



ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE ADICIÓN DE PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS EN GELATINA PARA LA ELABORACIÓN DE UN ALIMENTO FUNCIONAL

Ulacio de Paz Karina Stela

Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), Decanato de Agronomía,
Programa de Ingeniería Agroindustrial, Barquisimeto Estado Lara, Venezuela.

Email: karinaulacio@ucla.edu.ve.

ASA/EX -2015-23.
Recibido: 08-06-2015
Aceptado: 10-11-2015

RESUMEN

El estudio se fundamenta en la evaluación de la factibilidad del empleo de gelatina como ingrediente base en la elaboración de un alimento funcional, la cual fue inoculada con probióticos constituido por BB-12 (*Bifidobacterium*.) para valorar su crecimiento y prebióticos como suplemento de fuentes de carbono con el propósito de favorecer su desarrollo y estabilidad en el tiempo. Inicialmente se procedió a activar el microorganismo constituido por una cepa comercial de cultivo puro de BB-12 en estado liofilizado, incubando 1 g. del cultivo en 99 mL. en caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS), el cual fue suplementado con 0,05 % (p/v) de L- Cisteína, como fuente esencial de nitrógeno para reducir el potencial de oxidación del medio (condiciones anaeróbicas estrictas que se requieren). Las unidades experimentales fueron conformadas por 24 muestras de 20 g de gelatina comercial marca royal sabor a frambuesa, las combinaciones se obtuvieron a través de un diseño de mezcla Simplex-Rejilla empleando el software STATGRAPHICS Plus versión 8.0. Los resultados del análisis estadístico efectuado permitieron determinar las combinaciones óptimas de probióticos en los cuales el BB-12 posee una concentración igual o superior a 10^6 UFC/g requisito indispensable para que el alimento pueda considerarse funcional, de esta manera las diluciones 10^5 y 10^7 reflejaron valores entre $1,45 \times 10^7$ a $4,9 \times 10^7$ UFC/ml. . Por último, se confirmó la presencia de BB-12 en las colonias obtenidas a través de una tinción de gram, las cuales fueron evidenciadas en cantidad y forma de manera satisfactoria.

Palabras clave: Alimento funcional, probióticos, prebióticos, gelatina y simplex rejilla.



STUDY OF THE FEASIBILITY OF ADDING PROBIOTICS AND PREBIOTICS IN GELATIN FOR THE DEVELOPMENT OF A FUNCTIONAL FOOD

ABSTRACT

The study is based on the evaluation of the feasibility of using gelatin as a base ingredient in the manufacture of a functional food, which was inoculated with probiotic constituted by BB-12 (*Bifidobacterium*.) to assess growth and prebiotic supplement sources carbon in order to encourage their development and stability over time. Initially we proceeded to activate the microorganism comprising a commercial strain of pure culture of BB-12 in lyophilized state, incubating 1 g. in 99 mL of culture in Man Rogosa and Sharpe broth (MRS), which was supplemented with 0.05% (w / v) L-Cysteine as an essential source of nitrogen to reduce the potential for oxide reduction means (strict anaerobic conditions required). The experimental units were made up of 24 samples of 20 g. of commercial brand royal jelly raspberry flavor, combinations were obtained through a mix design using the Simplex-Grid STATGRAPHICS Plus version 8.0 software. The results of the statistical analysis made it possible to determine the optimal combinations of probiotic in which the BB-12 has a less than 10^6 CFU / g. concentration prerequisite for the functional food to be considered, so the dilutions 10^5 and 10^7 reflected values between $1,45 \times 10^7$ to $4,9 \times 10^7$ CFU / ml. . Finally, the presence of BB-12 in the colonies obtained through a Gram stain was confirmed, which was evident on amount and form satisfactorily.

Keywords: Functional food, probiotics, prebiotics, gelatin and simplex grid.



INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales se definen como aquellos alimentos que proporcionan un efecto beneficioso a la salud superior a los tradicionales (Aracenta y Gil, 2012). Dentro de la gama de alimentos funcionales están los prebióticos y los probióticos. Los prebióticos son ingredientes no digeribles que estimulan el crecimiento de uno o más tipos de bacterias en el colon. Por su parte, los probióticos son microorganismos vivos que al ser agregados como suplemento en la dieta, favorecen el desarrollo de la flora microbiana en el intestino (De las Cagigas y Blanco, 2002). En este sentido, la investigación consistió en estudiar el comportamiento del probiótico constituido por BB-12 (*Bifidobacterium*.) en gelatina enriquecida con prebióticos, para determinar la factibilidad del desarrollo de un alimento funcional. Actualmente en el mercado venezolano existen alimentos funcionales con BB-12 en su composición, pero se caracterizan por ser de origen lácteo, lo que podría ser una limitante para algunos consumidores que sufren de intolerancia a la lactosa. Por esta razón, la investigación utiliza

como alimento base gelatina, la cual ofrece características deseables que pueden contribuir a la supervivencia y desarrollo de las BB-12, del mismo modo no ocasiona alteraciones digestivas debido a la ausencia de la lactosa, además de ser atractivo por considerarse en el mercado un postre o una golosina. La gelatina es un producto muy valorado en la industria alimentaria, la mayor propiedad nutritiva se debe a que posee en su composición aproximadamente el 90% de proteína en estado puro, constituida principalmente por colágeno, además de tener elevadas propiedades funcionales debido a su capacidad de retención de agua (Edwards, 2002). Por otra parte, el probiótico que se empleará en el análisis está constituido por un cultivo puro de *Bifidobacterium* (BB-12), las cuales son bacterias benéficas, no patógenas. Las BB-12 son habitantes naturales del tracto gastrointestinal que representan del 3-10 % en la microflora del adulto y el 90% en los infantes alimentados con leche materna. Este grupo bacteriano tiene un papel vital en el balance microbiano intestinal y en la modulación de la respuesta inmune del huésped. Los efectos beneficiosos de las



BB-12 son de relevancia clínica, debido a que incluyen la prevención de enfermedades diarreicas y la protección de actividades carcinogénicas en el colon, entre otras (Sanz, 2007). Ante lo expuesto, se consideró la incorporación de probióticos en gelatina, los cuales estarán representados por inulina, oligofruktosa y miel, que se caracterizan por ser que brindan un efecto beneficioso para el organismo estimulando selectivamente el crecimiento favorable o la actividad de un número determinado de bacterias autóctonas (Oliveira y González, 2007). En este sentido, la investigación se fundamenta en la elaboración y evaluación de un alimento funcional novedoso y atractivo al mercado, con alto valor nutricional que genere un impacto positivo a la salud de las personas que lo consuman. Dentro de las especificaciones del producto a diseñar se debe contemplar un mínimo de 1×10^6 ufc / g de BB-12 valor crítico para conferirle el carácter funcional al alimento (Olagnero *et al.*, 2007). Del mismo modo, como se ha mencionado anteriormente, su composición debe poseer una combinación adecuada de prebióticos que aumente sus propiedades

benéficas y que podría contribuir a mantener concentraciones adecuadas de BB-12. Los productos elaborados con BB-12 en su formulación, se consideran seguros según su clasificación taxonómica, por ello es esencial que sean correctamente identificados a nivel de género y especie, por esta razón, se realizó un análisis cualitativo de las colonias obtenidas para garantizar que se trata de microorganismos de grado alimentario y de esta manera garantizar la inocuidad del alimento.

MATERIALES Y METODOS

1.-Activación del microorganismo: Para realizar la investigación se empleó una cepa comercial de cultivo puro de BB-12, en estado liofilizado de la marca CHR HANSEN. La activación se realizó incubando un gramo del cultivo en 99 ml en caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS) modificado marca MERK para rehidratación, fue suplementado con 0,05 % (p/v) de L- Cisteína, como fuente esencial de nitrógeno para BB-12 y poder reducir el potencial de oxido – reducción del medio (condiciones anaeróbicas estrictas que se requieren). De este procedimiento se generaron



aproximadamente 4 g de biomasa. De acuerdo al rendimiento, se prepararon 15 vasos de precipitado adicionando 99 mL de caldo MRS, para luego adicionar un gramo de cultivo puro a cada uno (15 g de cultivo liofilizado de BB-12), para obtener un total de 60 gr de biomasa de BB-12. Una vez incubadas las 15 unidades, se almacenaron en una estufa a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron temperadas y se refrigeraron a 5 °C, para posterior centrifugación a 5000 RPM en un lapso de 15 min, el sedimento obtenido representó la biomasa de cultivo de BB-12 utilizada.

