

EVALUACIÓN DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES COMO POSIBLES PREBIÓTICOS.

Hernández-Alcántara A. M^a, Díaz-Vela J^a, Totosa A^b, Pérez-Chabela M. L^{a,*}

a Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa. C.P.09340, México, D.F., México.

b Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Laboratorio de Alimentos, Av. Tecnológico esq. Av. Central s/n, Ecatepec de Morelos, C.P. 55210, Estado de México, México.*

lpch@xanum.uam.mx.

RESUMEN

Un prebiótico es un ingrediente selectivamente fermentable que confiere beneficios en la salud del hospedero. El procesamiento de frutas genera grandes cantidades de subproductos agroindustriales, con altos contenidos de fibra y oligosacáridos, que podrían ser usados como prebióticos. Se realizaron fermentaciones durante 11 h con las harinas de los subproductos (bagazo de zanahoria, cáscara de plátano y manzana) como fuente de carbono (1% p/v), utilizando a *P. pentosaceus* UAM 22 y *E. coli* K12. Se calcularon los parámetros cinéticos velocidad media de crecimiento (k) y tiempo de duplicación (g). La actividad prebiótica se calculó considerando la diferencia en el crecimiento de *P. pentosaceus* y *E. coli* bajo las mismas condiciones. Los resultados mostraron que la harina de cáscara de plátano promovió el crecimiento de *P. pentosaceus*, con una $k= 1.54 \text{ h}^{-1}$ reduciendo un 64.08% el tiempo de duplicación ($g= 0.65 \text{ h}$) respecto al obtenido con glucosa (1.81 h). La mayor actividad prebiótica se obtuvo con este subproducto (0.45) seguida por la harina de zanahoria (0.40) y manzana (0.38). El potencial de estos subproductos como posibles prebióticos se demostró al resistir la acidez y condiciones gástricas ensayadas, ser fermentados por la microbiota intestinal y estimular selectivamente el crecimiento de bacterias probióticas.

ABSTRACT

A prebiotic is a selectively fermented ingredient that confers benefits upon host well-being and health. Fruit processing generate high amounts of agro-industrial by-products, materials rich in dietary fibers and oligosaccharides that can be employed as prebiotics. Fermentations were performed with by-products flours (carrot marc, apple and banana peels) as carbon source (1% w/v) employing *P. pentosaceus* UAM 22 and *E. coli* K 12 (as pathogen indicator) during 11 h. Kinetic parameters as mean growth rate constant (k) and mean duplication time (g) were calculated. Prebiotic activity was calculated from the difference in growth of *P. pentosaceus* vs. *E. coli* under the same conditions. Results showed that banana peel flour enhanced growth of *P. pentosaceus* with $k= 1.54 \text{ h}^{-1}$ and a decreased of 64.08% in the mean duplication time ($g= 0.65 \text{ h}$), as compared to glucose (1.81 h). The higher prebiotic activity was obtained with banana (0.45), followed by carrot (0.40) and apple (0.38) flours. It was also demonstrated that by-products flours have the potential to be consider as good prebiotics due to their resistance to acidic and gastric conditions, be fermented by intestinal microbiota and selectively stimulate growth of useful probiotic bacteria

Palabras clave: Subproductos agroindustriales, prebióticos, probióticos.

Área: Alimentos funcionales.

INTRODUCCIÓN

Los prebióticos son ingredientes selectivamente fermentables que permiten cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, la cual confiere beneficios en la salud y bienestar del huésped (Gibson *et al.*, 2004). La actividad prebiótica se ha atribuido a diferentes compuestos alimenticios, en particular oligosacáridos y polisacáridos (incluyendo algunas fibras dietéticas); sin embargo, deben de cumplir ciertos requisitos: resistencia ante los procesos digestivos en la parte superior del tracto gastrointestinal, ser fermentables por la microbiota intestinal, estimular selectivamente el crecimiento de bacterias probióticas, proveer beneficios en la salud del hospedero (Wang, 2009).

