico, etanol, ácido acético y CO<sub>2</sub>, algunos también producen diacetil. En este estudio uno de los análisis realizados fue la determinación del porcentaje de ácido láctico en los tratamientos con bilac, inulina y control donde se evidenció una alta producción del mismo por parte de los microorganismos evaluados *L. casei*, *L. acidophilus* y *B bifidum*.

Muchas especies de Lactobacilos utilizan lactosa, sucrosa, fructosa o galactosa y algunas pueden fermentar pentosas. La temperatura de crecimiento puede variar de 1 a 50°C, pero casi todas las que se usan como cultivos iniciadores en la fermentación controlada de los alimentos a baja temperatura pueden crecer bien de 25 a 40°C. Varias especies incluidas en la fermentación natural de algunos alimentos a baja temperatura pueden crecer de 10 a 25°C.

Mientras crecen en carbohidratos metabolizables dependiendo de la especie, el pH puede reducirse entre 3,5 y 5,0, esto pudo evidenciarse con *Lactobacillus casei* y con *Lactobacillus acidophilus* en el kumis pues el pH descendió a 4,5 aproximadamente, en las fermentaciones.

*Bifidobacterium bifidum* requiere para su crecimiento en medios selectivos de la adición de L-cisteína (0,05-0,1%) por ser un aminoácido esencial para *Bifidobacterium* sp., que se encuentra en la leche materna. *Bifidobacterium* sp. crece en los medios de cultivo selectivos con los

antibióticos ácido nalidíxico y sulfato de neomicina, añadidos al medio de cultivo utilizado NNLP (sulfato de neomicina, sulfato de paramomicina, cloruro de litio y ácido nalidíxico), estos antibióticos inhiben a *Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*. Debido a esto se utilizó este medio de cultivo para el recuento de este microorganismo en el Kumis, para poderlo diferenciar de los microorganismos propios en la elaboración del kumis. Por lo tanto, el sulfato de neomicina y el ácido nalidíxico fueron incluidos en el medio de cultivo, como agentes selectivos para inhibir el crecimiento de gram positivos y bacilos gram negativos respectivamente.

#### **6.1.4 Cuantificación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Como se mencionó anteriormente en el capítulo de resultados, los datos obtenidos en este ensayo no fueron concluyentes. Según lo reportado en la bibliografía, esto pudo deberse entre otros factores que para la determinación de la disolución patrón la preparación de las muestras se debe tener en cuenta su contenido en grasa y proteína. En el caso de alimentos con un contenido en grasa y proteína elevados es necesario someter a proceso de desgrasado con éter de petróleo (u otro solvente orgánico). La proteína se elimina por clarificación de la muestra tratada con agua caliente con los reactivos de Carrez I y II. La concentración de cada azúcar debe ser de un 1 a un 5% para un volumen inyectado de 10 µl. Los picos del cromatograma obtenido se identifican por comparación con los tiempos de retención de las sustancias de referencia (Matissek *et al.* 1992). Según lo anterior la forma de preparación preliminar de las muestras para la curva patrón empleadas en el presente ensayo no permitieron obtener los resultados esperados por ser una mezcla altamente compleja.

Así mismo lo menciona el autor Quattrocchi *et al.* 1992: La determinación cuantitativa se lleva a cabo mediante patrón externo con las sustancias correspondientes. Las disoluciones patrón para el trazado de la curva patrón deben ser acuosas al 1-5%. Adicionalmente la preparación de la muestra es una etapa muy importante dentro del análisis cuantitativo. Debido a la diversidad de situaciones que pueden presentarse dependiendo de la concentración de analito y la naturaleza de la matriz de la muestra. Esto confirma una vez más que la matriz de las muestras usadas en este estudio leche – kumis requieren una preparación cuidadosa y apropiada.

Debido a que en este estudio, como se ha dejado claro anteriormente en varios apartes, no se llegó a resultados concluyentes con la técnica de HPLC bajo las condiciones analizadas, se

realizó una detallada revisión bibliográfica en donde se ejecutaron ensayos similares a los aquí planteados, los cuales pueden servir como línea base para elaboración de futuros trabajos y se relacionan a continuación:

Estudios de hace algunas décadas demostraron el efecto prebiótico en el crecimiento probiótico de productos lácteos, utilizaron cepas como: *Lactobacillus rhamnosus* aislada de leche NAN, *Lactobacillus rhamnosus* GG de cápsulas Culturelle, *Lactobacillus casei* Shirota de Yakult, *Lactobacillus acidophilus* de Kultai, *Lactobacillus johnsonii* de Chamyto y *Lactobacillus casei* de Bio 4. Utilizando un medio de cultivo que contenía 1% del prebiótico (lactulosa, inulina u Oligomate 55®), 0.5% de peptona de caseína y 0.3% de extracto de levadura. El crecimiento de los microorganismos se determinó con la siembra en placa en agar MRS mediante la técnica de Miles y Misra. Para cuantificar el consumo del prebiótico se utilizó la técnica HPLC, se comparó el crecimiento de las seis cepas probióticas en medios suplementados con distintos prebióticos y un azúcar no prebiótico (lactosa) como control. Compararon el consumo del prebiótico a través del índice prebiótico (Ipreb) que compara el crecimiento de una población que consume un prebiótico con el mismo parámetro utilizando un carbohidrato control.

**Tabla 15. Índice prebiótico de lactulosa, inulina y Oligomate 55® con diferentes microorganismos.**

Microorganismo	Ipreb		
	Lactulosa	Inulina	Oligomate 55®
<i>L. casei</i> Shirota	0.82	0.36	0.77
<i>L. casei</i>	1.10	1.37	1.15
<i>L. johnsonii</i>	1.60	6.00	4.66
<i>L. acidophilus</i>	1.74	2.17	2.47
<i>L. rhamnosus</i> GG	1.30	2.04	4.79
<i>L. rhamnosus</i>	1.12	2.39	5.57

Fuente: Figueroa *et al.* 2009.

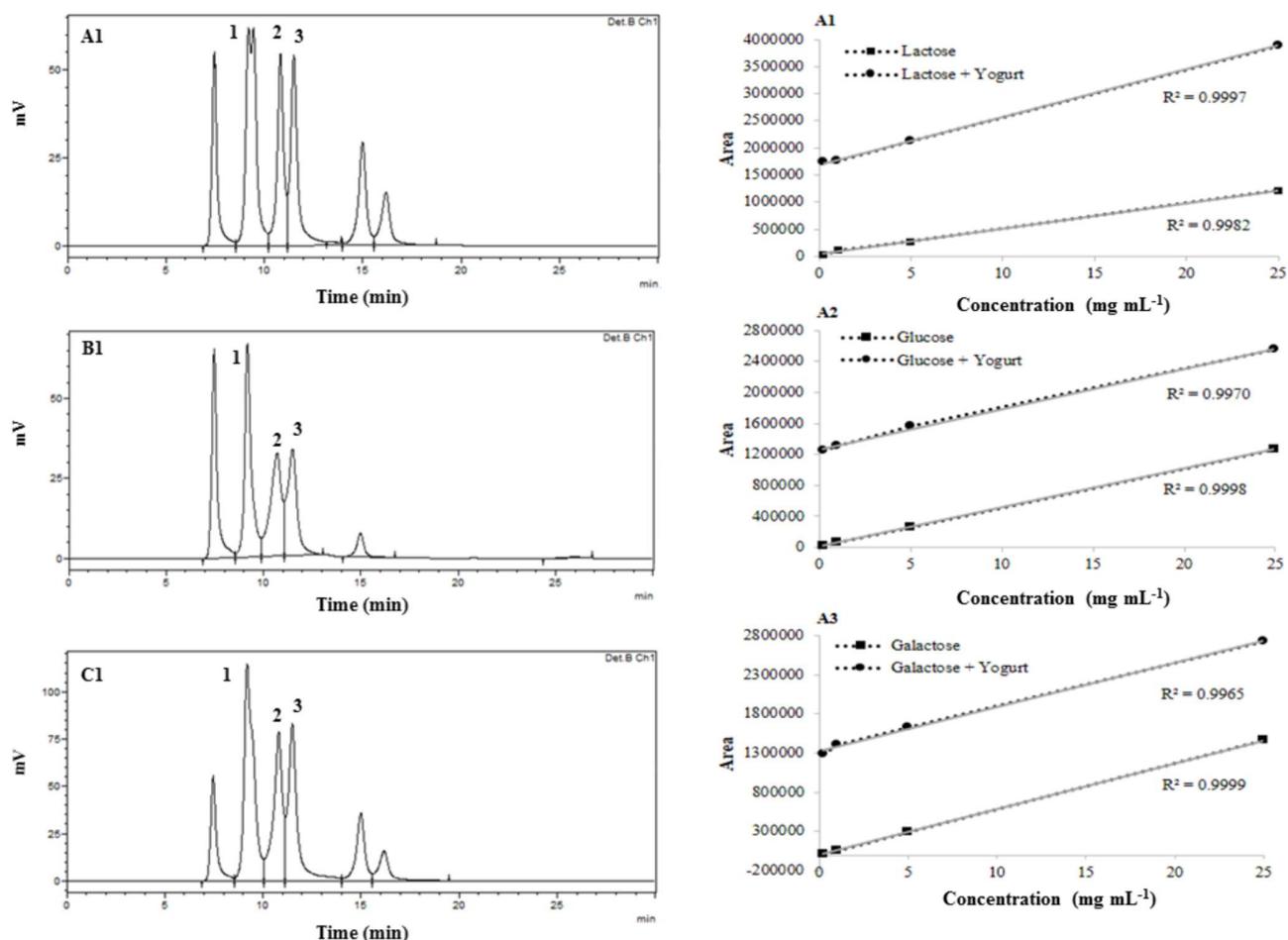
De acuerdo con la cuantificación por HPLC y deduciendo el Ipreb teniendo en cuenta que si este valor es mayor a 1 indica un efecto prebiótico, según lo observado en la tabla no se observó efecto prebiótico sobre el crecimiento de *L. casei* Shirota, además, la inulina y el Oligomate 55® mostraron un mayor efecto que la lactulosa, y, para casi todos los casos el Ipreb fue mayor con Oligomate 55® (a excepción de *L. johnsonii*) (Figueroa *et al.* 2009).

Un estudio muy completo muestra un análisis detallado sobre la cantidad de carbohidratos y ácidos orgánicos durante la fermentación de yogures de leche de cabra utilizando HPLC-DAD-RI (cromatografía líquida de alta resolución simple, sensible y reproducible con detectores

duales, detector de matriz de diodos e índice de refracción). La separación de todos los compuestos se realizó en una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9  $\mu\text{m}$ ) utilizando una fase móvil acuosa de ácido sulfúrico L-1 de 3 mmol en condiciones isocráticas. El sistema cromatográfico consistió en una bomba LC-20AT integrada con el controlador CBM-20A y un detector de matriz de diodos SPD-M20A en línea con el detector serial de índice de refracción RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Japón). Para la aplicación del método se elaboraron seis yogures de leche de cabra: natural, probiótico, prebiótico, simbiótico, pulpa de copuassu y probiótico con pulpa de copuassu. Se separaron cromatográficamente alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  (volumen de inyección) a 0,5 mL.min<sup>-1</sup> (velocidad de flujo), a una temperatura constante de 60°C (temperatura de la columna). El tiempo de ejecución total fue de 30 minutos en el que el último analito eluyó a los 15,8 minutos y los otros 14 minutos se utilizaron para equilibrar los detectores para la siguiente inyección. Se corrió una solución acuosa de 30 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico (pH 1,66  $\pm$  0,01) durante 10 min cada tres muestras para lavar el sistema de HPLC. Los carbohidratos se identificaron comparando el tiempo de retención cromatográfica de los picos individuales con sus respectivos estándares comerciales. Mientras que la cuantificación se realizó con base en el método estándar externo utilizando índice de refracción para estimar el contenido de cada carbohidrato individual.

La metodología analítica validada en este estudio se aplicó para estimar los contenidos de carbohidratos y ácidos orgánicos en yogures de leche de cabra adicionados con pulpa de cupuassu (CUP y PWC), probiótico (PRO y SYM) y prebiótico (PRE y SYM) durante el proceso fermentativo. La selectividad se evaluó comparando la respuesta de los detectores entre las soluciones de trabajo de analitos estándar en agua a diferentes concentraciones (25, 5.0, 1.0 y 0.125 mg mL<sup>-1</sup>) y yogures NAT enriquecidos con las mismas soluciones de trabajo en las concentraciones antes mencionadas. Para determinar la linealidad del método HPLC, las muestras NAT se enriquecieron con soluciones estándar a 10 concentraciones diferentes de cada estándar en tres repeticiones.

Figura 27. Cromatogramas HPLC de carbohidratos y curva de calibración de carbohidratos con muestra de yogurt.