2.- Obtención del título de BB-12: Una vez obtenida la biomasa se procedió a realizar las diluciones respectivas y la siembra en profundidad en agar MRS para determinar la cantidad de células viables. Para garantizar el crecimiento de BB-12 se suplementó agregando 0,05% de cisteína y una sobre capa de agar MRS para mejorar las condiciones anaeróbicas, luego se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 72 horas, transcurrido el tiempo se realizó el recuento de las placas y se cuantificó el número de células viables.

3.- Estandarización del cultivo: Se realizó una curva de crecimiento empleando la técnica de medición de densidad celular utilizando el Spectronic 20, a una longitud de onda de 600 nm. Para tal fin, el cultivo fue acondicionado (activado y rehidratado) en caldo MRS. Seguidamente este cultivo se incorporó al 5 % (v/v) en el mismo medio recién preparado, distribuyéndolo en tubos de ensayo con tapa de goma e incubado bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Posteriormente se determinó el pH y la absorbancia a intervalos de 60 min., hasta determinar la fase estacionaria, es decir, el momento que la absorbancia se hace constante en el tiempo.

4.- Preparación de las unidades experimentales e incubación del BB-12:

Las unidades experimentales fueron conformadas por 24 muestras de gelatina comercial sabor a frambuesa (COVENIN 1992), con peso aproximado de 20 gr., la unidad, la cantidad de prebióticos empleados para la preparación se realizó de acuerdo a la formulación planteada en el cuadro 2, en este sentido el 93% de gelatina-agua se adicionó para ser mezclado con los prebióticos



(oligofruktosa, inulina y miel) que constituyeron el 5% de la formulación. La cantidad y las combinaciones están definidas de acuerdo a lo establecido en el diseño experimental mostrado en la tabla 1, donde X_1 oligofruktosa, X_2 inulina y X_3 miel.

Cuadro 1. Matriz de diseño de mezcla Simplex-Rejilla con la distribución de prebióticos para la gelatina funcional.

U E	Factores		
	X_1	X_2	X_3
1	0	100	0
2	100	0	0
3	50	0	50
4	0	0	100
5	50	50	0
6	0	50	50

Cuadro 2. Formulación para la elaboración de gelatina funcional.

Ingrediente	Proporción
Gelatina	93 %
Prebiótico (Azúcares)	5%
Probióticos (Cultivo)	2%

Una vez realizado el diseño de mezclas y conocida la formulación para realizar las

muestras se elaboró la gelatina de manera habitual, según el procedimiento establecido en el empaque. Tomando en cuenta la formulación establecida anteriormente de gelatina, prebióticos y prebióticos, se conformaron 4 grupos de muestras constituidas por 6 unidades experimentales descritas en la cuadro 1. Cada grupo de 6 muestras se evaluó en un periodo de tiempo de 5 días durante 20 días de manera consecutiva.

5.- Dilución y siembra en las capsulas de petri:

En esta etapa se realizó la dilución y siembra de cada grupo de muestras en el intervalo de tiempo descrito anteriormente para estimar el crecimiento y estabilidad del prebiótico en el tiempo. Los recuentos fueron tomados a las 48 h de la incubación. El procedimiento para el cumplimiento de esta etapa se realizo según lo establecido por la Norma Venezolana C OVENIN 1989 el cual se muestra a continuación:

- a. Se tomó el grupo de análisis que correspondía a la fecha establecida (G_1 , G_2 , G_3 ó G_4) que contenían los 6 tubos de ensayo con las diferentes codificaciones.
- b. Se pesaron 10g de muestra de cada tubo y se adicionaron en un frasco