En los últimos años se ha incrementado el interés por el aprovechamiento de subproductos agroindustriales como una fuente alterna para el crecimiento de bacterias probióticas como una vía para lograr una mayor competitividad en el precio de los probióticos y mejorar su rendimiento al desarrollar medios de cultivo a un costo menor respecto a los que actualmente se encuentran en el mercado. Su alta disponibilidad permite catalogarlos como productos de alto valor agregado, razón por la cual su aprovechamiento resulta económicamente atractivo y al mismo tiempo tiene un impacto ambiental (Oreopoulou and Tzia, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima: Como subproductos agroindustriales se utilizaron al bagazo de zanahoria, la cáscara de manzana y cáscara de plátano, obtenidos en establecimientos donde se elaboran jugos y licuados. Estos residuos fueron deshidratados, molidos y tamizados para obtener un polvo fino denominado “harina”. La bacteria láctica probiótica utilizada para evaluar la actividad prebiótica de éstos subproductos, fue aislada a partir de productos cárnicos cocidos y reportada previamente como *P. pentosaceus* UAM 22 (Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013). Por otra parte, *E. coli* se usó como bacteria indicadora entérica.

Fermentaciones *in vitro* con subproductos potencialmente prebióticos. Se realizaron fermentaciones con las harinas de los subproductos como fuente de carbono (1%p/v, considerando el contenido de carbohidratos solubles, usando glucosa como control) de acuerdo a la metodología propuesta por Bustamante *et al.*, 2006. Se monitoreo el crecimiento durante 11 h mediante la técnica de cuenta en placa con placas de agar MRS, incubadas en anaerobiosis a $35\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Determinación de parámetros de crecimiento. A partir de las cinéticas de crecimiento, se calcularon los parámetros cinéticos: velocidad media de crecimiento (k) y tiempo de duplicación (g). La actividad prebiótica se determino considerando la diferencia en el crecimiento de *P. pentosaceus* vs. *E. coli* bajo las mismas condiciones, de acuerdo a lo reportado por Huebner *et al.*, 2007.

Resistencia a pH bajos y condiciones gástricas. Se evaluó la resistencia de los ingredientes prebióticos frente a la acidez en medio de cultivo ajustado a los pH: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 con HCl 1 M, siguiendo la metodología descrita por Ehrmann *et al.*, 2002. Se determinó indirectamente esta capacidad a partir del crecimiento registrado para *P. pentosaceus* UAM 22 en placas de agar MRS a los tiempos 1, 2 y 4 h. La sobrevivencia se analizó simulando las condiciones gástricas descritas por Beumer *et al.*, 1992 con ligeras modificaciones, determinando la sobrevivencia como anteriormente se ha descrito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentaciones *in vitro* en medios con subproductos potencialmente prebióticos.

El crecimiento de *E. coli* con las harinas de manzana (HCM) y bagazo de zanahoria (HBZ) fue muy semejante al registrado con glucosa. Las cuentas celulares superaron los 9 log UFC/mL, siendo mayor con glucosa (9.72 log UFC/mL) y con harina de plátano (HCPT) 10.31 log UFC/mL, un ciclo logarítmico más respecto a las otras fuentes estudiadas. Por otro lado, el crecimiento de *P. pentosaceus* fue mayor en los tres subproductos.

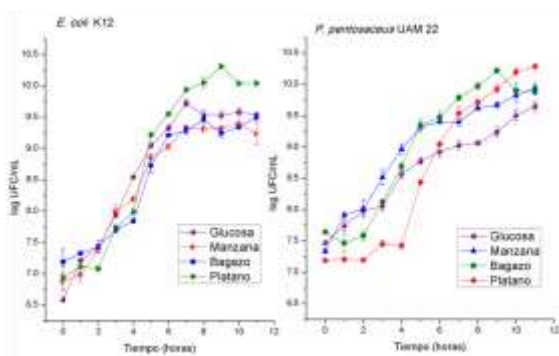


Figura 2. Cuentas celulares de *E. coli* K12 y *P. pentosaceus* UAM 22 en los medios suplementados con harinas de subproductos potencialmente prebióticos al 1% p/v.

Con la HCPT y HBZ se obtuvieron las mayores cuentas celulares, 10.19 y 10.21 log UFC/mL respectivamente, un ciclo logarítmico más al registrado con glucosa (9.02 log UFC/mL). En el caso de la HCM se alcanzó 9.40 log UFC/mL. Estos resultados, coinciden con las observaciones efectuadas por Yeo and Liong, 2010 en leche de soya adicionada con prebióticos, con cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Cada prebiótico: inulina, maltodextrina, manitol, pectina y FOS, modificó significativamente el crecimiento de las bacterias, incrementando las cuentas celulares entre 3.95-4.30% (excediendo los 7 log UFC), respecto al medio control.

