

Análisis de las propiedades nutricionales de un alimento probiótico a base de lentejas

Analysis of the nutritional properties of a lentil-based probiotic food

Daniela Escola

Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Maracaibo, Venezuela
Correo Electrónico: xuxaperli@gmail.com

Junior Rivas

Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Maracaibo, Venezuela
Correo Electrónico: juniorivasgonzalez@gmail.com

Laugeny Díaz

Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Maracaibo, Venezuela.
Correo Electrónico: laugeny.diaz.8396@uru.edu

Recibido: 17-01-2022

Aceptado: 11-04-2022

Resumen

El objetivo de esta investigación fue analizar las propiedades nutricionales de un alimento probiótico a base de lentejas (*Lens culinaris*). Desarrollando una investigación del tipo descriptiva, cuantitativa y aplicada, con diseño experimental, se formuló un alimento con lentejas y la bacteria *Lactobacillus casei*, se prepararon inóculos bacterianos a concentración final de 3 cel/mL. El producto con gel de lentejas, puré de banana y leche permitieron la viabilidad de las cepas. Se realizó evaluación sensorial, análisis bromatológicos y microbiológicos. Los recuentos de mohos, levaduras, coliformes totales y fecales cumplieron con la norma venezolana. Se obtuvo en los análisis bromatológicos: Cz(T0)= 2,62±0,10% y Cz(T7)= 2,56±0,69%, EE(T0)= 8,50±0,07% y EE(T7)= 4,89%±0,21, PC(T0)= 18,62±0,04% y PC(T7)= 19,00±0,04%, FC(T0)= 4,05±0,18% y FC(T7)= 3,56±0,31%, H(T0)= 84,09±0,17% y H(T7)=83,96±0,10%. Se concluye que el alimento probiótico presenta alto contenido de proteínas, fibra cruda y cenizas, además de tener calidad microbiológica y aceptabilidad por el público.

Palabras clave: Probiótico, *L. casei*, lentejas, análisis bromatológicos, análisis microbiológicos.

Abstract

The objective of this research was to analyze the nutritional properties of a probiotic food based on lentils (Lens culinaris). Developing a descriptive, quantitative and applied research, with an experimental design, a food was formulated with lentils and the bacterium Lactobacillus casei, bacterial inocula were prepared at a final concentration of 3×10^8 cells/mL. The product with lentil gel, mashed banana and milk allowed the viability of the strains. Sensory evaluation, bromatological and microbiological analyzes were carried out. The counts of molds, yeasts, total and fecal coliforms complied with the Venezuelan standard. It was obtained in the bromatological analyses: Cz(T0)= 2.62±0.10% and Cz(T7)= 2.56±0.69%, EE(T0)= 8.50±0.07% and EE (T7)= 4.89%±0.21, PC(T0)= 18.62±0.04% and PC(T7)= 19.00±0.04%, HR(T0)= 4.05± 0.18% and HR(T7)= 3.56±0.31%, H(T0)= 84.09±0.17% and H(T7)=83.96±0.10%. It is concluded that the probiotic food has a high content of protein, crude fiber and ashes, in addition to having microbiological quality and acceptability by the public.

Keywords: Probiotic, *L. casei*, lentils, bromatological analysis, microbiological analysis.

Introducción

En Venezuela, la búsqueda de un probiótico para ayudar a mejorar la salud de las personas es importante, dado que en la actualidad no existe una comercialización de este tipo de suplementos. Por esta razón, se estudia los componentes de los diferentes productos que cuenta en su composición con microorganismos vivos a fin de elaborar un probiótico óptimo. Razón por la cual, este estudio, se plantea elaborar un alimento probiótico a base de lentejas, ya que, este alimento, favorecer el tránsito intestinal, controla la anemia, mejora el funcionamiento del sistema nervioso y mejora la concentración, todo esto aunado a las propiedades benéficas de los probióticos existentes.

En resumen, para la elaboración de este alimento se aíslan bacterias probióticas a partir de un medicamento comercial llamado Liolactil, aplicando técnicas de laboratorio microbiológico, para obtener un inóculo que fue estandarizado para ser útil como cultivo iniciador en la fermentación del alimento, permitiendo, entonces enfocar la investigación en metodologías para la cuantificación y validación de estos productos que es de utilidad para la salud de la sociedad venezolana.

Este estudio se enfoca en analizar las propiedades nutricionales de un alimento probiótico a base de lentejas, por medio de análisis sensoriales, bromatológicos y microbiológicos en un proceso experimental a escala de laboratorio realizado a las mismas condiciones del manual de la AOAC [1]. Todo esto con el fin de elaborar un alimento probiótico de calidad que ayuda a mejorar la salud intestinal del consumidor y estable en condiciones de refrigeración. Este artículo deriva de la investigación “Análisis de las propiedades nutricionales de un alimento probiótico a base de lentejas (*Lens culinaris*)” presentado como Trabajo Especial de Grado por Escola y Rivas [2].

Materiales y Métodos

La presente investigación se desarrolló con un nivel descriptivo, para permitir establecer las condiciones operativas que requiere un nuevo alimento probiótico en la industria alimentaria y, así que abarcar el máximo aprovechamiento de recursos locales. Por lo que en este trabajo se describe el proceso para la elaboración del alimento probiótico a base de lentejas y se especifican las características fisicoquímicas y microbiológicas del mismo. De igual forma, esta fue del tipo cuantitativa, debido a que está basada en el análisis de resultados realizados a través de diferentes procedimientos sustentados en la medición

El diseño de la investigación fue del tipo experimental y longitudinal, debido a que en los análisis microbiológicos y bromatológicos se tiene una manipulación directa de las variables por medio de un control y un grupo tratamiento, el cual es característico de un diseño experimental “puro” ya que se realizan exámenes a dos tipos de alimentos (variable dependiente), el grupo control es un alimento sin inóculo bacteriano y el tratamiento es el alimento probiótico con el inóculo bacteriano, manipulando la variable de concentración del inóculo (variable independiente). Asimismo, se considera longitudinal porque los datos que se recogen en la encuesta y los derivados de los análisis se hacen al inicio y a los siete días de refrigeración del producto. Hernández *et al.* [3].

