

## DESARROLLO DE UNA BEBIDA NUTRACÉUTICA FERMENTADA DE EXTRACTO DE SEMILLA DE *Prosopis glandulosa* DE COAHUILA, MÉXICO

A. Pimentel-Zapata, Valenzuela-Balderas, A., P.A. Sandoval-Palacios, D. Ontiveros-Floriano, E. Gutiérrez-Reyes, Linaje-Treviño, M.S., Valencia-Castro, C.M., N.M. De la Fuente-Salcido

Bioprospección y Bioprocesos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Campus-Torreón. Blvd. Torreón-Matamoros Km 7.5, CP 27104 Torreón, Coahuila, México.

\*normapbr322@hotmail.com

### RESUMEN:

El mercado mundial de bebidas funcionales y/o nutracéutica es un sector alimentario en crecimiento pues los consumidores conscientes de la salud exigen alimentos que mejoren el bienestar y reduzcan el riesgo de enfermedades. Las bacterias probióticas y los extractos herbáceos proporcionan metabolitos funcionales, que han fomentado la detección de nichos ecológicos, como el tepache (bebida fermentada mexicana) y bioactivos como el extracto de Mesquite (leguminosa semi-desértica) que pueden incorporarse en bebidas.

Se formuló una bebida nutracéutica con *Lactobacillus acidophilus* aislado de Tepache e identificado por PCR, extracto acuoso de semilla de *Prosopis glandulosa* Coahuilense, miel de agave (15%) y se fermentó 60 horas en microaerobiosis a 200 rpm. Se determinaron el crecimiento bacteriano (densidad óptica (600) nm), pH, glucosa, °Brix, capacidad antioxidante y aceptación sensorial (prueba hedónica). La bebida mostró amargor y se adicionó saborizante (menta, nuez o de coco) (3%), obteniendo un producto final con  $8.5 \times 10^7$  cel/mL pH 5,5, 1,035 gL<sup>-1</sup> de glucosa, 6,8 °Bx, capacidad antioxidante de 13,84%. Sin embargo la aceptación sensorial de los consumidores fue baja y se diseñaran nuevas formulaciones para proveer una alternativa nutracéutica, con efectos beneficios para la salud humana, proporcionados por probióticos y los antioxidantes de la semilla de mezquite.

### ABSTRACT:

The global functional and/or nutraceutical beverage market is a growing sector of the food industry as modern health-conscious consumers show an increasing desire for foods that can improve well-being and reduce the risk of disease. Probiotic microorganisms and herbal extracts can provide functional metabolites, which encouraged the screening of ecological niches, such as Tepache (mexican fermented beverage) and Mesquite extract (semidesertic Leguminose) which may eventually be incorporated into functional/nutraceutical beverages.

Here we formulated a nutraceutical beverage with *Lactobacillus acidophilus* isolated and identified by PCR from Tepache, mesquite seed extract, agave syrup (15%) and was fermented under microaerobic conditions for 60 h at 200 rpm. Microbial growth (Optical density 600 nm), pH, glucose, °Brix, antioxidant capacity and sensory attributes (hedonic test) were determined. The drink turned bitter, and masked with flavoring (mint, nut or coconut) (3%). The drink turned bitter, and masked with flavoring (mint, nut or coconut) (3%), obtaining a final product with  $8.5 \times 10^7$  cel/mL, pH 5.5, 1.035 gL<sup>-1</sup> glucose, 6.8 °Bx antioxidant capacity and 13.84%. However sensory consumer acceptance was poor and soon will get new formulations as a nutraceutical alternative with beneficial effects for human health, provided by the probiotic and antioxidant mesquite seed.

**Palabras clave:** Nutracéutico, Probiótico, *Prosopis*.

**Keywords:** Nutraceutical, Probiotic, *Prosopis*.

**Área:** Nutrición y Nutracéuticos

## INTRODUCCIÓN

Actualmente una sociedad desarrollada se vuelve más consciente de la salud y como mantenerla, en respuesta a la creciente epidemia mundial y nacional de obesidad y otras enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) relacionadas con el metabolismo, como padecimientos cardiovasculares y la diabetes tipo dos (Zambrowicz y col., 2015). El mercado mundial de alimentos funcionales aumentó 1,5 veces entre 2003 y 2010, y se predice que el mercado alcanzará € 65 millones en el año 2016 (Companiesandmarkets, 2013; Marsh et al, 2014).