Parámetros de crecimiento en los medios suplementados con prebióticos. En el caso de *E. coli* K12, con HCPT se tuvo una $k=1.53 \text{ h}^{-1}$, que produjo una disminución del

12 % en tiempo de duplicación (g) respecto al medio con glucosa. Las otras fuentes, presentaron un comportamiento muy similar a glucosa, con valores de $k=1.30\text{ h}^{-1}$ y 1.20 h^{-1} para los subproductos de HCM y HBZ respectivamente, incrementando los valores de g . En contraparte, *P. pentosaceus* UAM 22 registró valores de k superiores en los tres subproductos prebióticos. De éstos, la HCPT registró la mayor velocidad de crecimiento (1.54 h^{-1}) con una reducción del 64% en g . Por su parte, con HBZ se obtuvo una $k=1.25\text{ h}^{-1}$, que redujo un 55% el valor de g ; y con HCM un 35% (Tabla I).

Tabla I. Parámetros de crecimiento en medios suplementados con subproductos potencialmente prebióticos

Cepa -Fuente de Carbono	k (h^{-1})	g (h)	Actividad Prebiótica
<i>P. pentosaceus</i> UAM 22-Glucosa	$0.55 \pm 0.03^{B, c}$	$1.81 \pm 0.10^{B, c}$	----
<i>P. pentosaceus</i> UAM 22 -Manzana	$0.86 \pm 0.07^{B, b}$	$1.17 \pm 0.09^{B, b}$	0.38 ± 0.034^C
<i>P. pentosaceus</i> UAM 22-Plátano	$1.54 \pm 0.003^{B, a}$	$0.65 \pm 0.001^{B, a}$	0.45 ± 0.025^A
<i>P. pentosaceus</i> UAM 22- Bagazo	$1.25 \pm 0.012^{B, b}$	$0.80 \pm 0.01^{B, b}$	0.40 ± 0.060^B
<i>E. coli</i> K12- Glucosa	$1.36 \pm 0.13^{A, c}$	$0.74 \pm 0.07^{A, c}$	----
<i>E. coli</i> K12- Manzana	$1.30 \pm 0.03^{A, b}$	$0.77 \pm 0.03^{A, b}$	----
<i>E. coli</i> K12- Plátano	$1.53 \pm 0.02^{A, a}$	$0.65 \pm 0.09^{A, a}$	----
<i>E. coli</i> K12- Bagazo	$1.20 \pm 0.11^{A, b}$	$0.83 \pm 0.09^{A, b}$	----

A, B medias seguidas por la misma letra dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($p>0.05$) para la cepa.

a, b, c medias seguidas por la misma letra dentro de la misma columna, no son significativamente diferentes ($p>0.05$) para la fuente de carbono.

Los valores de k determinados para *P. pentosaceus* UAM 22, son superiores a las reportadas por Amaretti *et al.*, 2006, al estudiar la preferencia de *B. adolescentis* MB 239 por diferentes mono-, di- y oligo-sacáridos (rafinosa, fructooligosacáridos (FOS), lactosa, glucosa y fructosa), quienes encontraron valores de k muy semejantes con glucosa (0.17 h^{-1}) y fructosa (0.16 h^{-1}); pero superiores con lactosa>FOS>rafinosa, con valores de 0.30, 0.27 y 0.22 h^{-1} respectivamente indicando una selectividad dependiente de la cepa. De la misma, Sánchez-Zapata *et al.*, 2013, reportaron valores de k para *B. animalis* en un subproducto líquido resultante de la elaboración de la bebida "Horchata de Chufa" al 2 y 3% (0.0833 y 0.0787) en 8 h, seguido por glucosa con 0.023 (12h) y FOS 0.020 en 16 h. La mayor actividad prebiótica se obtuvo con HCPT (0.45 ± 0.025), seguida por HBZ (0.40 ± 0.060) y HCM (0.38 ± 0.034). Estos resultados demuestran una selectividad en los subproductos prebióticos para ser fermentados por la bacteria probiótica, *P. pentosaceus* frente *E. coli*, cumpliendo con uno de los requisitos que debe presentar un ingrediente prebiótico. Los valores son semejantes a los reportados por Díaz-Vela *et al.*, 2013 para esta misma bacteria con subproductos de tuna y piña, 0.33 y 0.32 .

Resistencia ante condiciones acidas y gástricas. Se registró crecimiento a partir de un pH de 1.0 en los tiempos analizados, exceptuando a la HCPT. El crecimiento se incremento al aumentar el pH tanto en los subproductos como con glucosa, siendo abundante a partir de un rango de pH de 3-5 dentro del cual la mayoría de las bacterias lácticas se desarrolla por la característica de ser ácido tolerantes.