La unidad de análisis está constituida por el *Lactobacillus sp.* el cual a través de procedimientos microbiológicos de crecimiento bacteriano se logró extraer y aislar a partir del medicamento comercial “Liolactil”, este contiene la bacteria *Lactobacillus casei liofilizada* y las lentejas seleccionadas de la marca Alimentos Mary adquiridas en un supermercado de la localidad de Maracaibo.

Para esta investigación se seleccionó como población al personal del Instituto de Previsión y Asistencia Social del Ministerio de Educación (IPASME), ubicado en la calle Cecilio Acosta, Ciudad de Maracaibo, Estado Zulia/Venezuela. La población IPASME cuenta con un número finito de 236 individuos, de los cuales quince (15) fueron seleccionados para el muestreo del alimento a examinar.

De esta forma se procedió a la elaboración de un instrumento tipo cuestionario compuesto por siete (7) items planteados bajo la escala de Likert, en el cual los sujetos indicaran, por medio de opciones como muy agradable, agradable, indiferente, desagradable, muy desagradable, las diferentes opiniones sobre el alimento.

Por otro lado, se utilizaron tablas como instrumento de recolección y procesamiento de datos. En dichas tablas se registraron los resultados obtenidos en los análisis de caracterización bromatológicos y microbiológicos

Fase I: Preparación de los inóculos de *Lactobacillus casei* como cultivos iniciadores para la fermentación de los azúcares presentes en los ingredientes

La preparación de los inóculos de *Lactobacillus casei* empieza con la preparación del medio de cultivo selectivo para aislamiento y enumeración de lactobacilos según lo indicado por Man, Rogosa y Sharpe (MRS) ISO 9232:2003[4] ISO 15214:1998 [5]., pero con la diferencia de que para esta investigación no se utilizó un litro del producto sino setecientos mililitros, los cuales posteriormente se dividen para preparar medio de cultivo líquido y sólido. Se realizó el proceso de preparación del medio líquido con los datos extraídos de la página web del laboratorio MICROKIT que indica la receta para la preparación del medio de cultivo estandarizada para un litro, con la diferencia de que algunos reactivos fueron sustituidos por otros de igual composición, como son el extracto de carne, que fue reemplazado por caldo tripticasa de soya (TBS) (para un litro se utilizan cuatro gramos del reactivo) y el Tween 80, que fue sustituido por el Tritón X-100 en su misma cantidad.

Posteriormente se preparó la mezcla en agua destilada (menos el agar), se procede a mezclar en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, hasta que la solución quede de manera homogénea. Luego se traspasan a dos matraces, uno para el medio líquido (caldo) y otro para preparar medio sólido, el cual lleva agar-agar a una concentración final del 1,5% en la solución. Seguidamente, el medio de cultivo sólido se llevó a esterilización por calor húmedo en autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos y se dejó en prueba de esterilidad incubando por 24 horas a 37° C en la incubadora. Microkit, [6].

El medio de cultivo líquido fue sembrado con el producto microbiano liofilizado de la marca comercial Liolactil que contiene los lactobacilos (específicamente *Lactobacillus casei* variedad *rhannosus*) a una concentración de 1,5 gramos, equivalente a UFC/g. Vidal [7]. Se mezcló el matraz y se incubó en campana con vela por 48 horas a 35-37°C y se observó turbidez en el medio de cultivo indicativo del crecimiento microbiano. Luego se midió la turbidez del cultivo por el método nefelométrico con la escala McFarland [8]. Microkit, [6]. Para verificar la pureza del cultivo, se realizó una tinción de Gram y se observó al microscopio con objetivo de inmersión de 100X.

Se preparó medio de cultivo nuevo en tubos de ensayo y en placas de Petri y se sembraron con el cultivo crecido en el matraz bajo las mismas condiciones de incubación que fueron descritas anteriormente Microkit, [6]. Se esterilizó el asa de siembra (asa en aro) y con esta se toma un poco del medio de cultivo en el que ha crecido el microorganismo, se comienza a hacer la primera estría, y a partir de la siembra al final de la primera estría se comienza una segunda estría en forma de zigzag en otra dirección y de la misma forma se hace una tercera estría en otra dirección hasta abarcar la superficie de toda la placa de Petri, terminada la siembra se colocó forma invertida la caja de Petri a incubación, en un envase cerrado herméticamente (campana Gaspak) con una vela encendida. Luego observó el crecimiento microbiano a través de colonias crecidas en medio sólido y se anotaron características macroscópicas y microscópicas (tinción de Gram).

Fase II: Elaboración del alimento probiótico a base de lentejas mediante fermentación bacteriana.

El producto alimenticio fermentado fue elaborado con lentejas y puré de banana. El producto incluyó una combinación de ingredientes como gel de harina de lentejas (55,33%), puré de banana (23,33%), leche (11,34%) e inóculo bacteriano (10%). La preparación de la harina fue realizada por molienda hasta 0,5 mm con ayuda de un molino de laboratorio Thomas-Wiley, modelo 4, posterior a un proceso de sanitización de los granos con agua clorada en una relación 1:3 y secado por 48 horas a 64. Luego se sometió a cocción hasta obtener un gel, para ser mezclados con el resto de los ingredientes utilizando un homogeneizador. Posteriormente, los geles y productos fueron sometidos a 90 por 30 min en autoclave. Luego de enfriados fueron inoculados con la cepa de *Lactobacillus casei*. Los productos y geles inoculados se colocaron en la incubadora a 42 durante

un tiempo de 5 horas para permitir el proceso de fermentación, este constituyó el alimento inoculado, pero también se dispuso de un control (alimento no inoculado), los cuales se analizaron al tiempo cero (T0) y al día siete de refrigeración (T7), por duplicado.