- que contenía 90 mL de caldo MRS al 1%.
- c. Se transfirió 1 mL de (b) a un tubo de ensayo que contenían 10 mL de caldo MRS (dilución 1^{-1}).
 - d. Luego se transfirió 1 mL de (c) a un nuevo tubo de ensayo que contenían 10 mL de caldo MRS (dilución 10^{-2}) y se repitió el procedimiento hasta que se generaron las diluciones de 10^{-5} , 10^{-6} .
 - e. Se mezcló cuidadosamente cada nueva dilución, agitando con 25 movimientos de arriba hacia abajo aproximadamente en 8 segundos.
 - f. Una vez culminado el procedimiento, se colocó 1 mL de las diluciones 10^5 y 10^6 por duplicado en placas de petri previamente esterilizadas.
 - g. Se adicionó a cada placa de 12 a 15 mL (aproximadamente) del agar MRS previamente fundido y temperado a 40 °C. Es importante destacar que antes de adicionar el agar a la placa de petri se adicionó 0,05% de cisteína por cada 100 mL de agar.
 - h. Se mezcló el agar, mediante movimientos de rotación sobre una superficie plana.
 - i. Se dejaron en reposo durante 8 a 10 min, una vez solidificado el agar se agregó una nueva capa de aproximadamente 10 mL de agar MRS para garantizar las condiciones anaerobias que se requieren.
 - j. Se incubaron las placas en jarra de anaerobiosis de forma invertida a 37°C. Para garantizar las condiciones anaeróbicas se introdujo un sobre de anaerocultivo marca MERK, al cual se le adicionaron 35 mL de agua.
- 6.- Recuento de colonias: Finalizado el periodo de incubación transcurridos 3 días, se estimó el número total de BB-12 presentes en la muestra, para ello se empleó el método de recuento estándar en placas y el método del número más probable (NMP) (Murray, 2006).
- 7.- Tinción de gram: En esta etapa se realizó una tinción de gram a las colonias obtenidas en el experimento, con la finalidad de evidenciar cualitativamente la presencia de las BB-12, tomando en cuenta que son un grupo de microorganismos que se caracterizan por ser bacilos gram-positivos, inmóviles que se tiñen de morado. Para realizar la tinción se adiciona colorante cristal violeta, el cual se queda atrapado en la capa gruesa de



peptidoglucano que rodea a la célula. Del mismo modo se comparó su morfología celular, que se presenta como bacilos de forma variada característicamente como bastones únicos o en cadena, en forma de "Y" o "V" agrupados, sus extremos por lo general muestran protuberancias y pueden o no tener una o más ramificaciones (Murray, 2006).

8.- Procesamiento y análisis de datos:

Los datos obtenidos fueron procesados aplicando un análisis de varianza y un diseño de mezclas simplex rejilla, para ello se empleó el programa STATGRAPHICS Plus versión 8.0. Para obtener las combinaciones de probióticos y prebióticos mediante la aplicación de diseño de mezclas, se realizó el siguiente procedimiento:

- a. Se cargaron los datos del log del crecimiento de BB-12 en el software.
- b. En la tabla de herramientas de se seleccionó la opción avanzada, posteriormente se seleccionó la opción diseño experimental y luego se seleccionó la opción analizar diseño.
- c.- En la opción analizar diseño se procedió a seleccionar y a introducir la columna respuesta (crecimiento

BB1, crecimiento BB2 ó crecimiento BB3) y se presionó la opción aceptar.

- d.- Al abrir la ventana del análisis de mezcla se determinó el modelo apropiado, realizando la comprobación del modelo en el resumen del análisis a través del ANOVA para la respuesta seleccionada.
- e.- Por último, se identificaron, optimizaron y seleccionaron las formulaciones que presentaron los valores óptimos, aplicando el criterio del mayor Log de BB-12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.-Título de BB-12: la cantidad de células viables del BB-12 en la biomasa obtenida supera el orden de 10^6 unidades formadoras de colonias en las diluciones 10^5 - 10^7 , obteniéndose un valor entre $1,45 \times 10^7$ a $4,9 \times 10^7$ UFC/ml, requisito indispensable para poder ser inoculada en la gelatina.