Tabla II. Resistencia a la acidez de los subproductos potencialmente prebióticos para permitir el crecimiento de la bacteria probiótica *P. pentosaceus* UAM 22

pH	Glucosa			Cáscara de Manzana			Cáscara de Plátano			Bagazo de zanahoria		
	t=1h	t=2h	t=4h	t=1h	t=2h	t=4h	t=1h	t=2h	t=4h	t=1h	t=2h	t=4h
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0	+	++	+	+	++	+	-	-	-	++	++	+
2.0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- ausencia de crecimiento, + crecimiento pobre, ++, crecimiento moderado, +++, crecimiento abundante

En la Figura 2, se puede apreciar que las harinas de los subproductos soportaron el medio gástrico simulado, evidenciando la resistencia que presentan frente a las sales biliares, un medio ácido y en general las condiciones que tendrían que tolerar durante su paso a través del tracto gastrointestinal superior. Con los tres subproductos, se presentó una sobrevivencia para *P. pentosaceus* UAM 22 superior al 70%, garantizando que más de la mitad de la población resistió estas condiciones. El comportamiento en todos los casos fue muy semejante al medio con glucosa, dado que no se observó una disminución en las cuentas celulares mayor a un ciclo logarítmico; sin embargo con HCPt se registro una disminución considerablemente en la población bacteriana a partir de los 30 min.

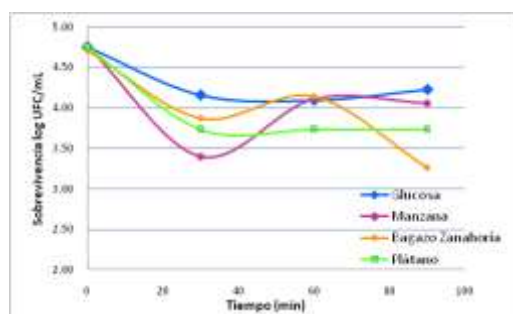


Figura 3. Sobrevivencia de *P. pentosaceus* bajo condiciones gástricas simuladas (pH=2.0) con subproductos de manzana, plátano, bagazo de zanahoria y glucosa.

CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos demuestran que los subproductos de cáscara de plátano, cáscara de manzana y bagazo de zanahoria, tienen el potencial para ser empleados como ingredientes fermentables para el crecimiento de bacteria probióticas. Asimismo, se evidencio la tolerancia ante acidez, condiciones gástricas, capacidad para ser fermentado selectivamente por bacterias benéficas, criterios que debe reunir un prebiótico.

BIBLIOGRAFÍA

- Amaretti A, Tamburini E, Bernardi T, Pompei A, Zanoni S, Vaccari G, Matteuzzi D, Rossi M. 2006. Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: compared growth on single and mixed carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73:654-662.
- Beumer RR, de Vries J, Rombouts FM. 1992. *Campylobacter jejuni* non-culturable cocoid cells. *International Journal of Food Microbiology* 15:153-163.
- Bustamante P, Mayorga L, Ramírez H, Martínez P, Barranco E, Azaola A. 2006. Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37: 5-9.
- Díaz-Vela J, Totosa A, Cruz-Guerrero AE, Pérez-Chabela ML. 2013. In vitro evaluation of the fermentation of added-value agroindustrial by-products: cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L) peel and pineapple (*Ananas comosus*) peel as functional ingredients. *International Journal of Food Science and Technology* 48:1460-1467.
- Ehrmann MA, Kurzak P, Bauer J, Vogel RF. 2002. Characterization of *Lactobacilli* towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology* 92:966-975.
- Gibson GR, Probert HM, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: up-dating the concept of prebiotics. *Nutritional Research Reviews* 17:259-275.
- Huebner J, Wehling R, Hutkins R. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal* 17: 770-775.
- Oreopoulou V, Tzia C. 2007. Utilization of plant by-products for the recovery of protein, dietary fiber, antioxidants, and colorants. In: *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, Oreopoulou V and Russ W (eds). ISEKI-Food Springer: Heidelberg, pp. 209-232.
- Ramirez-Chavarin ML, Wachter C, Eslava-Campos CA, Pérez-Chabela ML. 2013. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *International Food Research Journal* 20:991-1000.
- Sánchez-Zapata E, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA, Soares J, Sousa S, Gomes AMP, Pintado MME. 2013. In vitro evaluation of "horchata" co-products as carbon source for probiotic bacteria growth. *Food and Bioprocess Technology* 91:279-286.
- Yeo SK, Liong MT. 2010. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:267-275.
- Wang Y. 2009. Prebiotics: present and future in food science and technology. *Food Research International* 42: 8-12.