Fuente: Costa *et al.* 2016.

Se observan cromatogramas típicos de carbohidratos (A1, B1 y C1).

(A) Mezcla estándar de compuestos individuales en concentraciones de 0.05 mg mL<sup>-1</sup>.

(B) Yogur de leche de cabra natural.

(C) Yogur de leche natural de cabra fortificado con 0.05 mg mL<sup>-1</sup> de cada analito.

Los números sobre picos cromatográficos indican lactosa (1), glucosa (2) y galactosa (3) En leche entera de cabra, los valores de carbohidratos, en mg g<sup>-1</sup>, fueron: 58.923 ± 1.042 para lactosa, 0.323 ± 0.014 para glucosa, 0.113 ± 0.027 para galactosa.

En los yogures los tiempos de retención medios en minutos fueron 9.187 ± 0.052 para lactosa; 10,799 ± 0,088 para glucosa; 11,477 ± 0,031 y para galactosa; 9,112 ± 0,068.

Debido a que los picos asociados con los tres analitos podían distinguirse de los otros compuestos detectados en el yogur de leche de cabra y los tiempos de retención eran los mismos en la matriz y la solución estándar, el método se consideró selectivo.

En cuanto a la estabilidad de las soluciones madre, los resultados confirmaron que las soluciones se mantuvieron estables durante los nueve días. Además, la muestra procesada se mantuvo estable durante cinco días en refrigeración a 4°C, en los que no se observaron cambios ( $P > 0.05$ ) en el contenido de carbohidratos.

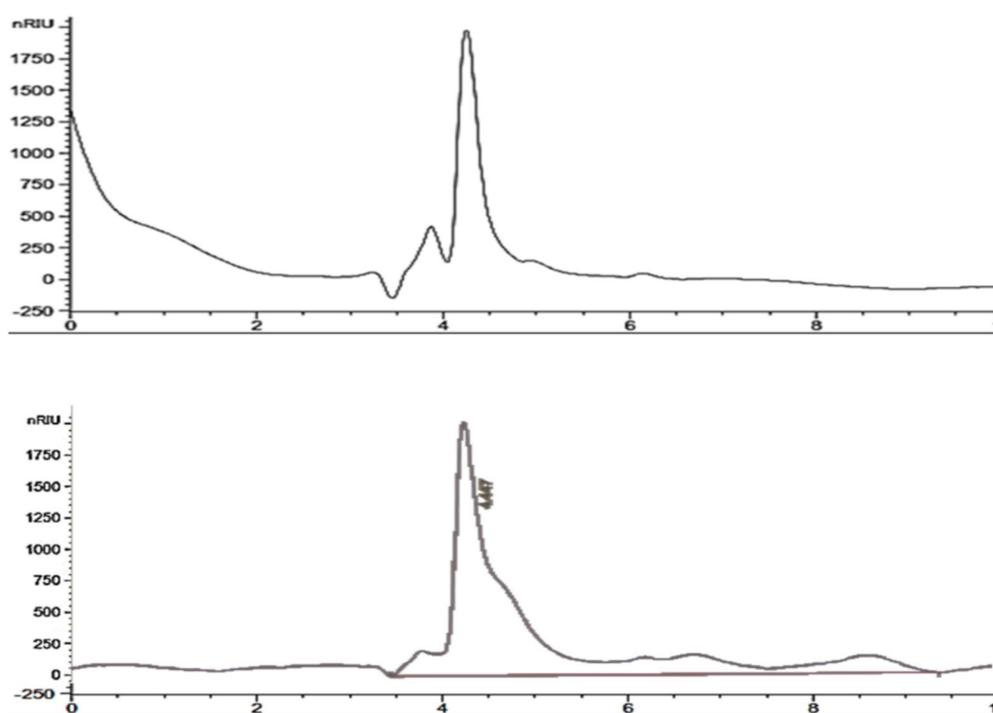
Entre los carbohidratos investigados, todos los tratamientos mostraron una tendencia similar para el contenido de lactosa: cuanto más largo es el período de fermentación, menor ( $P < 0.05$ ) es el contenido de lactosa. La inclusión de pulpa de inulina y cupuassu probablemente favoreció el metabolismo bacteriano, ya que los tratamientos PRE, SYM, CUP y PWC exhibieron una fuerte pendiente en el contenido de lactosa. Además, estos tratamientos antes mencionados demostraron una disminución ( $P < 0.05$ ) en este contenido de carbohidratos a los 30 minutos de fermentación mientras que los yogures PRO y NAT lo fueron, respectivamente, a los 60 y 150 minutos. Además, al final de la fermentación, los yogures CUP y PWC presentaron los valores más bajos ( $P < 0.05$ ) de lactosa, mientras que PRE y SYM los más altos ( $P < 0.05$ ). Aunque la lactosa se considera el sustrato más común para el metabolismo de los lactobacilos, algunas cepas pueden metabolizar los oligosacáridos y la inulina de cadena larga. En los tratamientos PRE, SYM, CUP y PWC a los 30 minutos de período de fermentación, el contenido de galactosa mostró un aumento ( $P < 0.05$ ) mientras que el contenido de lactosa disminuyó ( $P < 0.05$ ). Considerando que, NAT y PRO demostraron un patrón de datos similar a los otros tratamientos a los 60 minutos de fermentación.

La HPLC-DAD-RI demostró ser específico, lineal, preciso, exacto y robusto dentro del rango validado para la determinación simultánea de lactosa, glucosa, galactosa en yogures de leche de cabra, se aplicó con éxito para controlar el período de fermentación en diferentes yogures de leche de cabra (Costa *et al.* 2016).

Se implementado la utilización de inulina extraída de raíces de achicoria (*Cichorium intybus L.*) para mejorar las propiedades del yogur simbiótico bajo en grasas, este estudio tuvo como objetivo extraer y purificar la inulina de las raíces de achicoria y evaluar las propiedades fisicoquímicas y los grupos funcionales de la inulina purificada para compararlos con los de la inulina de achicoria estándar. Además, analizo el impacto de varias concentraciones de inulina en la calidad del yogur bajo en grasa, incluidas las propiedades fisicoquímicas, microestructurales, texturales y sensoriales, el impacto de la inulina como prebiótico en el crecimiento y la viabilidad del yogur simbiótico. Para la separación y cuantificación del contenido

de inulina, la determinación se realizó en un método de cromatografía líquida de alta presión combinada con detector de índice de refracción (HPLC-RID). Las separaciones cromatográficas y la determinación del contenido de inulina se realizaron en un instrumento HPLC Elite Chrome Hitachi combinado con (RID) Chromaster 5450. La separación de inulina se realizó en un Shodex® Sugar SP0810 (300 mm × 7 mm di) con Pb2 + y una columna de protección Shodex SP-G (5 µm, 6 × 50 mm) que funciona a 35°C, con una fase móvil de H<sub>2</sub>O destilada a un caudal de 1 m / min y un volumen de inyección de 20 µl (54).

**Figura 28. Cromatogramas para inulina de raíces de achicoria e inulina estándar sigma.**



Fuente: El-Kholy *et al.* 2020.

En la parte superior se observa el cromatograma de inulina de raíces de achicoria y en la parte inferior el cromatograma de inulina estándar de Sigma.

Los cromatogramas obtenidos mostraron que la inulina extraída de las raíces de achicoria proporcionaba un solo pico sin ningún compuesto u oligosacáridos que interfirieran. El tiempo de retención de la sustancia investigada (RT = 4,247 min) coincidió con la inulina estándar utilizada como referencia. Por tanto, se puede concluir que la inulina extraída de las raíces de achicoria era similar al compuesto estándar.

Al realizar los estudios de adición de inulina a la leche se demostró que aumenta la viabilidad de *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* durante el almacenamiento de yogur simbiótico. La adición de inulina mejoró las propiedades sensoriales del yogur simbiótico. La muestra fortificada con inulina al 1% tuvo las puntuaciones sensoriales más altas. En consecuencia, se podría recomendar el uso de inulina en la producción de yogur simbiótico debido a los efectos prebióticos sobre las bacterias probióticas del yogur simbiótico resultante. Por lo tanto, la inulina se ha convertido en un ingrediente importante para proporcionar nuevas vías para la producción de productos lácteos (El-Kholy *et al.* 2020).

En Indonesia se da produce la *Dioscorea bulbifera* conocida como Gembolo, este tubérculo contiene oligosacáridos que pueden utilizarse como alimentos funcionales a base de prebióticos. El objetivo de esta investigación fue analizar el contenido de oligosacáridos de la harina de tubérculo *Dioscorea bulbifera* y su potencial prebiótico. La extracción de oligosacáridos de la harina de *Dioscorea bulbifera* se realizó con etanol al 70% y se analizó el contenido de oligosacáridos mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

**Tabla 16. Resultados HPLC análisis de contenido de oligosacáridos.**

Parameter	(% b/v)
Inulin	0.76
Raffinose	0.07
Lactulose	0.09
Galactose	0.22
Glucose	2.53
Fructose	2.98

Fuente: Herawati *et al.* 2019.

Los resultados de la prueba HPLC para el análisis del contenido de oligosacáridos de la harina Gembolo muestra que el contenido de oligosacáridos más alto fue inulina, y el más bajo rafinosa. El inóculo de microorganismos colónicos se utilizó en lactantes voluntarios menores de 6 meses y que solo consumen leche materna. El índice prebiótico se determinó enumerando el crecimiento de bacterias totales, probióticos microbianos (*Bifidobacteria* y *Lactobacillus*) y patógenos microbianos (*Bacteroides* y *Clostridium*) en condiciones anaeróbicas a las 0, 24 y 48 horas.

Tabla 17. Crecimiento de microorganismos a 0, 24 y 48 horas.

Observation time (h)	Log Cfu/ml				Total Bacteria
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacteria</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Clostridium</i>	
0	3.46	6.95	1.30	4.52	5.62
24	4.88	7.35	1.89	5.25	6.90
48	6.03	7.44	2.84	4.57	6.84

Fuente: Herawati *et al.* 2019.

El aumento del número total de bacterias indica que los microorganismos pueden crecer en un medio que contiene extracto de oligosacárido de Gembolo. A las 0 horas, el número de *Lactobacillus* fue 3,46 log UFC/ml, luego a las 24 horas aumentó a 4,88 log UFC/ml y a las 48 horas aumentó a 6,03 log UFC/ml. La presencia de oligosacáridos en los medios provoca un buen crecimiento de *Lactobacillus*. En el primer muestreo, el número de *bifidobacterias* fue de 6,95 log UFC/ml, luego a las 24 horas aumentó a 7,35 log UFC/ml y a las 48 horas aumentó ligeramente a 7,44 log UFC/ml. *Bifidobacteria* utiliza el oligosacárido presente en el medio para metabolizar y crecer bien. Los microorganismos del colon, como *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*, han aumentado en cada intervalo de tiempo de observación. Esto sugiere que la microbiota colónica puede crecer en un medio que contiene extractos de oligosacáridos de Gembolo. Los oligosacáridos estimulan el crecimiento de microorganismos colónicos en presencia de inulina y glucosa. La glucosa está incluida en el grupo de los monosacáridos, por lo que las bacterias pueden usarla directamente sin tener que cortarla primero en monómeros más pequeños.

A la hora 0, el número de *Bacteroides* fue 1,30 log UFC/ml, luego a las 24 horas aumentó a 1,89 log UFC/ml y a las 48 horas aumentó a 2,84 log UFC/ml. El número creciente de *Bacteroides* a las 24 horas puede deberse a que el pH del medio sigue siendo el pH óptimo para el crecimiento de *Bacteroides*. En el primer muestreo, el recuento de *Clostridium* fue de 4,52 log UFC/ml; luego, a las 24 horas, aumentó a 5,25 log UFC/ml y a las 48 horas disminuyó ligeramente a 4,57 log UFC/ml. El número creciente de *Clostridium* en la hora 24 puede deberse a que el alto contenido de glucosa en el medio aún puede ser utilizado por *Clostridium* para el metabolismo y el crecimiento. Los microorganismos patógenos, como *Bacteroides*, aumentan en la hora 24 y 48, a diferencia de *Clostridium* que disminuye a las 48 horas. Esto sugiere que los microorganismos patógenos todavía pueden crecer en un medio, aunque la tasa de crecimiento es diferente. Los patógenos microbianos todavía pueden crecer porque los microorganismos patógenos todavía usan la glucosa existente para crecer. El patrón de crecimiento de bacterias totales,

*Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Bacteroides* y *Clostridium* en el extracto de oligosacáridos de Gembolo.

Tabla 18. Índice prebiótico a 24 y 48 horas de oligosacáridos de extractos de harina de *Dioscorea bulbifera*.

Time (hours)	Prebiotic Index
24	0.3876
48	1.2045

Fuente: Herawati *et al.* 2019.