2.-Estandarización del cultivo: la estandarización del cultivo se realizó a través de una curva de crecimiento donde se observa que existe un incremento en los valores de absorbancia, de 0,08



durante la primera hora, a valores máximos de 1,422 de absorbancia a las 28 horas. El máximo crecimiento de BB-12, se determina con el mayor valor de la absorbancia en un lapso de 24 horas luego de haber sido reconstituido el microorganismo. La fase de latencia es de 2 horas, considerándose larga si se compara con organismos que se reproducen en sólo 20 o 30 minutos. Por su parte, la fase exponencial se extendió por 24 horas, las bacterias en este instante se aprecia un mayor consumo de nutrientes que les permite incrementar su velocidad de crecimiento, por lo tanto en el caso de los probióticos es beneficioso que aumenten en número e incluso se podría acelerar esa reproducción aumentando la cantidad de nutrientes del medio. En esta etapa se determinó que el crecimiento de la BB-12 es particularmente lento si se compara con otros microorganismos probióticos como el *Lactobacillus casei*; el cual dura 2 horas en alcanzar la fase estacionaria. En la fase estacionaria ya no hay multiplicación. Las bacterias probióticas, en esta fase entran en acción ejerciendo su actividad

gastrointestinal sobre la flora intestinal y sobre otros organismos patógenos (Murray, 2006).

3.-Recuentos de BB-12 obtenidos:

durante la determinación del número de células viables presentes en las muestras, medidos en el tiempo a temperatura de refrigeración 4 °C, se observó que la supervivencia del BB-12 en las gelatinas durante los primeros 15 días de ensayo, se encuentran dentro del límite crítico considerado por Sanz (2007). En este sentido, pueden aportar beneficios de salud y ser considerado un alimento probiótico o producto funcional. Adicionalmente se observa que las unidades experimentales que fueron tratadas con la adición de oligofruktosa e inulina y sus interacciones, presentaron mayores recuentos finales de BB-12 durante el tiempo del ensayo. La mayor sobrevivencia en las gelatinas con 0,5g de inulina y 0,5 g de miel, obtuvo recuentos de $7,84 \pm 0,21$ a los 15 días de almacenamiento, valores que cumplen con el límite crítico de calidad funcional del producto (log 6) como se refleja en la cuadro 3.

Cuadro 3. Recuentos (ufc/g) de BB-12 presentes en las muestras de gelatina, durante su almacenamiento a condiciones de refrigeración (aprox. 4 °C). (log – Ufc./g.)



Días	Oligofructosa	Inulina	Miel	Olig./ Inu	Olig./miel	Inul/ miel
0	^a 6,25 ± 0,03	^a 6,25 ± 0,03	^a 6,25 ± 0,03	^a 6,25±0,03	^a 6,25 ± 0,03	^a 6,25 ± 0,03
5	^a 7,77±0,12	^d 6,51±0,12	^f 5,13±0,17	^c 6,90±0,18	^b 7,49±0,15	^e 5,33±0,15
10	^a 8,44±0,4	^b 8,38±0,12	^e 7,73±0,20	^c 8,36±0,12	^d 7,96±0,17	^f 7,60±0,18
15	^e 7,44±0,15	^d 7,49±0,12	^c 7,61±0,18	^b 7,69±0,25	^f 6,40±0,17	^a 7,84±0,21

(Medidas con letras iguales no poseen diferencias estadísticamente significativas, las de mayor significancia son jerarquizadas según el orden alfabético.)

El cuadro anterior manifiesta que existen diferencias significativas en la muestras, reflejando valores min de log 5,13±0,17 en el día 5 de interacción con miel,

valores máximos de 8,44 ± 0,4 durante el día 10 en la interacción con oligofructosa y durante el día 15 un valor de 7,84±0,21 en la interacción de con inulina y miel.

Cuadro 4. Valores de Probabilidad de los modelos lineal y cuadrático de los recuentos del BB-12 para los días 5, 10 y 15 de almacenamiento de la gelatina.

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

El cuadro 4 presenta los resultados de los distintos modelos de los recuentos del BB-12 en un periodo de 5, 10 y 15 días de (previa transformación de la variable), el modelo lineal consta de términos de primer orden para cada uno de los componentes y el modelo cuadrático añade productos cruzados entre pares de componentes. Al observar el p-valor de los modelos involucrados en la cuadro 4,

se obtiene que las ecuaciones cuadráticas son las de mayor adecuación para predecir las respuestas de los cambios del BB-12, ya que p-valor es inferior a 0,05 por lo tanto las predicciones de las combinaciones de los componentes de la mezcla se establecieron con los modelos cuadráticos.