Fase III: Caracterización del alimento probiótico a base de lentejas mediante análisis microbiológicos, bromatológicos y sensoriales

Para desarrollar los análisis bromatológicos, microbiológicos y sensoriales (tanto al grupo tratamiento como al grupo control) se siguieron una serie de pasos aplicados para analizar los parámetros del alimento para valorar su calidad microbiológica y nutricional, a su vez recibiendo la opinión del público evaluando sus propiedades organolépticas. En un análisis microbiológico se busca el recuento total de mohos y levaduras, coliformes totales y fecales, siguiendo las normas venezolanas COVENIN 1126-89 [9] de alimentos.

Por otro lado, con los análisis bromatológicos, se busca determinar humedad, extracto etéreo, extracto etéreo, fibra cruda y proteínas. Para los análisis de humedad se sigue del método de Weende, en el cual se pesaron aproximadamente 1 g de la muestra y se colocaron en crisoles de porcelana. Se introdujo en una estufa a 65°C y se mantuvo allí por 24 horas. Una vez finalizado este tiempo se colocaron los crisoles en un desecador durante 20 minutos y enseguida se pesó AOAC [1].

Para el análisis de ceniza se utiliza el método de Weende, el cual consiste en que 1 g de la muestra es pesado en un crisol de porcelana, el cual se colocó en un horno incinerador a 550°C durante 5 horas, posteriormente se trasladó a estufa a 105°C por una hora y se colocaron los crisoles en un desecador hasta que alcancen la temperatura ambiente y se pesaron AOAC [1]. De igual manera en el análisis de extracto etéreo se usó el método de análisis proximal de Weende, para ello se pesaron 1,5 g de la muestra proveniente del análisis de humedad en papel filtro, y se introdujeron en un cartucho de extracción. Posteriormente se colocó en el extractor y se añadieron 150 mL de éter de petróleo al matraz, se enroscó en la parte inferior del condensador, se subió las placas calentadoras, se dejó hervir por 4 horas, y una vez pasado el tiempo se enfrió en un desecador y se pesó AOAC [1].

Siguiendo este orden, se realizaron análisis de fibra cruda por el método de Weende, en la cual para este proceso se preparó el sistema digestor. Se pesaron 1 g del residuo de la muestra proveniente del extracto etéreo y se colocaron en el matraz de digestión junto con 200 mL de H₂SO₄ al 1,25%, haciendo uso de un vaso de precipitado de 400 mL. Se inició el calentamiento haciendo uso de una plancha y se mantuvo el reflujo durante 30 minutos, enseguida se filtró la mezcla a través de un filtro tipo Oklahoma y se lavó el residuo con agua destilada hirviendo. Seguidamente, se pasó al matraz 200 mL de solución de NaOH al 1,25%; se mantuvo el reflujo hirviendo durante 30 minutos e igualmente se filtró y lavó el residuo en forma similar a lo indicado para el primer filtrado. Se lavó el residuo con 25 mL de etanol y se transfirió y finalmente se llevó a estufa a 110±2°C durante 24 horas. Transcurrido este periodo se dejó enfriar en un desecador durante 30 minutos y se pesó AOAC [1].

De la misma forma, el análisis de proteínas se determinó por medio de análisis proximal de Weende, se pesaron 0,5 gramos de muestra y se colocaron en tubos digestores, se añadieron 10 mL de solución digestora y se colocaron los tubos con la muestra en el digestor por 2 horas a 450°C. Una vez terminada la digestión se dejó enfriar los tubos, mientras tanto, se preparó el matraz Erlenmeyer recolector con 5 mL de solución de ácido bórico al 4% y posteriormente se colocó en el sistema de destilación. A los tubos digestores completamente fríos se le adicionó 75 mL de agua destilada, se colocó el tubo en el aparato de destilación automática; completado esto se realizó la titulación, se anotó el volumen de NaOH gastado. Se llevó a cabo esta determinación por triplicado y se determinó el contenido de proteína AOAC [1].

Además de las caracterizaciones bromatológicas y microbiológicas, se procedió a determinar los análisis sensoriales del alimento probiótico con la población seleccionada de empleados del IPASME la cual representó la muestra o panel de consumidores no entrenados sometidos a las pruebas sensoriales. Los atributos evaluados fueron: color, sabor, aroma, textura, apariencia y aceptabilidad del producto. Por lo tanto, se registraron los

resultados obtenidos y se realizaron los porcentajes de aprobación y desaprobación del alimento probiótico estudiado, en contraste con el alimento del grupo control.

Fase VI: Comparación de la estabilidad de las propiedades nutritivas del alimento probiótico durante el proceso de refrigeración del producto

En esta fase se realizó un análisis estadístico. Para ello se comprobaron los supuestos de normalidad de la población de datos y se siguió una estadística paramétrica la cual consistió en un *t student* que permitió detectar diferencias significativas en las características nutritivas del alimento durante el período de refrigeración tanto en el grupo tratamiento (alimento probiótico) como en el grupo control (alimento sin bacterias probióticas) a un nivel de significancia del 0,05%. En caso de no detectarse diferencias significativas durante el período de refrigeración, se infiere que el alimento mantuvo sus propiedades a través del tiempo, validando su potencial comercialización.