El valor del índice de prebióticos de oligosacárido de extractos de harina de *Dioscorea bulbifera* a las 48 horas es 1,2045. Se puede concluir que el oligosacárido de la harina de tubérculo de *Dioscorea bulbifera* tiene potencial como prebiótico (Herawati *et al.* 2019).

## 6.2 Evaluación el efecto prebiótico del biopolímero Bilac® en condiciones *in vivo*

En la evaluación del efecto del Bilac® sobre la modificación del microbioma de los voluntarios, se cuantificó el aumento de la cantidad de Lactobacilos y Bifidobacterias en materia fecal. Comparando este trabajo con el de Mitsou *et al.* 2010 quienes desarrollaron un estudio con 50 voluntarios que consumieron  $\beta$  - glucano de cebada y observaron que el recuento inicial de *Lactobacillus* spp se reportó en 5.60 log UFC/g heces y a los 15 días 5.37 log UFC/g heces; mientras que en este trabajo inicialmente fue de 5,0 log UFC/g heces y a los 15 días 7.5 log UFC/g heces; para *Bifidobacterium* spp según Mitsou, inicialmente fue de 8.44 log UFC/g heces y a los 15 días 8.75 log UFC/g heces, contrastando con los obtenidos en este estudio donde inicialmente es de 5,0 log UFC/g heces y a los 15 días 7.5 log UFC/g heces; por lo que se puede inferir que el consumo del biopolímero Bilac® en la población estudiada incrementa en mayor número la población de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. a nivel intestinal.

Finalmente en el estudio de Mitsou no encontraron diferencia significativa entre el placebo y el  $\beta$  - glucano en términos de edad. Adicionalmente, no observaron diferencias significativas en el conteo de bacterias viables entre los dos grupos de alimentación. Ellos encontraron un incremento constante en el recuento de Bifidobacterias con una significancia a los 30 días de  $p = 0,055$ .

Los *Lactobacillus* fecales tendieron a ser más altos a los 30 días comparados con los 15 días ( $p=0.086$ ), con un secuencial descenso significativo a los 45 días. En el grupo placebo ellos

encontraron un incremento significativo en *Lactobacillus* y Clostridia, dos semanas después del final de la intervención.

Acorde a otros investigadores, el probiótico *Bifidobacterium animalis lactis* creció mejor en  $\beta$ -glucano hidrolizado que en inulina (Mitsou *et al.* 2010).

Cepas probióticas como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* mostraron crecimiento después de la fermentación de  $\beta$  - glucano hidrolizado. La hidrólisis de  $\beta$ - glucano parece ser un factor crucial para la fermentación por bacterias ácido lácticas, sin embargo, es improbable proveer directamente una fuente para promover la proliferación de *Lactobacillus* en el tracto intestinal. Parece que las fracciones de oligosacáridos de  $\beta$  - glucanos con un grado de polimerización de 3 – 4 ejerce mejor efecto lactobacilogénico debido a la probable presencia de enzimas de degradación específicas en esos microorganismos (Mitsou *et al.* 2010).

Los recuentos de coliformes permanecen sin variabilidad importante durante los 15 días del estudio alrededor de 7,0 Log UFC/g heces, coincidiendo con los de Mitsou que también presentaron resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Durante los 15 y 30 días de tratamiento observaron recuentos de Coliformes invariables en el tiempo de 7,10 log UFC/g heces en el día 0 a 6.97 log UFC/g heces a los 15 días; Mitsou también observó un recuento total de Coliformes y *E. coli* a los 45 días, comparado a los 15 y 30 días de ingestión del alimento.

Los autores del estudio (Mitsou *et al.* 2010) no encontraron cambios significativos en el total de Coliformes y *E. coli*, durante la alimentación con el cereal con  $\beta$  – glucano, pero mostraron un incremento significativo después del final de la intervención. Este resultado, en el cual se observa un incremento durante el periodo de alimentación, es acorde al obtenido en el presente trabajo. Al parecer en experimentos *in vitro* y en animales están de acuerdo en que la población de *Enterobacteriaceae* o *E. coli*, podrían no utilizar efectivamente  $\beta$  – glucanos o  $\beta$  – glucooligómeros. Para otros investigadores el análisis de los síntomas digestivos indicó que comparado con el placebo el consumo de  $\beta$  – glucano de cereal estuvo relacionado con manifestaciones diarreicas más intensas solo en voluntarios jóvenes. En el estudio con Bilac® durante la semana 1 y la semana 2 solamente el 14% de los voluntarios presentó diarrea.

Para otros autores tanto los voluntarios jóvenes como los viejos reportaron un efecto positivo con la ingestión de  $\beta$  - glucano en la reducción de dolor abdominal. En este estudio durante la ingesta de Bilac® los voluntarios presentaron dolor abdominal leve y moderado.

Es muy importante investigar la dosis – respuesta *in vivo* de los efectos de los posibles prebióticos sobre la microbiota humana y el potencial de los cambios benéficos relacionados para el procesamiento de alimentos incluyendo la probable funcionalidad prebiótica.

Los resultados obtenidos concuerdan con otras evidencias *in vitro* e *in vivo* donde sugieren que los  $\beta$ -glucanos pueden ser usados como prebióticos debido a su capacidad de promover el crecimiento de microorganismos benéficos de la microbiota intestinal como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Un ensayo clínico, aleatorizado y en doble ciego realizado en 52 adultos sanos de 39 a 70 años mostró que el consumo de 0,75 g de  $\beta$ -glucanos de cebada por porción de torta durante 30 días aumentaba las poblaciones fecales de Bifidobacteria, comparado con los controles. Estas diferencias fueron mayormente marcadas en los sujetos de más de 50 años, siendo su consumo muy bien tolerado (Pizarro *et al.* 2014).

## 7 Conclusiones

- El biopolímero Bilac® permite el crecimiento de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium Bididum* con un comportamiento muy similar al de la inulina que es un prebiótico por excelencia, bajo las condiciones aquí analizadas.
- Se determinó que el biopolímero Bilac® al 2% en el kumis permite mantener la población de viables de *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei*, y *Lactobacillus acidophilus* durante 35 días, con un comportamiento muy similar al de la inulina al 2%.
- El biopolímero Bilac® presenta mejores resultados en cuanto a pH, conteo de unidades formadoras de colonia y porcentaje de ácido láctico en kumis con el microorganismo *Lactobacillus casei* por lo que futuras investigaciones podrían evaluar con mayor detalle y precisión la afinidad prebiótica que se presenta con esta bacteria, en contraste *Lactobacillus acidophilus*, el cual no presento una actividad significativa prebiótica para Bilac® e inulina.
- La ingesta diaria de Bilac® a una dosis de 8 g/día permite mejorar la microbiota colónica aumentando el número de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.
- Es posible utilizar Bilac® al 2% en la matriz de leche para la elaboración de bebidas lácteas fermentadas, aportando un beneficio en la viabilidad de probióticos y adicionalmente proporcionando una mejor textura en el producto final.

## 8 Recomendaciones

- Se debe recomendar continuar con las investigaciones relacionadas con el biopolímero Bilac<sup>®</sup> tanto *in vitro* como *in vivo*, para evaluar otras propiedades funcionales.
- Es conveniente realizar investigaciones *in vitro* con medios de cultivo y varias fuentes de carbono a diferentes concentraciones y en diferentes tiempos de fermentación para poder establecer las relaciones entre la densidad óptica y el recuento de viables por parte de los microorganismos probióticos en esas condiciones.
- A futuro se pueden realizar investigaciones en donde el análisis *in vivo* incluya tanto un mayor número de voluntarios como un mayor tiempo de estudio, en donde incluso se puedan tomar muestras de manera transversal a diferentes tiempos después del consumo del alimento, para poder evaluar los cambios asociados con la microbiota intestinal.

## A. Anexo: Consentimiento informado voluntarios del estudio de alimentación.

### ANEXO 2

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título del estudio:**

Evaluación del efecto prebiótico del biopolímero BILAC®.

**Investigadores:**

Liliana del Pilar Zambrano Pardo

Estudiante de Maestría en Ciencias – Microbiología

Universidad Nacional de Colombia

**Objetivo:**

- Evaluar el efecto prebiótico que ejerce el biopolímero de fibra soluble BILAC® sobre los microorganismos benéficos de la microflora intestinal.

**Procedimiento:**

- Información acerca del proyecto en el cual se va a participar
- Asistir a la reunión convocada por el grupo investigador para valoración de la condición médica y nutricional; participar de la forma siguiente:
- Responder en consulta médica las preguntas sobre la historia clínica, durante aproximadamente 15 minutos.
- Responder al Nutricionista Dietista preguntas sobre la forma de alimentación, durante aproximadamente 40 - 60 minutos.
- Permitir la toma y registro de medidas corporales como el peso, la talla y la circunferencia de cintura, con las cuales se calculará el Índice de masa corporal (IMC) y se dará un concepto sobre el estado nutricional.
- Socialización
- Aclaración de las preguntas correspondientes
- Firma del consentimiento informado
- Ingesta diaria de los participantes del biopolímero (el biopolímero será suministrado por los investigadores) en dos alimentos diferentes, en una galleta y en 200ml de kumis.
- Recolección de muestras de materia fecal: antes del consumo del biopolímero y durante el estudio, contando a partir del primer día de consumirlo.

**Riesgos**

- La ingesta de los alimentos proporcionados no generan riesgo para la salud, sin embargo en ocasiones el incremento en la ingesta alta usual de fibra soluble puede provocar distensión y flatulencia (formación de gases intestinales), además de sensación de llenura. En tal caso mantendré informado a la directora o coordinadora

del estudio y contestaré las preguntas relacionadas con los efectos negativos del tratamiento asignado cuando el asistente e investigador estudio lo pregunten.

**Costos:**

- Los participantes del estudio no recibirán ninguna remuneración económica así como tampoco asumirán los costos por ningún procedimiento llevado a cabo durante la investigación.

**Confidencialidad:**

- La información suministrada será para uso exclusivo del presente estudio y no se usará con otros fines.

**Preguntas:**

- Los participantes podrán realizar las preguntas que consideren necesarias a los investigadores acerca de los procedimientos, finalidad del estudio y demás.
- Al participar en el estudio se tiene el derecho a rehusar contestar ciertas preguntas así como retirarse del proceso.

**ÉTICA:** Esta investigación tiene la autorización del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

**Derecho a rehusar participar en el estudio o a abandonarlo:**

Mi participación en el estudio es completamente voluntaria y soy libre a rehusar tomar parte en el mismo o abandonar en cualquier momento.

Yo \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ identificado(a) con CC# \_\_\_\_\_ de  
 \_\_\_\_\_ acepto participar como voluntario (a) en el estudio  
 \_\_\_\_\_

He tenido la oportunidad de leer este impreso; y conforme con ello procedo a firmar mi consentimiento.

Fecha: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Documento de identificación: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ responsable: \_\_\_\_\_

## **B. Anexo: Especificaciones Microscopia electrónica de Barrido SEM.**

### **Recubrimiento (Preparación de muestras)**

La metalización se realiza en un sputter SDC-050 de la Marca Balzers, en condiciones de prevacío ( $<10^{-1}$  torr) con argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (ánodo) de oro-paladio (8:2)), la película se deposita sobre las muestras (cátodo) a corriente de descarga de +/- 50mA y el espesor típico es de +/- 200 nm.

### **Observación y análisis de muestras**

El Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200 consta de un cañón de electrones con su óptica, cámara de muestras, circuito de vacío, electrónica de detección y registro de imagen.

El cañón utiliza un filamento de tungsteno para generar el haz de electrones muy estrecho que barre la superficie de un material y permite obtener una representación ampliada de ésta.

La cámara de muestras motorizada en sus tres ejes, permite el manejo de hasta siete muestras de  $1 \text{ cm}^2$  de área o de una muestra de hasta 4 cm de altura, con 4.5 cm de área aproximadamente. Las muestras pueden ser rotadas hasta  $70^\circ$  permitiendo una visualización casi completa de las mismas sin necesidad de acceder a la cámara.

El circuito de vacío se apoya en dos bombas mecánicas, con espacios de operación semindependientes, y una bomba turbomolecular que actúa sobre la cámara de muestras; en conjunto permiten alcanzar vacío de operación en menos de 3 minutos maximizando el tiempo de estudio. Este aspecto determina los modos de operación: Alto Vacío, Bajo Vacío y Ambiental. El modo de Alto Vacío se utiliza con muestras conductoras que no sufren ninguna alteración bajo el vacío típico alcanzado ( $3 \times 10^{-7}$  torr) durante la operación. El Bajo Vacío ( $2 \times 10^{-2}$  torr) utiliza un gas auxiliar ( $\text{N}_2$ ) y se usa con muestras conductoras que puedan sufrir algún daño en las condiciones de Alto Vacío (Ej. semillas metalizadas, cerámicas con burbujas internas, etc.). El Modo Ambiental ( $2 \times 10^{-2}$  torr) permite la visualización de muestras en atmosfera de vapor de

agua, de esta manera se pueden visualizar muestras que por su valor intrínseco, propiedades o uso futuro no pueden ser metalizadas, permite visualizar organismos en condiciones naturales (Ej.: Plantas, etc.).