En muchas regiones del mundo, las bebidas fermentadas son reconocidas por promover la buena salud y sin embargo, comercialmente tienen poco impacto. Bebidas fermentadas tradicionales como la Tuba y Tepache Mexicano han sido objeto de investigación para ser aprovechadas como fuente de probióticos o sus metabolitos (De la Fuente–Salcido, et al 2015; Pérez et al., 2014) como un intento de incursionar en el desarrollo de un producto innovador, una bebida fermentada no láctea, con características funcionales/nutracéuticas proporcionadas por la acción del cultivo probiótico (*L. acidophilus*), pero además, por la adición de extracto acuoso de mezquite (*Prosopis glandulosa*), una leguminosa ampliamente distribuida en zona semi-desértica de la Comarca Lagunera de Coahuila.

Esta planta es reconocida en reportes científicos por su alto contenido de proteínas, carbohidratos, propiedades antioxidantes, anti-hipertensivas, anti-hiperlipidémicas e hipoglucemiantes (Sharma y Singla, 2013). Además, este tipo de bebida tendría la ventaja de carecer de los alérgenos lácteos que no consumen ciertos segmentos de la población (Yoon et al., 2004).

El objetivo de este trabajo se centró en formular y producir por fermentación una bebida nutracéutica con *L. acidophilus* aislado de Tepache, el extracto acuoso de semilla de *P. glandulosa* Coahuilense, miel de agave, así como determinar las propiedades antioxidantes y el agrado de los consumidores a través de pruebas sensoriales hedónicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de bacteria

La cepa *L. acidophilus* se aisló de tepache, una bebida fermentada mexicana autóctona de Irapuato, Guanajuato. Se diluyó la bebida 1:10 en solución salina (0.85% NaCl) (w/v), y posteriormente en diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) para plaquear 0.1 mL agar MRS (BL Bioxon) por 48 h en condiciones aerobias y anaerobias (BD GasPak EZ Anaerobe Container System) para aislar las bacterias. Se determinó el género y especie de la cepa por identificación microbiológica por características morfológicas de las colonias desarrolladas en MRS, por tinción Gram y con el sistema API 50 CH (API systems, BioMérieux) por fermentación de carbohidratos.

Molecularmente se utilizó amplificación de la región 16S rDNA utilizando oligonucleótidos universales UBF5- AGAGTTTGATCCTGGCTGAG- 3'(directo) y 1492 R5- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3 reverso (León-Galván et al. 2009).

En la amplificación se utilizó DNA polimerasa de alta fidelidad (BioRad) en condiciones: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C, y 1:40 min a 68°C; y nantenimiento final de 5 min at 72°C.

### **Recolección de vegetal y obtención de extracto**

Se recolectaron ramas del árbol de mezquite en el mes de agosto porque en estas fechas en la región de Coahuila ocurre la floración y maduración de vaina. Posteriormente se realizó separación de impurezas y de vaina de forma manual y se deshidrataron en a temperatura de 70°C por una semana en horno de secado (Labline). La molienda de la vaina completa (vainas y semillas) fue complicada por la dureza de la semilla y se realizó con un molino mortero (pulverisette 2) para una molienda universal y se recabo la harina fina. Se obtuvo el extractos (500 mg/mL) por decocción a (95°C/3 min) de la harina de vaina de mezquite (*P. laevigata*) y se filtró con papel Whatman, se sometió a centrifugación y fue esterilizado con filtros de 0.45 µm (Milipore).

### **Fermentación**

Para el proceso de fermentación se usó el extracto de mezquite (500mg/mL) el cual se adicionó con 20% de cultivo láctico (*L. acidophilus*) y 15% de miel de agave. La fermentación se realizó durante 60 h a 35-42°C en agitación 200 rpm por triplicado.

Se registró durante el curso temporal de la fermentación la densidad óptica del cultivo a 600 nm en espectrofotómetro benchtop de un solo haz (CECIL), pH, acidez titulable, la cantidad de glucosa y la capacidad antioxidante con DPPH.