Cuadro 5. Coeficientes de determinación de los modelos lineales y cuadráticos de la muestras de gelatina con probióticos y prebióticos.

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

En el cuadro 5 son presentados los coeficientes de determinación de los modelos estudiados (R²), los mismos indican aceptable capacidad de predicción de los modelos poblacionales planteados ya que, estos son superiores al 80% y los valores son cercanos al R² adjuntados, es decir, que los componentes oligofructosa, inulina y miel explican las respuestas Log recuento de BB-12 en el tiempo de estudio, en los porcentajes que indica el cuadro 5. De igual manera se visualiza que los R² de mayor significancia los poseen los modelos cuadráticos. En la Figura 1, se describe el comportamiento de las mezclas de oligofructosa, inulina y miel sobre los recuentos de BB-12 en la gelatina, presentándose la variación del Log (ufc/g) de BB-12 durante los primeros 5 días de almacenamiento en función de las tres variables del estudio según el modelo cuadrático correspondiente.

En la figura 1 se evidencia que al aumentar la concentración de oligofructosa se incrementan los valores de la concentración de BB-12 en la gelatina.

A su vez se aprecia que los componentes inulina y miel solo actúan a concentraciones bajas en la mezcla ya que a medida que son incrementados en porcentaje causa un efecto negativo en la sobrevivencia del BB-12 en la gelatina, generando un efecto más acentuado en el factor concentración de miel. Por lo antes expuesto se puede inferir que el prebiótico que beneficia considerablemente al BB-12 durante los primeros 5 días de almacenamiento, es la oligofructosa. Para validar la capacidad del modelo y estimar el Log (ufc/g) de BB-12 en la gelatina, se estimó con la ecuación de mezcla descrita anteriormente y se seleccionó una mezcla aleatoria conformada por 0,66g de oligofructosa, 0,33 g de inulina,



obteniéndose un valor de Log 7,068. Este valor se comparó con el registrado en el promedio de tres determinaciones del

recuento de BB-12, el cual dio un promedio de Log 7,08.

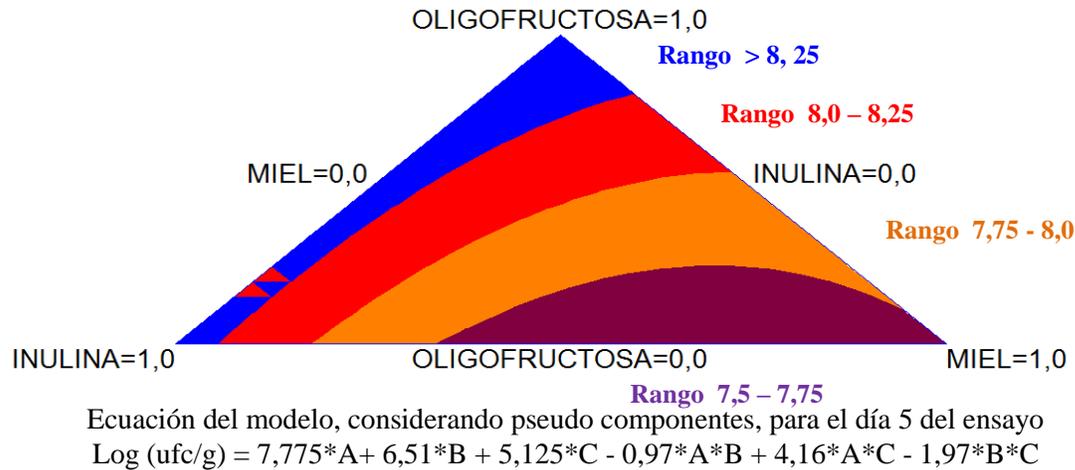


Figura 1. Gráfico de contornos y modelo cuadrático de mezcla durante 5 días de almacenamiento, correspondiente a la variable respuesta Log (ufc/g) de BB-12, en función de los factores: Oligofruktosa (A), Inulina (B) y Miel (C).; *Mezcla referencial 0,33g A; 0,33g B; 0,33g C. $R^2 = 0,9995$ ($p < 0,05$).