La electrónica de detección posee dos detectores principales: Un detector de electrones secundarios Everhart-Thorney (ETD) que permite destacar la morfología del material; un detector de electrones retrodispersados (SSD) que destaca diferencias en composición. Adicionalmente existen dos detectores de estado sólido (campo ancho y campo reducido) para la operación en modo ambiental. Dependiendo de las propiedades eléctricas y morfológicas de la muestra, es posible alcanzar hasta 260 mil aumentos en alto vacío (muestras conductoras, relativamente planas) y 60 mil aumentos en bajo vacío o modo ambiental (muestras relativamente llanas).

Se dispone además de una microsonda EDX que detecta el espectro de emisión de rayos x particular de cada elemento producido por el haz de electrones sobre la muestra, siendo la intensidad de los rayos x una medida de la concentración de los elementos.

Si se realiza este procedimiento punto a punto sobre la imagen, se obtiene un mapa de composición (mapping) que representa la distribución de los elementos en el área observada de la muestra.

Notas:

Det significa detector

SSD significa Detector de Estado Sólido (Electrones Retrodispersados)

ETD significa Detector Everhart-Thorney (Electrones Secundarios)

HV significa Alto Voltaje

LFD significa Large Field Detector, detector de campo ancho.

WD significa Working Distance, distancia de trabajo entre el cañón de electrones y la muestra.

Programa con el cual se toman las micrografías "xT microscope control versión 2.01

Programa con el cual se toma análisis "EDX Control Software versión 1.00

## C. Anexo: Análisis Estadístico

Objetivo 2 Bifido Statistix 9.0

### Descriptive Statistics of LOGUFC by Tiempo

Tiempo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
0	14	5.0507	0.7985	3.4100	5.8800
1	14	6.8486	0.7187	5.3400	7.7800
2	14	7.3314	1.1754	5.2300	8.7800

### Descriptive Statistics of LOGUFC by Sexo

Sexo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
hombre	21	6.1224	1.2367	3.4100	8.3400
mujer	21	6.6981	1.4025	3.7000	8.7800

### Analysis of Variance Table for LOGUFC

Source	DF	SS	MS	F	P
Sexo	1	3.4802	3.4802	4.77	0.0495
Error Sexo*Sujeto	12	8.7520	0.7293		
Tiempo	2	40.4465	20.2232	24.59	0.0000
Sexo*Tiempo	2	0.9943	0.4971	0.60	0.5544
Error Sexo*Sujeto*Tiempo	24	19.7362	0.8223		
Total	41				

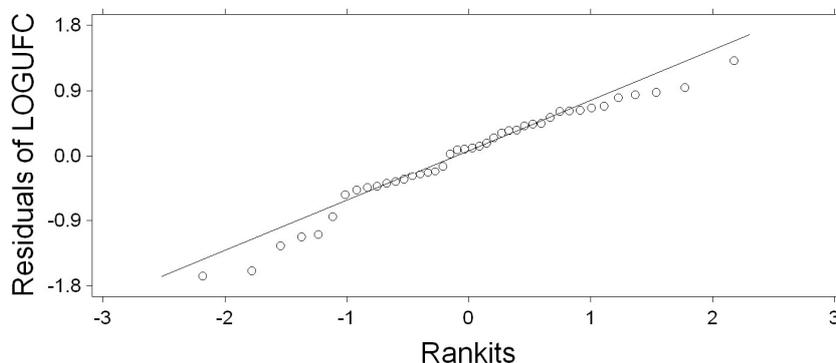
Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 6.4102

CV(Sexo\*Sujeto) 13.32

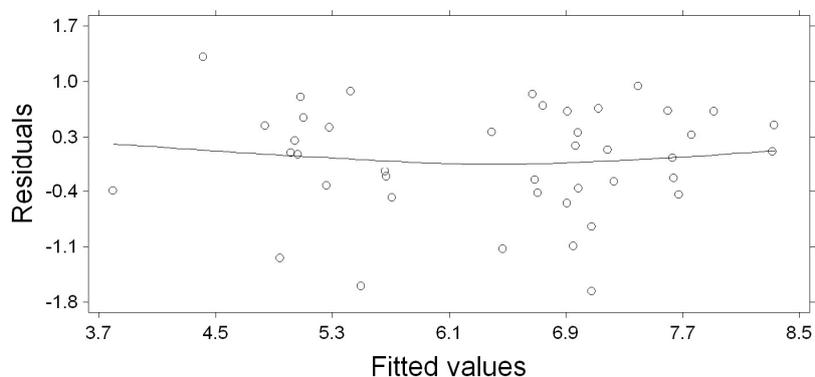
CV(Sexo\*Sujeto\*Tiempo) 14.15

### Normal Probability Plot



Shapiro-Wilk W 0.9617 P(W) 0.1705 42 cases

### Residuals by Fitted Values Plot for LOGUFC



#### Polynomial Contrasts of LOGUFC by Tiempo

Degree = 1, Linear Trend

Contrast	1.6127	SS (Contrast)	36.412
Scheffe's F	22.14	P (Scheffe's F)	0.0000
T-Statistic	6.65	P (T-Statistic)	0.0000
SE (Contrast)	0.2424		

Degree = 2, Quadratic Trend

Contrast	-0.5368	SS (Contrast)	4.0349
Scheffe's F	2.45	P (Scheffe's F)	0.1073
T-Statistic	-2.22	P (T-Statistic)	0.0365
SE (Contrast)	0.2424		

Error term used: Sexo\*Sujeto\*Tiempo, 24 DF

#### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of LOGUFC for Tiempo

##### Tiempo Mean Homogeneous Groups

2	7.3314	A
1	6.8486	A
0	5.0507	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3427  
 Critical Q Value 3,533 Critical Value for Comparison 0.8561  
 Error term used: Sexo\*Sujeto\*Tiempo, 24 DF

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

#### Descriptive Statistics of pH by Sexo

Sexo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
hombre	21	6.1905	0.6016	5.0000	7.0000
mujer	21	6.0952	1.2209	3.0000	8.0000

**Descriptive Statistics of pH by Tiempo**

Tiempo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
0	14	5.5000	0.9405	3.0000	6.0000
1	14	6.6429	0.7449	5.0000	8.0000
2	14	6.2857	0.8254	5.0000	7.0000

**Analysis of Variance Table for pH**

Source	DF	SS	MS	F	P
Sexo	1	0.0952	0.09524	0.14	0.7184
Error Sexo*Sujeto	12	8.3810	0.69841		
Tiempo	2	9.5714	4.78571	6.74	0.0048
Sexo*Tiempo	2	2.0476	1.02381	1.44	0.2564
Error Sexo*Sujeto*Tiempo	24	17.0476	0.71032		
Total	41				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 6.1429

CV(Sexo\*Sujeto) 13.60

CV(Sexo\*Sujeto\*Tiempo) 13.72

**Polynomial Contrasts of pH by Tiempo**

Degree = 1, Linear Trend

Contrast	0.5556	SS (Contrast)	4.3214
Scheffe's F	3.04	P (Scheffe's F)	0.0665
T-Statistic	2.47	P (T-Statistic)	0.0212
SE (Contrast)	0.2252		

Degree = 2, Quadratic Trend

Contrast	-0.6124	SS (Contrast)	5.2500
Scheffe's F	3.70	P (Scheffe's F)	0.0399
T-Statistic	-2.72	P (T-Statistic)	0.0120
SE (Contrast)	0.2252		

Error term used: Sexo\*Sujeto\*Tiempo, 24 DF

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of pH for Tiempo**

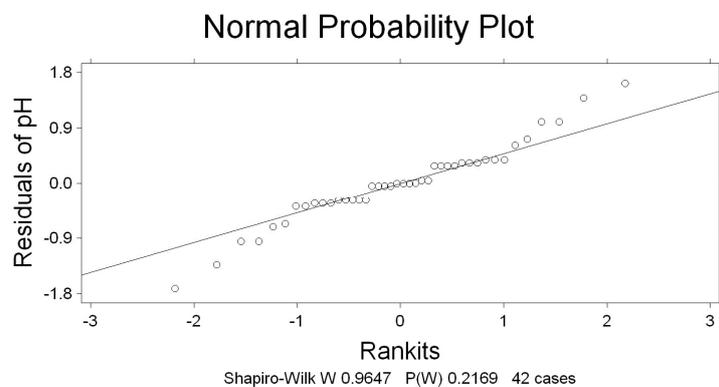
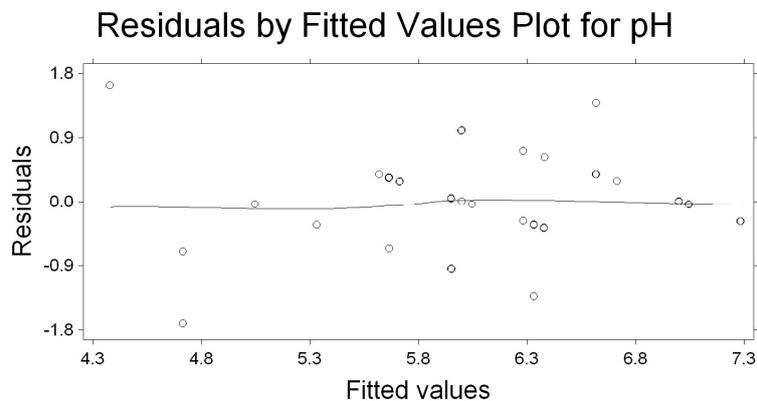
Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
1	6.6429	A
2	6.2857	AB
0	5.5000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3185

Critical Q Value 3,533 Critical Value for Comparison 0.7957

Error term used: Sexo\*Sujeto\*Tiempo, 24 DF

There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.



## Objetivo 2. *Lactobacillus* spp.

Statistix 9.0

### Descriptive Statistics of LOGUFC by Tiempo

Tiempo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
0	14	4.9621	0.9534	2.7500	6.2300
1	14	6.8164	0.8348	5.6300	7.9000
2	14	7.5764	0.9090	5.5100	8.8900

### Descriptive Statistics of LOGUFC by sexo

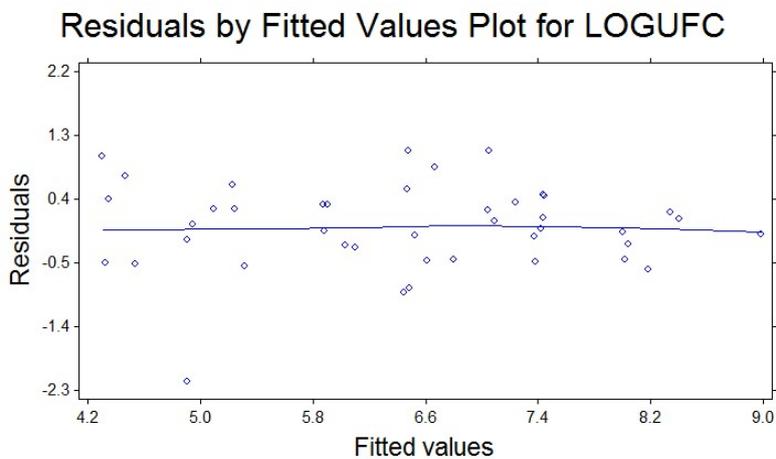
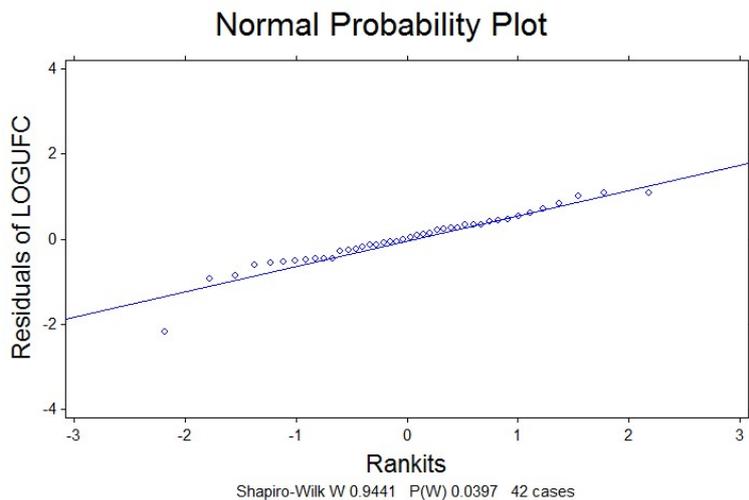
sexo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
hombre	21	6.1367	1.3076	2.7500	8.1500
mujer	21	6.7667	1.4814	3.8200	8.8900