Resultados y Discusión

Preparación de los inóculos de *Lactobacillus sp.* como cultivos iniciadores para la fermentación de los azúcares presentes en los ingredientes

Se prepararon matraces con el medio líquido, denominado caldo MRS, y otro para el medio sólido en la, a partir del cual se prepararon placas de Petri con el medio de cultivo, empleado para el aislamiento bacteriano y para la verificación de su pureza. Una vez preparado el cultivo líquido, se practicó la prueba de esterilidad del medio de cultivo en incubadora a 37 °C por 24 horas, se verificó que el medio de cultivo estuviese estéril (que no presentara turbidez), por lo que se procedió a sembrar el medio líquido con el liofilizado de *Lactobacillus caseivar.rhamnosus* contenido en el medicamento Liolactil, para promover de esta forma el crecimiento del cultivo.

El caldo MRS sembrado con el liofilizado bacteriano, se incubó en una campana por el método de la vela, según las condiciones descritas en la metodología (48 horas en atmósfera de CO₂ al 5%, a 35-37°C) y se verificó el crecimiento de la bacteria mediante observación de turbidez del medio de cultivo.

Se procedió a sembrar en placas de Petri conteniendo el medio sólido mediante la técnica de siembra por estría considerando las condiciones de incubación referidas en la metodología, observándose, luego del período de incubación, crecimiento confluyente de la bacteria. Luego de este proceso, se verificó la homogeneidad en el crecimiento de las colonias bacterianas, como se presenta en la Figura 1, demostrándose que no había otro tipo de crecimiento bacteriano contaminante, se procedió a activar la bacteria en nuevo en el mismo medio de cultivo líquido (caldo MRS), este cultivo fue estimado nefelométricamente de acuerdo a la escala de turbidez de McFarland y llevado a una concentración final estimada de 3,0x10⁸cel/mL.



Figura 1. Crecimiento bacteriano en placas de Petri.

Se verificó la pureza del cultivo mediante la tinción de Gram, presentando la micromorfología y el arreglo bacteriano característico de *Lactobacillus casei* en forma de bastones delgados dispuestos en parejas o en cadenas cortas y con coloración violeta, indicando así que son bacterias Gram positivas y demostrando que el cultivo está puro MacFaddin [8]. Gracias a la verificación de la pureza de la bacteria, se dispuso a verter 5 mL del cultivo bacteriano en tubos de ensayos estériles, de esta forma centrifugando por 10 minutos a 150 rpm, obteniendo el botón celular (pellet) en el fondo de dichos tubos de ensayo.

Se obtiene un sobrenadante (caldo de cultivo sin microorganismos), agregando 5 mL de solución salina a los tubos de ensayo para lavar el botón celular (pellet), con el fin de eliminar toda fuente de carbono remanente. Por último, la solución homogénea con el botón celular (pellet) disuelta con solución salina al 0,85% se inoculó en el alimento que se preparó como se explicará a continuación, de tal manera que diera paso a la elaboración del alimento probiótico formulado.

Elaboración del alimento probiótico a base de lentejas mediante fermentación bacteriana

Se precisaron las cantidades de ingredientes midiendo la masa de cada uno de éstos. De esta manera se conocieron los valores de masa de los componentes de harina de lentejas, leche, cambur e inóculo bacteriano como se evidenció en la Tabla 1, permitiendo tener mayor precisión en la preparación de dicho alimento.

Tabla 1. Ingredientes del alimento probiótico [2]

Ingredientes	Cantidades
Gel de harina	664,00 g
Harina de lentejas	300,00 g
Agua	1400,00 mL
Leche	136,00 mL
Cambur	280,00 g
Inoculo bacteriano	45 mL

Se preparó el gel de harina de lentejas se mezcló con el resto de los ingredientes, logrando el alimento preparado sin inocular, éste se almacenó y se dividió en cuatro partes iguales en diferentes recipientes de vidrio (previamente esterilizados), obteniéndose sus medidas en masa de 300 gramos de alimento en cada frasco. Se procedió a determinar la densidad del alimento, dando como resultado 1,33 g/mL, lo que permitió cuantificar el volumen del alimento como se observó en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades del alimento [2]

Propiedades	Cantidades
Masa del alimento inicial	300,00 g
Volumen del alimento inicial	225,56 mL

Se procedió a esterilizar el alimento en autoclave a 90 °C por treinta (30) minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se dispuso de dos frascos control que corresponden al alimento sin inocular (por duplicado, Control 1 y 2) agregando 45 mL de solución salina al 0,85% y otros dos frascos que corresponden al tratamiento que es el alimento inoculado al 10% (por duplicado, Inoculado 1 y 2) donde se resuspendió el pellet bacteriano en 45 mL de la solución salina al 0,85% de forma homogénea, a una concentración de $3,0 \times 10^8$ cel/mL.

Se realizó el incubado de los frascos a 42°C por 5 horas, y, finalizado este procedimiento se obtuvo el alimento probiótico a base de lentejas (*Lens culinaris*) fermentado con *Lactobacillus casei*; así como el alimento control sin inocular. El alimento es de textura blanda en forma de papilla o puré, siendo la textura deseada. Se finalizó esta fase midiendo la masa y el volumen del alimento probiótico y del control como se apreció en la Tabla 3.

Tabla 3. Propiedades del alimento probiótico inoculado y del control [2]

Control/Inoculado	Masa (g)	Volumen (mL)
Control 1	345	259,40
Inoculado 1	345	259,40
Control 2	335	251,88
Inoculado 2	343	257,89

Caracterización del alimento probiótico a base de lentejas mediante análisis microbiológicos, bromatológicos y sensoriales.