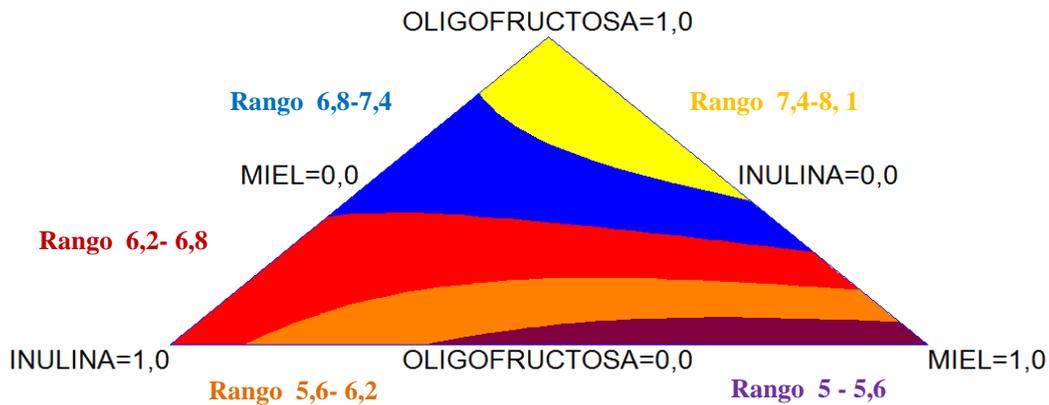
En la Figura 2, se presenta la variación del Log (ufc./g) de BB-12 en la gelatina durante 10 días de almacenamiento respectivamente, en función de las tres variables del estudio según el modelo correspondiente. Analizando las figuras 2 y 3 se observa que en ambos tiempos (10 y 15 días) la inulina posee un efecto parabólico y participativo positivo en cuanto al mayor crecimiento de BB-12 en la gelatina, incluso teniendo la mayor

influencia al final del ensayo. Este comportamiento del efecto probiótico de la inulina en recuento a los 15 días de la experimentación y la incorporación de la miel como factor importante en las postrimerías del ensayo (15 días), permite inferir que se debe al consumo selectivo de los BB-12 de la oligofruktosa como fuente de energía inicial (10 días), y luego por el grado de complejidad de cada carbohidrato, el BB-12 lo utiliza para su



mantenimiento dentro de la matriz de la gelatina. Adicionalmente, se infiere un efecto prebiótico importante en la gelatina debido a las interacciones Inulina-Miel y Inulina- oligofruktosa, tal efecto posee característica de sinergia y esta es la

razón del incremento de la población de BB-12 en el tiempo, contrario a lo reportado por Tapía (2007) y Balza (2013), donde manifestaron una disminución progresiva del BB-12 al transcurrir el tiempo de almacenamiento.



Ecuación del modelo, considerando pseudo componentes, para el día 15 del ensayo
 $\text{Log (ufc/g)} = 7,44*A + 7,495*B + 7,605*C + 0,89*A*B - 4,51*A*C + 1,16*B*C$

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



4.- Comprobación de los BB-12 en la gelatina mediante Tinción de gran: El cultivo de BB-12 obtenido de las muestras de gelatina fue sometido a un análisis cualitativo por medio de una tinción de gram, el cual permitió validar la presencia del BB-12 en las muestras. La observación mediante el microscopio demuestra que son bacterias gram positivas debido a la fijación del color violeta (tinción de Gram), del mismo modo se observó su morfología celular manifestada como bacilos inmóviles de forma variada característicamente como bastones únicos o en cadena, sus extremos muestran protuberancias y pueden tener una ó más ramificaciones. Las características de las BB-12 presentes en las muestras de gelatina se presentan en la Figura 4.



Figura 4. Vista al microscopio del BB-12 presente en la gelatina.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten comprobar la conveniencia de emplear gelatina como medio para la incorporación de probióticos y prebióticos, demostrando que la cantidad de células viables del BB-12 en las muestras de gelatina supera el orden de 10^6 UFC en las diluciones 10^5 y 10^7 , obteniéndose un valor entre $1,45 \times 10^7$ a $4,9 \times 10^7$ UFC/ml, requisito indispensable para considerar un alimento como funcional, certificando el logro de los objetivos.