### Analysis of Variance Table for LOGUFC

Source	DF	SS	MS	F	P
sexo	1	4.1675	4.1675	4.65	0.0521
Error sexo*sujeto	12	10.7557	0.8963		
Tiempo	2	50.6355	25.3178	40.19	0.0000
sexo*Tiempo	2	1.5765	0.7882	1.25	0.3041

Error sexo\*sujeto\*Tiempo 24 15.1176 0.6299  
 Total 41 82.2528

Grand Mean 6.4517  
 CV(sexo\*sujeto) 14.67  
 CV(sexo\*sujeto\*Tiempo) 12.30



Statistix 9.0

**Polynomial Contrasts of LOGUFC by Tiempo**

Degree = 1, Linear Trend

Contrast	1.8486	SS (Contrast)	47.841
Scheffe's F	37.98	P (Scheffe's F)	0.0000
T-Statistic	8.71	P (T-Statistic)	0.0000
SE (Contrast)	0.2121		

Degree = 2, Quadratic Trend

Contrast	-0.4467	SS (Contrast)	2.7941
Scheffe's F	2.22	P (Scheffe's F)	0.1307
T-Statistic	-2.11	P (T-Statistic)	0.0458
SE (Contrast)	0.2121		

Error term used: sexo\*sujeto\*Tiempo, 24 DF

## Objetivo 2. Coliformes

### Descriptive Statistics of LOGUFC by sexo

sexo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
hombre	21	6.8586	0.8050	5.0000	8.0800
mujer	21	7.1300	0.8219	5.8300	8.7500

### Descriptive Statistics of LOGUFC by Tiempo

Tiempo	N	Mean	SD	Minimum	Maximum
0	14	6.9071	0.5926	5.8300	7.6900
1	14	6.7179	0.8096	5.0000	8.0400
2	14	7.3579	0.9253	5.3600	8.7500

### Analysis of Variance Table for LOGUFC

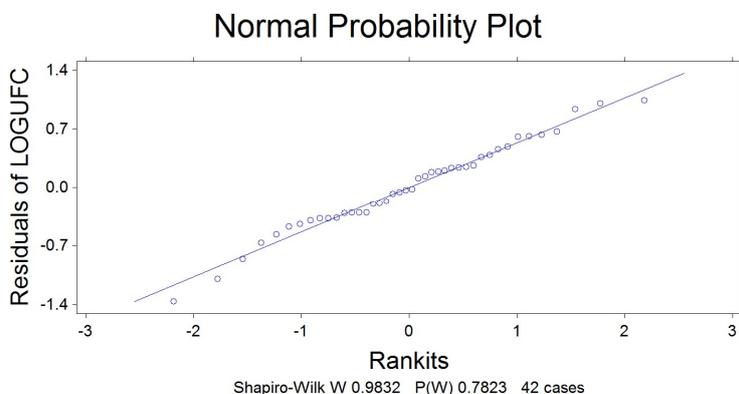
Source	DF	SS	MS	F	P
sexo	1	0.7736	0.77357	0.80	0.3885
Error sexo*Sujeto	12	11.5923	0.96602		
Tiempo	2	3.0267	1.51334	3.10	0.0635
sexo*Tiempo	2	0.1296	0.06481	0.13	0.8764
Error sexo*Sujeto*Tiempo	24	11.7205	0.48835		
Total	41				

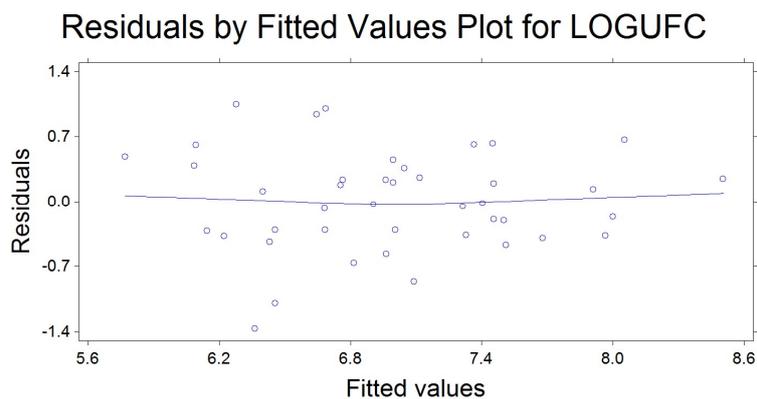
Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 6.9943

CV(sexo\*Sujeto) 14.05

CV(sexo\*Sujeto\*Tiempo) 9.99





**Polynomial Contrasts of LOGUFC by Tiempo**

Degree = 1, Linear Trend

Contrast	0.3187	SS (Contrast)	1.4220
Scheffe's F	1.46	P (Scheffe's F)	0.2531
T-Statistic	1.71	P (T-Statistic)	0.1008
SE (Contrast)	0.1868		

Degree = 2, Quadratic Trend

Contrast	0.3386	SS (Contrast)	1.6047
Scheffe's F	1.64	P (Scheffe's F)	0.2144
T-Statistic	1.81	P (T-Statistic)	0.0824
SE (Contrast)	0.1868		

Error term used: sexo\*Sujeto\*Tiempo, 24 DF

## D. Anexo: Ficha Técnica Inulina Marca Tecnas S.A.

		<b>FICHA TECNICA DE PRODUCTO TERMINADO</b>		<b>PT-821</b>
Versión: <b>5</b>		Fecha de aprobación: <b>2014-01-09</b>		<b>FN-GD-17 / V-6</b> 2013-12-11
<b>IDENTIFICACION DEL PRODUCTO</b>				
Nombre	INULINA		Referencia	N/A
Ingredientes	Inulina (Fibra soluble de origen vegetal).			
<b>CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO</b>				
<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS</b>				
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>ESPECIFICACION</b>		<b>METODO</b>	
ASPECTO	Polvo fino		EO-CC-11. Basado en NTC 2680	
COLOR APARENTE	Blanco a crema		EO-CC-12. Basado en NTC 4604	
OLOR	Característico		EO-CC-13. Basado en NTC 2680	
SABOR	Levemente dulce		EO-CC-14. Basado en NTC 2680	
<b>CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS</b>				
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>ESPECIFICACION</b>	<b>METODO</b>	
INULINA	%	87,0 - 93,0	N/D	
GLUCOSA + FRUCTOSA	%	Máximo 4,0	N/D	
SACAROSA	%	Máximo 8,0	N/D	
CARBOHIDRATOS	%	Mínimo 99,6	N/D	
CENIZAS	%	Máximo 0,5	N/D	
PERDIDAS POR SECADO	%	Máximo 5,0	EO-CC-19. Basado en NTC 529	
pH	Unidades de pH	5,0 - 7,0	EO-CC-15. Basado en NTC 4592	
ARSENICO	ppm	0.2	N/D	
PLOMO	ppm	0.2	N/D	
<b>CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y ENTOMOLÓGICAS</b>				
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>ESPECIFICACION</b>	<b>METODO</b>	
Recuento microorganismos aerobios mesófilos	U.F.C. / g	Máximo 1000	EO-CC-03. Basado en NTC 4519	
Recuento mohos y levaduras	U.F.C. / g	Máximo 20	EO-CC-04. Basado en NTC 4132	
Coliformes fecales	N.M.P. / g	< 3,0	EO-CC-05. Basado en NTC 4516	
Recuento <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva	U.F.C. / g	< 100	EO-CC-07. Basado en NTC 4779	
Detección de <i>Salmonella</i>	spp/25g	Ausente	EO-CC-09. Basado en NTC 4574	

REVISADO Y APROBADO POR DIRECTORA DE PROYECTOS

TECNAS S.A. web: [www.tecnas.com.co](http://www.tecnas.com.co)  
 e-mail: [servicioalcliente@tecnas.com.co](mailto:servicioalcliente@tecnas.com.co)  
 Itagüí - Colombia

Cra 50G No. 12 sur - 29, A.A. 51040  
 Teléfonos: (57)(4) 2854290- 2858290  
 Fax: (57)(4) 2553809

		<b>FICHA TECNICA DE PRODUCTO TERMINADO</b>	<b>PT-821</b>
Versión: <b>5</b>		Fecha de aprobación: <b>2014-01-09</b>	<b>FN-GD-17 / V-6</b> 2013-12-11
<b>CARACTERÍSTICAS A EVALUAR</b>			
Aspecto, olor, sabor, concentración de inulina y pérdidas por secado.			
<b>CONDICIONES DE EMPAQUE Y EMBALAJE</b>			
Presentación comercial y material de empaque	Por 1kg en bolsa de BOPP/FOIL/PEBD, luego se embalan varias unidades en caja de carton. Por 20kg en bolsa de polietileno luego en saco de polipropileno. Por 25kg en saco de papel multicapas. Además, puede empacarse en otra cantidad requerida por el cliente, en un empaque que garantice su conservación (sujeto a negociación).		
Vida útil	12 meses.		
<b>CONSUMIDORES POTENCIALES</b>			
Industria de alimentos en general.			
<b>FORMA DE CONSUMO E INSTRUCCIONES ESPECIALES DE MANEJO</b>			
Dosis recomendada	Se recomienda una adición mínima de 3g de inulina por porción de alimento elaborado.		
Forma de aplicación	Incorporar como parte de los ingredientes del alimento elaborado.		
Precauciones	Evitar el contacto directo con ojos y mucosas nasales.		
<b>RECOMENDACIONES DE CONSERVACIÓN, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE</b>			
Debe almacenarse sobre plataformas elevadas del piso, en bodegas cubiertas, en ambiente seco, fresco y con buena ventilación. En las bodegas de almacenamiento se debe contar con un plan integral de control de plagas, limpieza y buenas prácticas de manufactura. Una vez se abra el empaque, para emplear una parte, se debe cerrar inmediatamente para evitar la exposición a la humedad del ambiente, y la contaminación microbiana. Este producto se debe transportar en vehículos limpios, se debe colocar sobre estibas, nunca sobre el piso del vehículo, no se debe transportar con sustancias tóxicas, químicos o animales.			
<b>REQUISITOS LEGALES Y NORMAS TECNICAS APLICABLES AL PRODUCTO</b>			
No tiene normatividad asociada; Características microbiológicas son definidas por el fabricante.			
<b>ALERGENOS</b>			
Este producto es reempacado en una planta donde se utilizan los siguientes productos y sus derivados: cereales que contienen gluten, huevos, maní, soya, leche, nueces de árboles y sulfito.			

REVISADO Y APROBADO POR DIRECTORA DE PROYECTOS

TECNAS S.A. web: [www.tecnas.com.co](http://www.tecnas.com.co)  
 e-mail: [servicioalcliente@tecnas.com.co](mailto:servicioalcliente@tecnas.com.co)  
 Itagüí - Colombia

Cra 50G No. 12 sur – 29, A.A. 51040  
 Teléfonos: (57)(4) 2854290- 2858290  
 Fax: (57)(4) 2553809

## E. Anexo: Formato Evaluación sensorial

### EVALUACIÓN SENSORIAL

A. Cual producto se parece más al patrón?

1. \_\_\_\_\_ 2. \_\_\_\_\_

B. Cuál producto se parece más al patrón?

1. \_\_\_\_\_ 2. \_\_\_\_\_

C. Cuál es el producto de su preferencia?

\_\_\_\_\_

D. En términos de textura (viscosidad) cual es el producto de su preferencia?

\_\_\_\_\_

E. Características del producto:

- Textura: alta \_\_\_\_\_ media \_\_\_\_\_ baja \_\_\_\_\_
- Dulzor: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_
- Acidez: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_

F. Características del producto:

- Textura: alta \_\_\_\_\_ media \_\_\_\_\_ baja \_\_\_\_\_
- Dulzor: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_
- Acidez: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_

G. Características del producto:

- Textura: alta \_\_\_\_\_ media \_\_\_\_\_ baja \_\_\_\_\_
- Dulzor: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_
- Acidez: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_

H. Características del producto:

- Textura: alta \_\_\_\_\_ media \_\_\_\_\_ baja \_\_\_\_\_
- Dulzor: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_
- Acidez: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_

I. Características del producto:

- Textura: alta \_\_\_\_\_ media \_\_\_\_\_ baja \_\_\_\_\_
- Dulzor: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_
- Acidez: alto \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ bajo \_\_\_\_\_

## F. Anexo: Formato Encuesta inicial ensayo biológico

### ENCUESTA ENSAYO BIOLÓGICO

NOMBRE: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_

SEXO: Masculino ( ) Femenino ( )

1. ¿Está tomando algún antibiótico, laxante o medicamento?  
SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_ CUAL? \_\_\_\_\_
2. ¿Sufre alguna enfermedad gastrointestinal?  
SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_ CUAL? \_\_\_\_\_

La siguiente lista muestra las preguntas sobre la actualidad de sus hábitos de defecación.