### **Evaluación sensorial del producto de fermentación (Prueba hedónica)**

La bebida fué sometida a evaluación sensorial, con al menos 15 jueces no entrenados se realizó con bebidas saborizadas. Los parámetros a evaluar fueron color, fluidez, sabor, aroma, aceptabilidad del producto. La escala hedónica utilizada contenía los siguientes 9 parámetros: 1, Disgusta extremadamente; 2, aversión muy mucho; 3, no les gusta moderadamente; 4, no les gusta un poco; 5, ni gusta ni desagrada; 6, gusta poco; 7, gusta moderadamente; 8, gusta mucho y 9, gusta extremadamente.

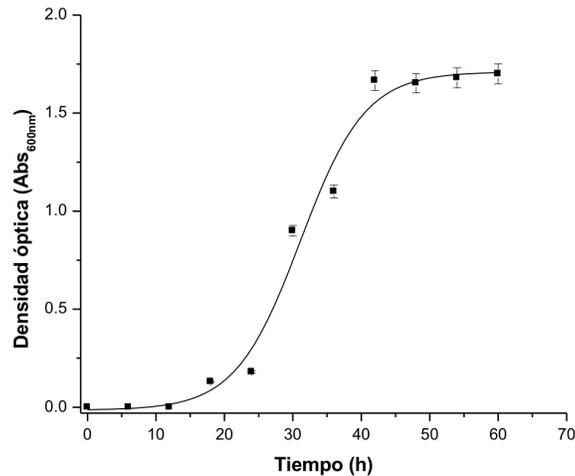
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Identificación de la cepa**

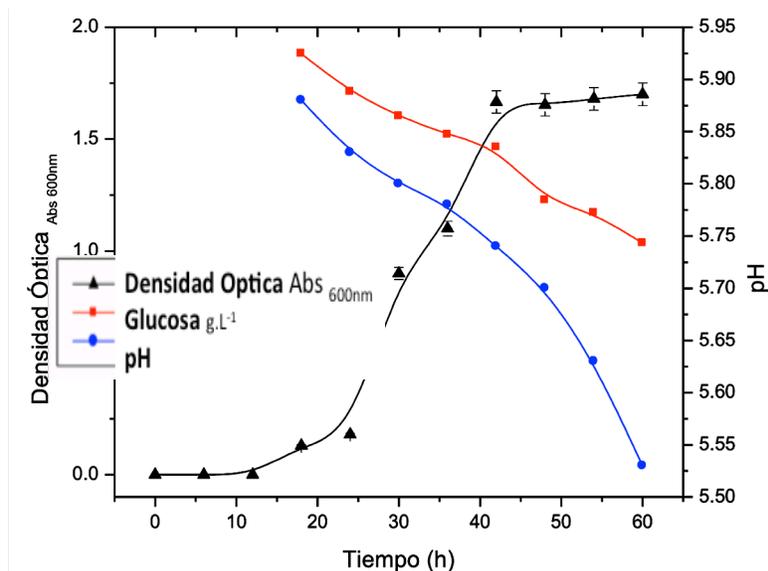
Los bacilos Grampositivos aislados de colonias pequeñas de morfología redonda, opaca, lisa e irregular. Además de los carbohidratos comunes (glucosa, lactosa, maltosa, sacarosa) se detectó en sistema API 50 CH el perfil total de fermentation que reveló capacidad bioquímica para degradar inulina y rafinosa. La identificación molecular de la secuencia obtenida del aplicón después de enviarse a asecuenciar Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio) del CINVESTAV Unidad Irapuato, se analizó en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y proporcionó un 99% de identidad con *L. acidophilus*.

### Fermentación

La curva de crecimiento de la bacteria utilizada en la fermentación de la bebida (42°C/60h) se observa en la figura 1, y el seguimiento de la fermentación y el comportamiento del pH determinado en la Figura 2.



**Figura 1** Curva de crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* durante la fermentación



**Figura 2.** Curso temporal de la fermentación de *Lactobacillus acidophilus* con extracto de vaina de semilla de mezquite y miel de agave para obtener como producto la bebida nutracéutica.