Al realizar la estandarización del cultivo, se determinaron las fases del crecimiento del BB-12, observándose que la fase exponencial dura 24 horas, momento en el cual ejercen mayor consumo de nutrientes que les permite incrementar la velocidad de crecimiento la cual se aceleró al aumentar la cantidad de sustratos del medio constituidos por la oligofructosa, la inulina y la miel.

Durante la evaluación de las interacciones del BB-12 con los prebióticos, se evidenció que el componente que beneficia considerablemente al BB-12 durante los



primeros 5 días de almacenamiento, es la oligofruktosa. Sin embargo, durante los días 10 y 15 de almacenamiento se observó un efecto parabólico y participativo prebiótica que posee la inulina en cuanto al mayor recuento de BB-12 en la gelatina. Este comportamiento de la inulina a los 15 días de la experimentación y posteriormente la incorporación de la miel, hace inferir que se debe al consumo selectivo de los BB-12 de la oligofruktosa como fuente de energía inicial (10 días) y posteriormente el consumo de inulina y la miel como fuente secundaria, por lo que se puede predecir que el BB-12 utiliza los dos últimos prebióticos para su mantenimiento dentro de la matriz de la gelatina. De manera general, la investigación confirma que la gelatina en combinación con prebióticos posee las características funcionales adecuadas para la supervivencia y crecimiento del BB-12, evidenciando que la oligofruktosa y la inulina representan un sustrato preferencial para las bacterias benéficas. Es importante destacar, que el mercado de alimentos funcionales se encuentra en pleno desarrollo y cada vez se conocen mejor los mecanismos de acción de cada

componente asociados a la acción benéfica en los alimentos. Por esta razón, para desarrollar un nuevo producto funcional es necesario conocer a fondo el comportamiento de los distintos ingredientes que se desean utilizar para su elaboración, de ello dependerá el éxito de los resultados, que deben ser fundamentados con un adecuado análisis experimental que garantice condiciones óptimas para el manejo de las variables en estudio. De igual manera, se debe realizar una evaluación integral del producto final, tomando en cuenta las normativas vigentes correspondientes a los alimentos involucrados, así como también los parámetros microbiológicos, lo que permite garantizar al consumidor productos inocuos, de alta calidad y que cumplan con las regulaciones establecidas por las normativas Venezolanas.

REFERENCIAS

- Aracenta, J. y Gil A. (2009). *Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y Juvenil*. Editorial Panamericana. España 89-95.
- Balza, M. (2013). *Evaluación de la supervivencia de Bifidobacterium (BB-12) en un laminado de mango*



- (*mangifera indica.*) aplicando cobertores alginato y gelano. Tesis de maestría. Universidad Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, UNELLEZ. San Carlos Estado Cojedes.
- De las Cagigas A. y Blanco G., (2002). *Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. Cubana revista cubana de alimentos.* [En línea]. Disponible: http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.htm. [Consulta [20 Octubre 2013].
- Edwards, W. (2002). *La ciencia de las golosinas.* Editorial Acribia. España. 44-47.
- Murray, P. (2006). *Microbiología médica.* Ediciones Mosby. España. 75-80.
- Norma Venezolana COVENIN (1989). N°1126. Alimentos. Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico. Fondonorma. Caracas.
- Norma Venezolana COVENIN (1992). N°2946. Gelatina Comestible. Fondonorma. Caracas.
- Olagnero, G. y Abad, Genevois, C. (2007). *Alimentos funcionales: Fibra, probióticos y simbióticos.* Argentina. 62, 89-96.
- Oliveira, F. y González M (2007). *Probióticos y prebióticos en la práctica clínica.* España. 26-34.
- Sanz, P. (2007). Monografía VI. *Alimentos y Salud. Instituto de España Real academia de Farmacia.* España. 319-320.
- Tapia, M. (2007). *Desarrollo de un producto funcional de fruta por impregnación a vacío y películas comestibles usando matrices solidas de papaya. Tesis Doctoral.* UCV. Caracas-Venezuela.