3. La frecuencia de defecación?

- Una vez cada tres días \_\_\_\_
- Una vez cada dos días \_\_\_\_
- Una vez al día \_\_\_\_
- Más de dos veces al día \_\_\_\_

4. Cantidad de heces?

- Grande \_\_\_\_
- Mediano \_\_\_\_
- Pequeño \_\_\_\_

5. Estado de las heces?

- Duro \_\_\_\_
- Blando \_\_\_\_
- Líquido \_\_\_\_

6. Sufre de estreñimiento?

SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

7. En el último mes ha tenido episodios de diarrea?

SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_

## G. Anexo: Registro semanal de los voluntarios durante el estudio

### REGISTRO SEMANAL DE LOS VOLUNTARIOS DURANTE EL ESTUDIO "EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO DE BIOPOLÍMERO Bilac®"

NOMBRE: \_\_\_\_\_

SEXO: Masculino ( ) Femenino ( )

#### SEMANA 1

1. Frecuencia de la defecación:

- Una vez cada tres días \_\_\_\_\_
- Una vez cada dos días \_\_\_\_\_
- Una vez al día \_\_\_\_\_
- Más de dos veces al día \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

2. Consistencia:

- Estreñimiento \_\_\_\_\_
- Duro \_\_\_\_\_
- Formado \_\_\_\_\_
- Suave \_\_\_\_\_
- Diarrea \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

3. Cantidad de heces:

- Grande \_\_\_\_\_
- Mediano \_\_\_\_\_
- Pequeño \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

4. Dolor abdominal:

- Ninguno \_\_\_\_\_
- Leve \_\_\_\_\_
- Moderado \_\_\_\_\_
- Grave \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

5. Flatulencia:

- Ninguno \_\_\_\_\_
- Leve \_\_\_\_\_
- Moderado \_\_\_\_\_
- Grave \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

6. Sensación de saciedad:

- Ninguno \_\_\_\_\_
- Leve \_\_\_\_\_

- Moderado \_\_\_\_\_
- Severo \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

Comentarios adicionales:

---



---



---

**REGISTRO SEMANAL DE LOS VOLUNTARIOS DURANTE EL ESTUDIO “EVALUACIÓN DEL EFECTO  
PREBIÓTICO DE BIOPOLÍMERO Bilac®”**

NOMBRE: \_\_\_\_\_

SEXO: Masculino ( )      Femenino ( )

**SEMANA 2**

1. Frecuencia de la defecación:

- Una vez cada tres días \_\_\_\_\_
- Una vez cada dos días \_\_\_\_\_
- Una vez al día \_\_\_\_\_
- Más de dos veces al día \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

2. Consistencia:

- Estreñimiento \_\_\_\_\_
- Duro \_\_\_\_\_
- Formado \_\_\_\_\_
- Suave \_\_\_\_\_
- Diarrea \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

3. Cantidad de heces:

- Grande \_\_\_\_\_
- Mediano \_\_\_\_\_
- Pequeño \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

4. Dolor abdominal:

- Ninguno \_\_\_\_\_
- Leve \_\_\_\_\_
- Moderado \_\_\_\_\_
- Grave \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

5. Flatulencia:

- Ninguno \_\_\_\_\_
- Leve \_\_\_\_\_
- Moderado \_\_\_\_\_
- Grave \_\_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

6. Sensación de saciedad:

- Ninguno \_\_\_\_
- Leve \_\_\_\_
- Moderado \_\_\_\_
- Severo \_\_\_\_
- Otro \_\_\_\_\_

Comentarios:

---

---

---

## H. Anexo: Anamnesis voluntarios

LISTADO PRELIMINAR DE PARTICIPANTES									
#	Nombre	Género	Edad (años)	Actividad Física	Resultado del Tamizaje Nutricional	Concepto General de la Anamnesis	Análisis del Global Recordatorio	Análisis de la Frecuencia de Consumo	Observaciones
1	Voluntaria	F	30	Moderada	Peso: 71.0 Kg Talla: 1.57 m IMC: 28.8 P. Cintura: 92.5 cm Dx: Pre-obesidad + Obesidad abdominal	Realiza 3 tiempos de comida.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género. Sin embargo, el consumo reportado no coincide con sus reservas corporales.	Reporta adecuado consumo de carnes, bajo consumo de farináceos, verduras, frutas, grasas y azúcares y muy bajo consumo de lácteos. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
2	Voluntaria	F	26	Leve	Peso: 50.3 Kg Talla: 1.61 m IMC: 19.5 P. Cintura: 76.0 cm Dx: Normal	Realiza 5 tiempos de comida. Usualmente presenta episodios de diarrea o estreñimiento, así como distensión y flatulencia. No tolera agua de panela, mostaza y salsa BBQ.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de frutas, carnes, lácteos y grasas y bajo consumo de farináceos, verduras y azúcares. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Antecedentes de gastritis.

3	Voluntario	M	43	Moderada	Peso: 93.5 Kg Talla: 1.73 m IMC: 31.4 P. Cintura: 107.0 cm Dx: Obesidad Grado I + Obesidad abdominal	Realiza 3 tiempos de comida. Refiere que no le gusta la leche entera y prefiere evitarla.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género. Elevado consumo de café.	Reporta adecuado consumo de carnes y grasas, bajo consumo de farináceos y verduras, muy bajo consumo de frutas y lácteos y muy alto consumo de azúcares. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Antecedentes de obesidad.
4	Voluntaria	F	24	Moderada	Peso: 67.0 Kg Talla: 1.60 m IMC: 26.2 P. Cintura: 92.5 cm Dx: Pre-obesidad + Obesidad abdominal	Realiza 5 tiempos de comida. Usualmente presenta náuseas, diarrea y dolor abdominal. No tolera el café. Consume suplemento de vitamina C.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género.	Reporta adecuado consumo de farináceos, frutas, carnes, lácteos, grasas y azúcares y bajo consumo de verduras. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Antecedentes de obesidad. Tiene pendiente la realización de endoscopia y colonoscopia.
5	Voluntaria	F	18	Moderada	Peso: 59.5 Kg Talla: 1.66 m IMC: 21.7 P. Cintura: 82.0 cm Dx: Normal + Obesidad abdominal	Realiza 4 tiempos de comida. Usualmente presenta estreñimiento, dolor abdominal, distensión y flatulencia. No tolera el chocolate.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género.	Reporta adecuado consumo de frutas, carnes y grasas, bajo consumo de farináceos, verduras y azúcares y muy bajo consumo de lácteos. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Antecedentes de hipoglucemia.
6	Voluntario	M	21	Moderada	Peso: 51.5 Kg Talla: 1.75 m IMC: 16.8 P. Cintura: 70.0 cm Dx: Delgadez Moderada	Realiza 3 tiempos de comida. Usualmente presenta náuseas, estreñimiento, dolor abdominal, distensión y flatulencia.	Poca variedad de alimentos y preparaciones. Las cantidades consumidas son insuficientes para cubrir sus requerimientos, lo cual se relaciona con su bajo peso.	Reporta adecuado consumo de farináceos, carnes y grasas, bajo consumo de verduras, muy bajo consumo de frutas y lácteos y muy alto consumo de azúcares. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Antecedentes de colitis.

7	Voluntaria	F	40	Moderada	Peso: 55.6 Kg Talla: 1.62 m IMC: 21.2 P. Cintura: 84.5 cm Dx: Normal + Obesidad abdominal	Realiza 4 tiempos de comida.	Poca variedad de alimentos y preparaciones. Las cantidades reportadas son insuficientes para cubrir sus requerimientos.	Reporta adecuado consumo de lácteos y bajo consumo de farináceos, verduras, frutas, carnes, grasas y azúcares. Muy bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
8	Voluntaria	F	46	Moderada	Peso: 51.7 Kg Talla: 1.52 m IMC: 22.4 P. Cintura: 81.0 cm Dx: Normal + Obesidad abdominal	Realiza 4 tiempos de comida. Usualmente presenta diarrea, distensión y flatulencia. No tolera la leche entera y las leguminosas.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada. Elevado consumo de café.	Reporta adecuado consumo de farináceos, lácteos, grasas y azúcares y bajo consumo de verduras, frutas y carnes. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
9	Voluntaria	F	40	Moderada	Peso: 55.0 Kg Talla: 1.54 m IMC: 23.2 P. Cintura: 80.0 cm Dx: Normal + Obesidad abdominal	Realiza 3 tiempos de comida. Usualmente presenta diarrea y dolor abdominal. No tolera el café y el chocolate.	Las cantidades reportadas no son suficientes para cubrir sus requerimientos; poca variedad de alimentos; porciones pequeñas para su edad y género.	Reporta adecuado consumo de grasas y bajo consumo de farináceos, verduras, frutas, carnes, lácteos y azúcares. Muy bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
10	Voluntario	M	18	Moderada	Peso: 67.7 Kg Talla: 1.74 m IMC: 22.4 P. Cintura: 79.0 cm Dx: Normal	Realiza 5 tiempos de comida. Usualmente presenta distensión. No tolera la leche entera. Consume suplemento de vitaminas y hierro.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género.	Reporta adecuado consumo de farináceos, frutas, carnes, lácteos y azúcares, bajo consumo de verduras y alto consumo de grasas. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.

11	Voluntaria	F	18	Moderada	Peso: 48.4 Kg Talla: 1.61 m IMC: 18.7 P. Cintura: 70.0 cm Dx: Normal	Realiza 5 tiempos de comida. Usualmente presenta dolor abdominal.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de farináceos, frutas, carnes, lácteos, grasas y azúcares y bajo consumo de verduras. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Antecedentes de gastritis.
12	Voluntario	M	17	Moderada	Peso: 52.7 Kg Talla: 1.71 m IMC: 18.0 P. Cintura: 71.5 cm Dx: Delgadez Leve	Realiza 5 tiempos de comida. Usualmente presenta distensión y flatulencia. No tolera las grasas en la mañana.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de carnes y grasas, bajo consumo de verduras, muy bajo consumo de farináceos, frutas y lácteos y alto consumo de azúcares. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
13	Voluntaria	F	24	Moderada	Peso: 46.5 Kg Talla: 1.54 m IMC: 19.6 P. Cintura: 67.0 cm Dx: Normal	Realiza 3 tiempos de comida. Refiere gusto por la sal y los condimentos.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género.	Reporta adecuado consumo de frutas, carnes y lácteos, bajo consumo de farináceos, verduras y azúcares y alto consumo de grasas. Muy bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
14	Voluntario	M	22	Leve	Peso: 77.0 Kg Talla: 1.69 m IMC: 27.1 P. Cintura: 97.0 cm Dx: Pre-Obesidad + Obesidad abdominal	Realiza 4 tiempos de comida.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género. Sin embargo, el consumo reportado no coincide con sus reservas corporales.	Reporta adecuado consumo de frutas, grasas y azúcares, bajo consumo de farináceos, verduras y carnes y muy bajo consumo de lácteos. Muy bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.

15	Voluntario	M	19	Moderada	Peso: 78.8 Kg Talla: 1.79 m IMC: 24.7 P. Cintura: 83.0 cm Dx: Normal	Realiza 4 tiempos de comida. Usualmente presenta flatulencia. No tolera las leguminosas.	Aunque incluye alimentos de todos los grupos, las cantidades reportadas son insuficientes para cubrir sus requerimientos.	Reporta adecuado consumo de frutas, carnes y lácteos, bajo consumo de verduras, grasas y azúcares y muy bajo consumo de farináceos. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
16	Voluntario	M	21	Leve	Valoración antropométrica pendiente.	Realiza 4 tiempos de comida. No tolera el café en exceso. Consume suplemento de tiamina.	Las cantidades reportadas no son suficientes para cubrir sus requerimientos; poca variedad de alimentos.	Reporta adecuado consumo de carnes y azúcares, bajo consumo de farináceos y verduras, muy bajo consumo de frutas y lácteos y alto consumo de grasas. Muy bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
17	Voluntario	M	31	Moderada	Peso: 68.1 Kg Talla: 1.70 m IMC: 23.5 P. Cintura: 84.3 cm Dx: Normal	Realiza 4 tiempos de comida. Usualmente presenta flatulencia. Consume salvado de trigo como fuente de fibra dietaria.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de grasas, bajo consumo de verduras, carnes y azúcares y muy bajo consumo de farináceos, frutas y lácteos. Muy bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
18	Voluntaria	F	31	Leve	Peso: 59.2 Kg Talla: 1.59 m IMC: 23.4 P. Cintura: 80.5 cm Dx: Normal + Obesidad abdominal	Realiza 3 tiempos de comida. Usualmente presenta distensión y flatulencia. No tolera la leche entera, las leguminosas y ocasionalmente la carne.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de frutas, bajo consumo de farináceos, verduras y grasas, muy bajo consumo de lácteos y alto consumo de carnes y azúcares. Aceptable consumo de fuentes de fibra.	Antecedentes de gastritis.