Tomando en cuenta las normas venezolanas COVENIN 1126-1989 [9] de alimentos, codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico, se logró obtener los resultados de los análisis microbiológicos de coliformes totales, coliformes fecales, mohos y levaduras del alimento probiótico y del control elaborados. En la Tabla 4, se observó los resultados de los alimentos en tiempo cero (T0) y tiempo siete (T7).

Tabla 4. Propiedades microbiológicas del alimento probiótico en T0 y T7 [2]

Muestra	Coliformes Totales (NPM/100 g)	Coliformes Fecales (NPM/100 g)	Mohos y Levaduras (UFC/g)
T0	< 1,8	< 1,8	<10
T7	< 1,8	< 1,8	<10

El recuento de mohos y levaduras, coliformes totales y fecales, al tiempo cero y a los siete días de refrigeración como se observan en la Tabla 4, se encontraron dentro de los límites establecidos para la norma oficial para yogurt COVENIN 1337-90 [10], COVENIN 1104-96 [11] y COVENIN 1292-89 [12], que es un alimento probiótico usado como referencia. Los coliformes totales y fecales encontrados en promedio fueron de <1,8 NMP/g, siendo el rango establecido por la norma entre 1,0x10² y 1,0x10³ NMP/100g. Para los mohos y levaduras el valor promedio fue de <10 UFC/g estando la norma entre 10 y 1,0x10² UFC/g. Estos valores permiten deducir que el alimento probiótico elaborado con lentejas, así como el control poseen buena calidad microbiológica.

El alimento fue sometido a análisis bromatológicos como lo es la humedad, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda y proteína cruda, los cuales fueron determinados mediante análisis proximal de Weende AOAC [1]. En la Tabla 5 se pueden observar los resultados para los análisis bromatológicos del alimento control y alimento probiótico en tiempo cero (T0).

Tabla 5. Propiedades bromatológicas del alimento probiótico y alimento control en T0[2]

Replicas	Alimento probiótico					Alimento control				
	%FC	%PC	%EE	%Cz	%H	%FC	%PC	%EE	%Cz	%H
1	4,14	18,58	8,60	2,50	84,22	4,36	19,46	6,14	2,61	83,41
2	4,23	18,69	8,41	2,62	83,84	4,31	18,94	6,41	2,51	81,63
3	3,80	18,60	8,49	2,75	84,21	3,92	18,85	6,34	2,62	83,18
Promedio	4,05	18,62	8,50	2,62	84,09	4,19	19,08	6,30	2,58	82,74
Desviación estándar	0,18	0,04	0,07	0,10	0,17	0,19	0,26	0,11	0,04	0,79

%FC: porcentaje de fibra cruda, %PC: porcentaje de proteína cruda, %Cz: porcentaje de cenizas, %H: porcentaje de humedad

Los valores de los análisis bromatológicos tanto para el alimento probiótico como para el control vistos en la Tabla 5 fueron similares. Se obtuvo que, el alimento control en el tiempo cero sin inóculo bacteriano comparado con el alimento probiótico inoculado con *Lactobacillus casei*, presentó un valor ligeramente mayor en el porcentaje de proteínas (19,08±0,26%) en relación con el alimento probiótico (18,62±0,04%); probablemente en el alimento probiótico las bacterias constituyen una fuente de proteínas en el alimento, mientras que en control lo representan las lentejas que tienen alto contenido proteico. Además, el control exhibió valores ligeramente menores de extracto etéreo (grasas) (6,30±0,11%) y humedad (82,74±0,79%) en

relación con el alimento probiótico ($8,50\pm 0,07\%$ y $84,09\pm 0,79\%$, respectivamente); mientras que, los valores de fibra cruda y cenizas en el control y el alimento probiótico estuvieron bastante cercanos entre sí en el T0.

En la Tabla 6, se estableció las propiedades nutricionales del alimento mediante análisis proximales, tanto para el alimento control como para el alimento probiótico a los siete días de refrigeración (T7).

Tabla 6. Propiedades bromatológicas del alimento probiótico alimento control en T7 [2]

Replicas	Alimento probiótico					Alimento control				
	%FC	%PC	%EE	%Cz	%H	%FC	%PC	%EE	%Cz	%H
1	3,24	19,04	5,10	2,71	84,01	3,54	17,44	5,81	2,09	84,19
2	3,86	18,96	4,89	3,17	83,79	3,18	19,05	4,11	2,65	84,44
3	3,59	19,01	4,67	1,80	84,08	3,40	18,24	5,95	1,17	84,29
Promedio	3,56	19,00	4,89	2,56	83,96	3,37	18,24	5,29	1,97	84,30
Desviación estándar	0,31	0,04	0,21	0,69	0,16	0,18	0,80	1,02	0,94	0,12

La Tabla 6, contiene una comparación de forma general sobre el alimento probiótico a los siete días de refrigeración con el control, reconociéndose que tampoco se observaron grandes diferencias. Se obtuvo, que en el T7 el alimento probiótico aumentó ligeramente en porcentaje de proteínas y cenizas ($19,00\pm 0,04\%$ y $2,56\pm 0,69\%$ respectivamente), e igualmente exhibió un valor mayor del porcentaje en fibra cruda ($3,56\pm 0,31\%$), pero tuvo un valor menor del extracto etéreo ($4,67\pm 0,21\%$) en relación con el control. No obstante, no se apreciaron diferencias en la humedad en ambos tipos de alimento ($83,96\pm 0,15\%$ en el probiótico y $84,29\pm 0,12\%$ en el control).

Los valores de proteína obtenidos son cercanos al 19%, superiores a los obtenidos por Morales de León *et al.* [13] en un alimento probiótico tipo yogurt con base en una mezcla de leche y garbanzo (*Cicer arietinum*) con valor del 8% de proteína, por tanto, el alimento probiótico formulado a base de lentejas proporciona mayor fuente de proteínas que los alimentos formulados por otros autores. El valor de fibra cruda obtenido para el alimento probiótico está cerca del 4% similar al obtenido por Morales de León *et al.* (2000) para yogurt de garbanzo (4,9% de FC). Para el alimento probiótico el porcentaje de cenizas estuvo cercano al 2,5% superior al obtenido por Morales *et al.* [13] del 1,1%, por lo que el alimento probiótico a base de lentejas posee un alto valor de minerales que son beneficiosos para la salud.

El valor de extracto etéreo en el alimento probiótico estuvo entre 4,89 y 8,50%, disminuyendo tras su refrigeración. Valores mayores a los reportados por Morales de León *et al.* [13] en yogurt a base de garbanzos (0,58%), pero similares a los reportados en la bebida probiótica de quinchoncho con 4,5% de grasa Parra *et al.* [14]. Los valores de humedad en el alimento probiótico fueron superiores al 82%, que coinciden con los obtenidos para yogurt a base de garbanzos con 85,4% de humedad Morales de León *et al.* [13] siendo esto importante para mantener la viabilidad de los lactobacilos contenidos en el alimento probiótico, ya que una vez consumidos con el alimento, estos ejercerán su actividad probiótica en el intestino del consumidor, y para lo cual necesitan del agua para sus actividades vitales.

Se tiene que para los análisis sensoriales se realizaron una serie de encuestas a quince (15) personas que laboran en el IPASME Maracaibo. Con esta finalidad se les dio a probar el alimento control y el alimento probiótico en T0 y T7, para posteriormente rellenar dichas encuestas con su opinión acerca de si estos alimentos fueron muy agradables, agradables, indiferentes, desagradables o muy desagradables. A continuación, en la Tabla 7 se apreció los resultados de los análisis sensoriales del alimento probiótico en el T0.

Tabla 7. Propiedades sensoriales del alimento probiótico en T0 [2]

Preguntas	Muy Agradable	Agradable	Indiferente	Desagradable	Muy Desagradable
¿Qué opina al respecto del color del alimento?	40	53,33	6,67	0	0
¿Cuál es su opinión sobre el sabor del alimento?	26,67	60	0	13,33	0
¿Cómo resultó su opinión en cuanto a la textura del alimento?	26,67	53,33	20	0	0
¿Cómo ve la apariencia del alimento?	20	80	0	0	0
¿Qué opina con respecto al aroma del alimento?	40	46,67	0	13,33	0
¿Cuál es su opinión en cuanto a la aceptabilidad del producto?	53,33	40	6,67	0	0
¿Qué opina en relación a la potencial comercialización del producto?	53,33	33,33	6,67	6,67	0

En la Tabla 7, de acuerdo a las respuestas dadas por parte de los trabajadores del IPASME, se obtuvo una buena aceptación del alimento probiótico en el tiempo cero, en cuanto a su color (53,33%), sabor (60%), textura (53,33%), apariencia (80%) y aroma (46,67%) en el rango de “Agradable”. Por otro lado, a su potencial comercialización se indicó que si es un producto que estarían dispuestos a adquirir (53,33%). Seguidamente, en la Tabla 8 se presentaron los resultados de los análisis sensoriales del alimento control en el T0.

Tabla 8. Propiedades sensoriales del alimento control en T0 [2]

Preguntas	Muy Agradable	Agradable	Indiferente	Desagradable	Muy Desagradable
¿Qué opina al respecto del color del alimento?	33,33	60	0	6,67	0
¿Cuál es su opinión sobre el sabor del alimento?	33,33	53,33	13,34	0	0
¿Cómo resultó su opinión en cuanto a la textura del alimento?	46,67	53,33	0	0	0
¿Cómo ve la apariencia del alimento?	46,67	53,33	0	0	0
¿Qué opina con respecto al aroma del alimento?	66,67	20	13,33	0	0
¿Cuál es su opinión en cuanto a la aceptabilidad del producto?	40	46,66	13,33	0	0
¿Qué opina en relación a la potencial comercialización del producto?	53,33	40	0	6,67	0

La aceptabilidad del alimento control de la Tabla 8, fue mayor que la de la Tabla 7 del alimento probiótico en algunos aspectos, como el color (60%) y el aroma (66,67%) ubicados en la escala “Agradable”, esto debido a que el alimento probiótico experimenta una fermentación que cambia el sabor, color y olor del producto dada su mayor acidez que el control. No obstante, las puntuaciones obtenidas en el control en relación al sabor (53,33%), apariencia (53,33%) y aceptabilidad (46,66%) fueron menores a las obtenidas por el alimento probiótico en la escala “Agradable”. Pasados los siete días de refrigeración, se dio nuevamente a probar el alimento control y probiótico a las mismas personas, en la Tabla 9, se presentaron las propiedades sensoriales del alimento probiótico en T7.

Tabla 9. Propiedades sensoriales del alimento probiótico en T7 [2]

Preguntas	Muy Agradable	Agradable	Indiferente	Desagradable	Muy Desagradable
¿Qué opina al respecto del color del alimento?	40	26,6	6,67	20	6,67
¿Cuál es su opinión sobre el sabor del alimento?	20	20	26,67	26,67	6,67
¿Cómo resultó su opinión en cuanto a la textura del alimento?	33,33	40	13,33	6,67	6,67
¿Cómo ve la apariencia del alimento?	20	46,67	13,33	0	20
¿Qué opina con respecto al aroma del alimento?	20	26,67	26,67	20	6,66
¿Cuál es su opinión en cuanto a la aceptabilidad del producto?	33,33	13,33	20	20	13,33
¿Qué opina en relación a la potencial comercialización del producto?	26,67	20	20	20	13,33