19	Voluntario	M	21	Moderada	Peso: 72.1 Kg Talla: 1.77 m IMC: 23.0 P. Cintura: 76.7 cm Dx: Normal	Realiza 5 tiempos de comida.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de frutas, carnes y azúcares, bajo consumo de farináceos y verduras, muy bajo consumo de lácteos y alto consumo de grasas. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
20	Voluntario	M	25	Moderada	Peso: 74.6 Kg Talla: 1.72 m IMC: 25.4 P. Cintura: 87.8 cm Dx: Pre-Obesidad	Realiza 4 tiempos de comida. Usualmente presenta flatulencia. No tolera las lentejas.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de verduras, frutas, carnes, lácteos y grasas, y bajo consumo de farináceos y azúcares. Aceptable consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
21	Voluntario	M	19	Moderada	Peso: 60.0 Kg Talla: 1.71 m IMC: 20.6 P. Cintura: 76.3 cm Dx: Normal	Realiza 4 tiempos de comida. Usualmente presenta distensión y flatulencia. No tolera las leguminosas. Consume complemento nutricional.	Incluye alimentos de todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es limitada.	Reporta adecuado consumo de farináceos, verduras, frutas, carnes, grasas y azúcares, y muy bajo consumo de lácteos. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.
22	Voluntario	M	19	Moderada	Peso: 55.0 Kg Talla: 1.65 m IMC: 20.3 P. Cintura: 75.0 cm Dx: Normal	Realiza 5 tiempos de comida. Usualmente presenta flatulencia. En los últimos 6 meses consumió complemento de fibra dietaria.	Incluye alimentos de casi todos los grupos, en porciones adecuadas para su edad y género, aunque la variedad de alimentos y preparaciones es muy limitada.	Reporta adecuado consumo de farináceos, verduras, frutas y azúcares, muy bajo consumo de lácteos y alto consumo de carnes y grasas. Bajo consumo de fuentes de fibra.	Ninguna.

# I. Anexo: Formato valoración médica

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	
<b>Consumo de alcohol</b>	
<b>Realización de actividad física</b>	

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	
<b>Antecedentes médicos</b>	
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**  
MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11

## J. Anexo: Valoraciones medicas

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	18 DE NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	1042

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 15
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NO
<b>Consumo de alcohol</b>	SOCIAL. 4 CERV CADA 15 DÍAS
<b>Realización de actividad física</b>	CINCO VECES A LA SEMANA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	CA PANCREAS ABUELO PATERNO HIPERTENSIÓN ARTERIAL TODA LA FAMILIA
<b>Antecedentes médicos</b>	SEPTORINOPLASTIA, TORCIÓN TESTICULAR
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NINGUNO
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	RINITIS, DEPOSICIONES UNA VEZ DIARIA. NO SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES
<b>Peso (Kg)</b>	78.8
<b>Talla (m)</b>	1.79
<b>IMC</b>	24.7
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	110/55 FC 62 FR 18 EX FISICO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	18 NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 14
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	22
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NO
<b>Consumo de alcohol</b>	NO
<b>Realización de actividad física</b>	NO

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	FAMILIA MATERNA HTP, ABUELO CA PROSTATATA
<b>Antecedentes médicos</b>	NO
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NO
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	DEPOSICIONES 2 VECES AL DÍA, SÍNTOMAS DIGESTIVOS ASOCIADOS A COMIDA AYER
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	98/58 FC 70 FR 18 LEVE DOLOR EPIGÁSTRICO

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	SE DAN RECOMENDACIONES DE HIDRATACIÓN

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	18 NOV 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 22
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	19
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	
<b>Consumo de alcohol</b>	CADA DOS SEMANAS 2-3 CERVEZAS
<b>Realización de actividad física</b>	2 VECES POR SEMANA.

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	MADRE HIPOTIROIDEA
<b>Antecedentes médicos</b>	TX OBSESIVO COMPULSIVO EN ESTUDIO
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	SERTRALINA 50 MG DÍA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	EN EL MOMENTO RINOFARINGITIS VIRAL ASOCIADO A AUMENTO DE DEPOSICIONES DE CARACTERÍSTICAS BLANDAS 3 AL DÍA
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	82/50 FC 82 FR 22 ADENOPATÍAS CERVICALES BILATERALES OROFARINGE ERITEMATOSA, TIROIDES NORMAL, CARDIOPULMOANR NORMAL, LEVE DOLOR ABDOMINAL EN MARCO COLICO IZQUIERDO, RUIDOS INTESTINALES AUMENTADOS, NO OTRO HALLAZGO

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	SE DAN RECOMENDACIONES DE LAVADO DE MANOS, ANTIHISTAMÍNICOS Y SIGNOS DE ALARMA GASTROINTESTINALES.

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
 ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
 FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
 VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	18 NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 17
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	CADA SEMANA 2 CIGARRILLO
<b>Consumo de alcohol</b>	CADA DOS SEMANAS 5 CERVEZAS
<b>Realización de actividad física</b>	3 VECES POR SEMANA 1 HORA. BICICLETA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	NIEGA
<b>Antecedentes médicos</b>	NIEGA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	RINITIS OCASIONAL, DEPOSICIONES 2-3 VECES DÍA, NO SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	110/82 FC 58 FR 18 EXAMEN FÍSICO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
 T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
 ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
 FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
 VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	18 NOVIEMBRE 203
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 12
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	18
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NIEGA
<b>Consumo de alcohol</b>	NIEGA
<b>Realización de actividad física</b>	3 VECES A LA SEMANA 1 HORA DIARIA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	ABUELO MATERNO CA PROSTATÁ,
<b>Antecedentes médicos</b>	NIEGA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	LORATADINA OCASIONAL
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	EN EL MOMENTO ASINTOMÁTICO, DEPOSICIONES 1 AL DÍA NO SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	98/52 FC 60 FR 18 EXMEN FÍSICO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
 T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	18 NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 19
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	21
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NIEGA
<b>Consumo de alcohol</b>	CADA DOS SEMANAS 5 TRAGOS
<b>Realización de actividad física</b>	3 VECES A LA SEMANA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	NIEGA
<b>Antecedentes médicos</b>	TEMBLOR ESCENCIAL
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	PROPANOLOL OCASIONAL
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	NIEGA, NO SINTOMAS GASTROINTESTINALES, DEPOSICIÓN UNA VEZ AL DÍA
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	116/58 FC 68 EXAMEN FÍSICO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	NINGUNA

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
 ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
 FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
 VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	18 NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 20
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	25
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NIEGA
<b>Consumo de alcohol</b>	UNA CERVEZA AL MES
<b>Realización de actividad física</b>	2 VECES POR SEMANA, 1 HORA DÍA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	ABUELA MATERNA DM
<b>Antecedentes médicos</b>	NIEGA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	NIEGA, DEPOSICIONES UNA VEZ AL DÍA NO SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	112/70 FC 76 EXAMEN FÍSICO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
 T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	19 NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntaria 2
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NO
<b>Consumo de alcohol</b>	CADA DOS SEMANAS 2 CERVEZAS
<b>Realización de actividad física</b>	2 VECES POR SEMANA, 2 HORAS

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	HTA PÁDRE
<b>Antecedentes médicos</b>	ENFERMEDAD ACIDOPEPTICA,
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	H PYLORI ERRADICACIÓN
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	G0A0P0. NO PLANIFICA

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	ASINTOMÁTICA, DEPOSICIONES UNA AL DÍA
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	TA 82/58 FC 60 EXAMEN FÍSICO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	19 NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntaria 11
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	18
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NO
<b>Consumo de alcohol</b>	MUY RARO
<b>Realización de actividad física</b>	UNA VEZ A LA SEMANA 1 HORA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	TIA DIABETICA
<b>Antecedentes médicos</b>	NIEGA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	GOAOP0 NO PLANIFICA

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	LEVES SÍNTOMAS RESPIRATORIO, DEPOSICIONES UNA VEZ DIARIA NO SÍNTOMAS GASGTROINTESTINALES
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	TA 110/70 OROFARINGE LEVEMENTE ERITEMATOSA ADENOPATIA ERVICAL UNILATERAL NO OTRO HALLAZGO

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	19 NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntaria 8
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NUNCA
<b>Consumo de alcohol</b>	MUY RARAMENTE
<b>Realización de actividad física</b>	2 VECES POR SEMANA 2 HORAS

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	HIPERTENSÓN PADRES
<b>Antecedentes médicos</b>	COLECISTECTOMIA, CX REFRACTIVA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	EN EL MOMENTO EN MANENJO ANTIPARASITARIO CON AZOLES
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	G2A1P1CO

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	AUMENTO DE DEPOSICIÓN, LEVE DOLOR ABDOMINAL EN MEJORÍA.
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	TA 100/64 FC 74 LEVE DOLOR ABDOMINAL NO OTRO HALLAZGO AL EXAMEN FÍSICO

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	19 NOVIEMBRE
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntaria 7
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NUNCA
<b>Consumo de alcohol</b>	DOS SEMANAS 3 CERVEZAS
<b>Realización de actividad física</b>	3 VECES A LA SEMANA 2 HORAS

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	NIEGA
<b>Antecedentes médicos</b>	CESAREAS, SAFENECTOMIA BILATERAL, CX PARPADOS
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	GP2C2A0 UTERO BICORNE

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	VERTIGO LEVE, NO SINTOMAS GASTROINTESTINALES, DEPOSICIONES UNA VEZ AL DÍ
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	92/60 FC 64 EXAMEN FÍSICO EN EL MOMENTO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	19 DE NOVIMEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 16
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	21
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	ESPORADICAMENTE
<b>Consumo de alcohol</b>	DOS VECES AL MES 1 LITRO
<b>Realización de actividad física</b>	OCASIONALEMENE

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	ABUELA MATERNA HIPOTIROIDISMO
<b>Antecedentes médicos</b>	APENDICECTOMÍA, HERNIA INGUINAL.
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	DEPOSICIONES UNA VEZ AL DÍA, NO SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	100/54 FC 70 DOLOR ISQUIOTIBIALES DERECHOS, NO OTRO HALLAZGO AL EXAMEN FÍSICO

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	19 NOVIEMBRE
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntaria 9
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NUNCA
<b>Consumo de alcohol</b>	MUY RARAMENTE
<b>Realización de actividad física</b>	DIARIAMENTE 2 HORAS

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	MADRE HTP
<b>Antecedentes médicos</b>	TASTORNO DEPRESIVO
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	SERTRALINA EN EPISODIOS
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	G2A0P2C0 POMEORY

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	ASINTOMÁTICA. DEPOSICIONES U O DOS AL DÍA
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	TA 104/62 FC 64 LEVE AUMENTO DE RUIDOS INTESTINALES NO OTRO HLALZGO AL EXAMEN FÍSICO

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	19NOVIEMBRE 2013
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntaria 1
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	1 CIGARRILO CAD TRES DÍAS
<b>Consumo de alcohol</b>	CADA MES 4 CERVEZAS
<b>Realización de actividad física</b>	TODOS LOS DÍAS, BICICLETA 1 HORA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	HIPERTENSIÓN PADRE
<b>Antecedentes médicos</b>	NIEGA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	GOPOAO NO PLANIFICA

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	ASINTOMÁTICA NO SINTOMAS GASTROINTESTINALES, DEPOSICIONES 2 VECES AL DÍA
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	TA 120/62 FC 76 PANÍCULO ADIPOSO ABDOMINAL RESTO DE EXAMEN FÍSICO SIN ANORMALIDADES

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	20 de noviembre
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 21
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NIEGA
<b>Consumo de alcohol</b>	CADA DOS SEMANAS, AGUARDIENTE 6 TRAGOS
<b>Realización de actividad física</b>	DOS VECES POR SEMANA 2 HORAS

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	ABUELA PATERNA DM. HTA ABUELA MATERNA EPILEPSIA TIO, PARKINSON PADRE
<b>Antecedentes médicos</b>	NIEGA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	NO SINTOMAS GASTROINTESTINALES, DEPOSICIONES UNA AL DÍA
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	106/70 FC 58 EXAMEN FÍSICO SIN ALTERACIONES

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	20 NOVIEMBRE
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntario 10
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NIEGA
<b>Consumo de alcohol</b>	MUY RARA VEZ
<b>Realización de actividad física</b>	2 ECES POR SEMANA, 1 HORA

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	VISABUELA DM,
<b>Antecedentes médicos</b>	CONVULSIÓN FEBRIL A LOS DOS AÑOS
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	LEVE CONGESTIÓN NASAL
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	TA 90/62 FC 72 OROFARINGE LEVEMENTE ERITEMATOSA NO OTRO HALLAZGO.

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
ENSAYO BIOLÓGICO FIBRA Y EFECTO PREBIÓTICO  
FASE DE SELECCIÓN DE PARTICIPANTES  
VALORACIÓN MÉDICA**

<b>Fecha</b>	20 DE NOVIEMBRE
<b>Hora</b>	

<b>DATOS GENERALES</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Voluntaria 5
<b>Fecha y Lugar de Nacimiento</b>	
<b>Edad</b>	
<b>Ocupación</b>	

<b>HÁBITOS</b>	
<b>Consumo de cigarrillo</b>	NIEGA
<b>Consumo de alcohol</b>	UNA VEZ AL MES, 4 CERVEZAS
<b>Realización de actividad física</b>	1 VEZ A LA SEMANA, 3 HORAS

<b>ANTECEDENTES</b>	
<b>Antecedentes familiares</b>	DM TIO MATERNO
<b>Antecedentes médicos</b>	NIEGA
<b>Antecedentes farmacológicos</b>	NIEGA
<b>Historia Gineco-obstétrica</b>	G0A0P0, NO PLANIFICA

<b>EXAMEN FÍSICO</b>	
<b>Presencia de síntomas</b>	ASINTOMÁTICA NO SÍNTOMAS GASTROINTESTINALES
<b>Peso (Kg)</b>	
<b>Talla (m)</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Perímetro de la cintura (cm)</b>	
<b>Presión Arterial (mm Hg)</b>	TA 82/50 FC 60 EXAMEN FÍSICO NORMAL

<b>DIAGNÓSTICO</b>	
<b>Riesgo Cardiovascular Latente (%)</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANDREY ERNESTO MONTAÑEZ YANQUÉN**

**MÉDICO GENERAL  
T.P. 70576 R.M 048/11**

## Bibliografía

Abásolo, P. (2014). Optimización de un método de HPLC con detección mediante Índice de refracción para la cuantificación de carbohidratos solubles en forrajes (Magister). Universidad de Oviedo.

Başaran, U., Akkik, M., Mut, H., Gülümser, E., Çopur Doğrusöz, M., Koçoğlu, S., (2017). High-performance liquid chromatography with refractive index detection for the determination of inulin in chicory roots. *Anal. Lett.* 51, 83–95.

Bernal Castro, c. (2017). *Evaluación del comportamiento de cultivos probióticos y prebióticos en bebidas de frutos rojos* (Magister). Universidad Nacional de Colombia.

Bruno F. A.; Lankaputhra W. E. V. y Shan N. P. (2002). Growth, Viability and Activity of *Bifidobacterium* spp. In Skin Milk Containig Prebiotics. *Journal of Food Science.* 67:2740-44.

Carvalho A.L., Helmolz, K., Nodet, C., Molzer, C., Leonard, C., McKeivith, B., Thielecke, F., Jackson, K., Tuohy, K. (2010). Determination of the in vivo prebiotic potential of a maize-based whole grain breakfast cereal: a human feeding study. *British Journal of Nutrition.*

Castañeda, G. (2017). Microbiota intestinal, probióticos y prebióticos. *Enferm Inv (Ambato).*; 2(4):156-160. *Enfermería Investiga, Investigación, Vinculación, Docencia y Gestión.* Vol. 2 No 4. (Oct-Dic).

Chung D. H and Day D. F. (2002). Glucopoligosacarides from *Leuconostoc mesenteroides* B – 742 (ATCC 13146): A potencial prebiotic. *Journal of Industrial microbiology and Biotechnology.* 29: 196 – 199.

Costa, M., Frasao, B., Lima, B., Rodrigues, B., & Junior, C. (2016). Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. *Talanta*, 152, 162-170. doi: 10.1016/j.talanta.2016.01.061

Doran, P. (1995). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*, Editorial Acribia. S.A. España.

Drakoularakou, A., McCartney, A. L., Rastall, R. A., & Gibson, G. R. (2004). Established and emerging prebiotics and their effects on the gut microflora. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 15, 18-20.

Drzikova B, Dongowski G, Gebhardt E, Habel A. The composition of dietary fibre-rich extrudates from oat affects bile acid binding and fermentation in vitro. *Food Chemistry*. 2005; (90):181-92.

El-Kholy, W., Aamer, R., & Ali, A. (2020). Utilization of inulin extracted from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots to improve the properties of low-fat synbiotic yoghurt. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(1), 59-67. doi: 10.1016/j.aosas.2020.02.002

Ficha técnica biopolímero Bilac®. Consulta: 2010.

Figuroa, I., Rodríguez, G., Hernández, H., Jiménez, J., Lorena, G., García, M., & Cruz, A. (2009). Efecto de prebióticos en el crecimiento de probióticos. In XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (p. 1). México D.F: Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Fuller, R. & Gibson, G. R. (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement*, 32, 28-31.

Fuller, R. & Gibson, G. R. (1998). Probiotics and prebiotics: Microflora management for improved gut health. *Clinical Microbiology and Infection*, 4, 477-480.

García Albornoz, m. (2006). *Determinación y caracterización de fructanos provenientes de henequén* (Magister). Centro de investigación científica de yucatán , a.c.

Gibson, G. R. (2004). Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition, Supplement*, 1, 25-31.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125: 1401-1412.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. (2008). *Handbook of prebiotics*. CRC Press. Boca Raton. 485 p.

Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17,259-275.

Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A., & Costabile, A. (2010). In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 2114-2121.

González, B., Gómez, M., Jiménez, Z. (2003). Bacteriocinas de Probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. Vol. 4 No. 2. Abril - Junio. Facultad de Salud Pública y Nutrición (Universidad Autónoma de Nuevo León).

Grimoud J, Durand H, Courtin C, Monsan P, Ouarné F, Theodorou V, Roques C. (2010). *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe*. 16: 493-500.

Guarner, F., Sanders, M., Eliakim R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A., Kim, N., De Paula, J., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., Le Mair, A. Merenstein, D., Salminen, S. (2017). Probióticos y prebióticos. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Guía mundial de la WGO. World Gastroenterology Organisation.

Herawati, E., Miftakhussolikah, M., Nurhayati, R., Sari, K., & Pranoto, Y. (2019). Oligosaccharides Profile and Prebiotic Potential of Gembolo Tuber (*Dioscorea bulbifera*). *IOP Conference Series: Earth And Environmental Science*, 251, 012048. doi: 10.1088/1755-1315/251/1/012048

ISSAP, (2008). International Scientific Asociation for probiotics and prebiotics (6<sup>th</sup> meeting in Ontario, Canada, November.

Khangwal, I., & Shukla, P. (2019). Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 27(3), 649-656. doi: 10.1016/j.jfda.2019.02.003

Kolida S. and Gibson, G. R. (2007). Prebiotic Capacity of Inulin-Type Fructans. *The Journal of Nutrition. Supplement.* 2503S – 2506S.

Kun Lee, Y., and Salminen, S. (2009). *Handbook of probiotics and prebiotics.* 2 edition. New Jersey. 595 p.

Matissek, R., Schnepel, F., Steiner, G., (1992). *Análisis de los Alimentos, Fundamentos, Métodos, Aplicaciones,* Editorial Acribia. S.A. España.

McLaughlin, H., Motherway, M., Lakshminarayanan, B., Stanton, C., Paul Ross, R., & Brulc, J. et al. (2015). Carbohydrate catabolic diversity of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* of human origin. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 109-121. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.008  
Ministerios de Agricultura, Industria del yogur sigue creciendo en Colombia, Agronet-MinAgricultura, Bogotá, 2018.

Mitsou E, Panopoulou N, Turunen K, Spiliotis V, Kyriacou A. (2010). Prebiotic potential of barley derived b-glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study. *Food Research international* 43: 1086 -1092.

Muñoz Mabel, 2011. Efecto de los fructooligosacaridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp. Tesis de maestría en Ciencia y tecnología de alimentos.

Neysens P, Messens W, Gevers, D, Swings J, De Vuyst, L. 2003. Biphasic Kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus Amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. *Microbiology.* 149, 1073 – 1082.

Olveira G y González I. 2007 Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutr Hosp.*;22(Supl. 2):26-34. Unidad de Nutrición Clínica y Dietética. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. Instituto de Salud Carlos III. Red RD06/001510008. España. ISSN 0212-1611

Ortega, R., Marcos, A., Aranceta J., Mateos J., Requejo, A., Serra, L. (2002). *Alimentos Funcionales. Probioticos.* Editorial Médica Panamericana. Madrid. España.

Pedone C. A, Bernabeu A. O, Postaire E. R, Bouley C. F, Reinert P. (1999). The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN- 114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres. *Int J Clin Pract.* 53: 179 -184

Pizarro C, Sebastián, Ronco M, Ana María, & Gotteland R, Martín. (2014).  $\beta$ -glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud?  $\beta$ -glucans: what types exist and what are their health benefits?. *Revista chilena de nutrición*, 41(4), 439-446. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182014000400014>

Prescott, L. (2005). *Microbiología*. McGraw Hill.

Quattrocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S., Laba, R. (1992) *Introducción a la HPLC, Aplicación y Practica*, Artes gráficas Farro SA, Argentina.

Rastall, R. (2013). Gluco and galacto-oligosaccharides in food. *Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care*, 16(6), 675-678. doi: 10.1097/mco.0b013e328365b5fd

Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* Aug;104 Suppl 2:S1-63.

Roberfroid, M; Van Loo, J; Gibson, G. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hidrolisis products. *The journal of nutrition.* 128: 11-19.

Saavedra J. M, Bauman N. A, Oung I, Perman J.A. Yolken R.H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus termofilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet.* 334: 1046 -1049.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R. et al. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80, S147-S171.

Sarbini, S., Kolida, S., Gibson, G., & Rastall, R. (2012). In vitro fermentation of commercial  $\alpha$ -gluco-oligosaccharide by faecal microbiota from lean and obese human subjects. *British Journal Of Nutrition*, 109(11), 1980-1989. doi: 10.1017/s0007114512004205

Saulnier, D. M., Kolida, S., & Gibson, G. R. (2009). Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 1403-1414.

Schaafsma, G., & Slavin, J. (2014). Significance of Inulin Fructans in the Human Diet. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 14(1), 37-47. doi: 10.1111/1541-4337.12119

Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Nat. Acad. USA* 99:14422–14427.

Sherman P.N, Cabana, M, Gibson, G, R. Koletzko, B, V., Neu, J, Wauters, G, V., Ekhard E. Z, and Walker, W, A. (2009) Potential Roles and Clinical Utility of Prebiotics in Newborns, Infants, and Children: Proceedings from a Global Prebiotic Summit Meeting, New York City, June 27-28, 2008. *J Pediatr*. 155:S61-70.

Shin H. S; Lee J. H; y Pestka J. (2000). Growth and Viability of Comercial *Bifidobacterium spp.* in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. *Journal of Food Science*. 65:884-87.

Sims, I., Ryan, J., & Kim, S. (2014). In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus spp.* *Anaerobe*, 25, 11-17. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.11.001

Sungsoo S., and Finochiaro T. (2010). Handbook of probiotics and prebiotics ingredients: health benefits and food applications. CRC Press. Boca Raton. 435 p.

Tingirikari, J., Gomes, W., & Rodrigues, S. (2017). Efficient Production of Prebiotic Gluco-oligosaccharides in Orange Juice Using Immobilized and Co-immobilized Dextranase. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 183(4), 1265-1281. doi: 10.1007/s12010-017-2496-2

Tuohy K. M, Robert, H. M, Smelkal, C. W, Gibson G. R. (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Therapeutic focus*. 8. 15: 692 – 700.

Vanderhoff, J. A, Whitney, D.B, Antonson D. L, Hanner T. L, Lupo J. V., Young, R. J. (1999). Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic – associated diarrhea in children *J Pediatr*. 135: 564 – 568.

Vives, María Carolina. (2010). Fermentabilidad *in vivo* del bpolímero Bilac® y determinación de la producción de ácidos grasos de cadena corta. Trabajo de grado de Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International* 42: 8–12.

Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M., van Neerven, R., Nauta, A., & van Sinderen, D. (2013). Selective carbohydrate utilization by Lactobacilli and Bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1132-1146. doi: 10.1111/jam.12105

WHO. (2011). Organización mundial de la salud. Probióticos en la alimentación. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/probiotics2/en](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en).

Zeaiter, Z., Regonesi, M., Cavini, S., Labra, M., Sello, G., & Di Gennaro, P. (2019). Extraction and Characterization of Inulin-Type Fructans from Artichoke Wastes and Their Effect on the Growth of Intestinal Bacteria Associated with Health. *Biomed Research International*, 2019, 1-8. doi: 10.1155/2019/1083952

Ziemer, C. J. & Gibson, G. R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8, 473-479.