En la Tabla 9, la mayoría del personal trabajador del IPASME consideró que el alimento probiótico a los siete días de refrigerado disminuyó su aceptabilidad general (el 33% respondió muy aceptable) en comparación al del tiempo “0”. No obstante, un 40% de los encuestados respondió que el color y la textura del alimento fue de “Muy agradable” a “Agradable”, el 46,67% respondió de forma positiva a la apariencia y un 26,67 % respondió de forma “Agradable” al aroma y de forma “Indiferente” a su potencial comercialización. Solo un bajo porcentaje del 6,67% mencionó que el producto fue muy desagradable en color, sabor, textura y aroma. Las características organolépticas del alimento cambian a consecuencia de la fermentación ocurrida en el producto, incluso durante la refrigeración, porque los lactobacilos están vivos en el alimento, aunque inhibidos por la baja temperatura. A continuación, se muestra en la Tabla 10 las propiedades sensoriales del alimento control en T7:

Tabla 10. Propiedades sensoriales del alimento control en T7[2]

Preguntas	Muy Agradable	Agradable	Indiferente	Desagradable	Muy Desagradable
¿Qué opina al respecto del color del alimento?	53,33	33,33	6,67	0	6,67
¿Cuál es su opinión sobre el sabor del alimento?	33,33	46,67	13,33	6,67	0
¿Cómo resultó su opinión en cuanto a la textura del alimento?	33,33	40	13,33	13,33	0
¿Cómo ve la apariencia del alimento?	40	46,67	6,67	0	6,67
¿Qué opina con respecto al aroma del alimento?	33,33	60	6,67	0	0
¿Cuál es su opinión en cuanto a la aceptabilidad del producto?	46,67	33,33	13,33	0	6,67
¿Qué opina en relación a la potencial comercialización del producto?	46,67	33,33	13,33	0	6,67

En la Tabla 10 se mostró que el alimento control al tiempo siete de refrigeración exhibió mejores puntuaciones en las características organolépticas que la del alimento probiótico en el mismo tiempo, como el color (53,33% “Muy agradable”), sabor (46,67% “Agradable”), aroma (60% “Agradable”), y potencial comercialización (46,67% “Agradable”). No obstante, se debe acotar que este alimento no posee microorganismos probióticos, por tanto, no ejercerá ningún efecto benéfico en la salud del consumidor, lo cual ha sido probado en numerosas investigaciones con alimentos probióticos.

Al comparar las características organolépticas del alimento probiótico en el T7 en relación al tiempo “0” (Tabla 8) se puede notar que por más que ambos fueron de forma general de buena aceptación por los trabajadores del IPASME, el del tiempo siete tuvo algunos desagradados en cuanto al color, sabor, textura, apariencia e igualmente si lo adquirirían tras una potencial comercialización. Estos resultados evidencian que a pesar del tiempo de refrigeración el producto sigue manteniendo su calidad sensorial.

Comparación de la estabilidad de las propiedades nutritivas del alimento probiótico durante el proceso de refrigeración del producto

Se comparó la estabilidad de las propiedades del alimento control y probiótico durante los tiempos cero y siete de refrigeración, por medio del estadístico de prueba t-student para valorar si las medias con diferentes superíndices dentro de una misma fila difieren significativamente ($P < 0,05$), esto expresado en la Tabla 11, mostrando los valores de fibra cruda, proteína, extracto etéreo, cenizas y humedad de las diferentes formulaciones.

Tabla 11. Análisis estadístico de las propiedades bromatológicas del alimento al T0 y T7 de refrigeración [2]

	Probiótico		Control	
	t estadístico	Valor de P	t estadístico	Valor de P
Fibra cruda	2,38	0,140	4,68	0,043*
Proteína	-3,93	0,059	1,343	0,311
Extracto Etéreo	34,91	0,00081*	1,56	0,259
Ceniza	0,14	0,902	1,32	0,317
Humedad	2,81	0,106	-2,49	0,130

*Diferencias significativas a un valor de $P \leq 0,05$.

La mayoría de los parámetros evaluados en el alimento probiótico permanecieron estables durante el período de refrigeración, habiéndose encontrado solamente diferencias significativas en el extracto etéreo, el cual se refiere al contenido de grasas del producto; siendo mayor en el T0 que en el T7 ($P \leq 0,05$). No se obtuvieron diferencias significativas ($P > 0,05$) con las variables de fibra cruda, proteína, ceniza y humedad en el alimento probiótico a lo largo del tiempo.

Por otro lado, en el control, se obtuvieron diferencias significativas solamente en el contenido de fibra cruda ($P \leq 0,05$) el cual fue mayor al T0 que al T7 de refrigeración, probablemente condicionado a la actividad de enzimas amilolíticas y otras, que hidrolizan los carbohidratos complejos hasta azúcares más simples, por acción de algunos microorganismos aún viables en el alimento (Parra et al., 2014). Para el resto de los parámetros analizados no se encontraron diferencias; sin embargo, comparando la humedad y ceniza del alimento control con respecto al alimento control de avena y quinchoncho formulado por Barboza [15] éste presenta valores mayores.

Este alimento probiótico posee características sensoriales de aceptabilidad por el público y exhibe características fisicoquímicas como: alto valor de proteínas, cenizas (minerales) y fibra cruda que le otorgan alto valor nutricional y de propiedades funcionales para la salud del consumidor, poniendo de manifiesto su potencial comercialización en el mercado venezolano.

Conclusiones

Como resultado de la presente investigación se tiene que se permitió el aislamiento de la bacteria probiótica *Lactobacillus casei* a partir del medicamento comercial Liolactil, que sirvió de cultivo iniciador para la elaboración del alimento probiótico a base de lentejas. Se pudo obtener a través de técnicas microbiológicas un cultivo puro de lactobacilos libre de otros microorganismos contaminantes, a partir de la siembra en el medio selectivo Mann, Rogosa y Sharpe (modificado en este trabajo) y mediante la tinción de Gram. Por otro lado, al partir del cultivo puro se pudo obtener el inóculo bacteriano medido en un espectrofotómetro, hasta alcanzar la concentración final de 3×10^8 cel/mL empleado para la fermentación del alimento probiótico.

Se obtuvo el alimento probiótico a base de lentejas (*Lens culinaris*) fermentado con *Lactobacillus casei*; proceso que se llevó a cabo para la medición de masa y volumen del alimento probiótico, de la misma manera se consiguió la textura deseada del producto, siendo ésta una textura blanda en forma de papilla o puré.

Se determinó la calidad microbiológica del alimento probiótico, con valores de mohos, levaduras, coliformes totales y fecales del alimento por debajo de lo contemplado en la normativa venezolana, tanto en el tiempo cero como tiempo siete.

En el tiempo cero hay una ligera disminución en el alimento probiótico del porcentaje de proteínas y aumento de extracto etéreo (grasas) y humedad comparada con el alimento control. Por otro lado, no se apreciaron diferencias con respecto a las propiedades de fibra cruda y cenizas. Para el tiempo siete el alimento probiótico aumentó ligeramente en porcentaje de proteínas, pero hubo disminución del de extracto etéreo, sin diferencias en relación con la humedad, todo esto comparándose con el alimento control.

El alimento probiótico formulado a base de lentejas proporciona mayor fuente de proteínas que los alimentos formulados por otros autores, posee un alto valor de fibra cruda, beneficiosa para la salud intestinal, tiene alto porcentaje de humedad importante para mantener la viabilidad de los lactobacilos contenidos en el alimento probiótico, que estos ejercerán su actividad probiótica en el intestino del consumidor y el valor de extracto etéreo en el alimento fue alto comparado con los autores.

Referencias bibliográficas

[1] Association of Official Analytical Chemist. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs. (AOAC) Official Methods of Analysis. 15th edition. Volume One. Edited by Kenneth Helrich. Arlington, Virginia, 22201, USA, (1990).

[2] Escola, D. y Rivas, J. Trabajo Especial de Grado Análisis de las propiedades nutricionales de un alimento probiótico a base de lentejas (*Lens culinaris*). Universidad Rafael Urdaneta, Maracaibo- Zulia, (2022).

[3] Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. Metodología de la investigación. 4ªed. México. McGraw-Hill, (2006).

[4] International Organization Standard. ISO 9232:2003. Yogurt. Identification of characteristic microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Technical Commite: ISO TC/34/SC5. Milk and milk products, (2003).

[5] International Organization Standard. ISO 15214:1998: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Technical Committee: [ISO/TC 34/SC 9](#) Microbiology, (1998).

[6] Microkit. Información de Medios de cultivo para Microbiología. Microkit: Medios de Cultivo, (2016).

[7] Vidal Vademecum Spain. Liolactil polvo 1,5 g. Vademecum, (2012). https://www.vademecum.es/equivalencia-lista-liolactil+polvo+1,5+g-mexico-a07fa01+m6-1277345-mx_1

[8] MacFaland, J. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3a ed. Argentina. Editorial Médica Panamericana, (2003).

[9] Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN 1126-89: Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico (1ª. Revisión). Comité técnico de normalización CT-10: Productos Alimenticios. Subcomité Técnico SC-3: Microbiología de los Alimentos. Fecha de aprobación por COVENIN 07-06-1989. Caracas, Venezuela, Fondonorma, (1989).

[10] Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN 1337-1990: Método para Recuento de Moho y Levaduras (1a. Revisión). Comité técnico de normalización CT-10: Productos Alimenticios. Subcomité Técnico SC-3: Microbiología de los Alimentos. Fecha de aprobación por COVENIN 01-08-1990. Caracas, Venezuela, Fondonorma, (1990).

[11] Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN 1104-1996: Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli*. Comité técnico de normalización CT-10: Productos Alimenticios, Subcomité Técnico SC-03: Microbiología de los Alimentos. En su reunión No. 141 de fecha 14-08-1996. Caracas, Venezuela. Fondonorma, (1996).

[12] Comisión Venezolana de Normas Industriales. COVENIN 1292-89: Alimentos. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. (Primera Rev.) Comité Técnico de normalización CT-10 Productos Alimenticios, Subcomité Técnico SC-3: Microbiología de los Alimentos. Fecha de aprobación 06-12-1989. Caracas, Venezuela. Fondonorma, (1989).

[13] Morales de León, J., Nosthas, C., Penedo, M., Cortes, E. Elaboración de un yogurt con base en una mezcla de leche y garbanzo (*Cicer arietinum*). Rev, ALAN [online]. Vol.50, N°1, (2000), 81-86. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000100011&lng=es&nrm=iso. ISSN 0004-0622.

[14] Parra, K., Piñero, M., Barboza, Y., Pérez, M., Ortega, J. Efecto combinado de la imbibición y la germinación sobre la calidad del quinchoncho (*Cajanus cajan* (L) Millsp.). Ciencia, Vol.21, N°4, (2014). <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/18749>

[15] Barboza, Y. Diseño de Alimentos Potentemente Funcionales sobre la Base de Productos Tradicionales (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba: Programa Biociencias y Ciencia Agroalimentarias. Venezuela-España, (2012).

Notas Especiales

Artículo de investigación derivado del trabajo especial de grado, titulado: “Análisis de las propiedades nutricionales de un alimento probiótico a base de lentejas”, presentado en la Universidad Rafael Urdaneta, Maracaibo, Venezuela.