Se logró determinar durante la fermentación los parámetros descritos en la tabla I, observando un natural aunque lento descenso de pH que puede deberse al ácido

láctico producido por la bacteria. En la determinación de glucosa se observa una mínima degradación, y podríamos comentar que sería importante considerar modificar la fuente de carbohidratos (miel de agave) o bien su porcentaje.

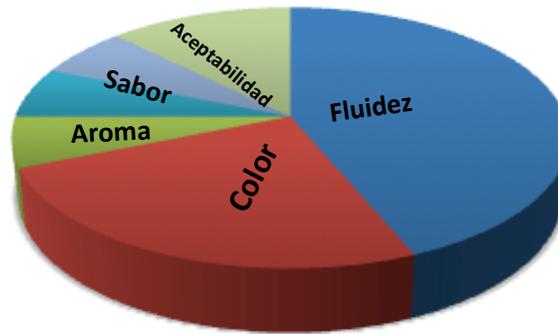
**Tabla I.** Valores obtenidos terminada la fermentación de la bebida

Tiempo (Horas)	DO (Abs 600nm)	pH	Glucosa (g.L <sup>-1</sup> )	°Brix	Capacidad Antioxidante (% I)
0	0.0145	6.25	1.924	12.4	10.62
6	0.033	6.15	1.903	11.1	13.44
12	0.048	6.05	1.895	10.3	16.73
18	0.13	5.88	1.881	10	17.98
24	0.18	5.83	1.712	9.8	42.91
30	0.9	5.8	1.602	9.2	11.88
36	1.1	5.78	1.52	9	7.75
42	1.666	5.74	1.463	8.9	12.33
48	1.653	5.7	1.227	8.4	25.50
54	1.68	5.63	1.171	7.8	16.14
60	1.7	5.53	1.035	6.8	13.84

Con respecto a la acción anti-radical hacia el DPPH de la bebida fermentada fue solamente un poco más baja que la de otras bebidas antioxidantes, como las bebidas calientes, y definitivamente mostró una amplia capacidad antioxidante, ligeramente inferior a la del té con limón, té verde, té negro, café soluble (Altamirano, 2013).

#### **Evaluación sensorial de la bebida**

En este trabajo la bebida obtenida presentó una apariencia oscura y un sabor percibido como amargo, y se decidió saborizarla como se mencionó en la metodología, y se realizó la prueba sensorial hedónica para sabores de nuez, menta y coco, obteniendo con esta formulación una baja aceptabilidad sensorial en los tres sabores. Dentro de las tres bebidas la sabor nuez mostró mayor aceptación por los jueces no entrenados que degustaron las muestras (Figura 3). Con respecto a lo anterior se están formulando otras bebidas modificando las concentraciones de extracto y fuente de azúcares con el fin de aumentar la aceptación de los consumidores.



**Figura 3.** Resultado de la evaluación sensorial de la bebida con *L.acidophilus* y extracto de semilla de *P. glandulosa* sabor nuez

### CONCLUSIONES

El mercado de las bebidas nutracéuticas se encuentra en franco desarrollo y es importante diseñar novedosos productos con ingredientes como bacterias probióticas y metabolitos antioxidantes autóctonos de nuestro país, como en la bebida fermentada de mezquite. Sin embargo el proceso requiere muchas más combinaciones entre ingredientes para obtener bebidas aceptadas sensorialmente.

### BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano-Jácome, S.E. 2013. Desarrollo de una bebida funcional elaborada a base de extracto de muicle (*Justicia spicigera*) Fac. de Química, Universidad Veracruzana.
- Companiesandmarkets, 2013. Functional drinks: Global industry guide. Companiesandmarkets
- De la Fuente-Salcido, N.M., Castañeda-Ramírez, C., García-Almendárez, B., Bideshi, D., Salcedo-Hernández, R., Barboza-Corona, J.E. 2015. Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Science & Nutrition*, 3(5), 434–442.
- Marsh, A.J., C. Hill, P. Ross, P.D. Cotter. 2014. Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends Food Sci. Tech.* 38:113–124.
- Sharma D, Singla YP. 2013. Evaluation of antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of *Prosopis cineraria* (Linn.) in wistar rats. *Journal of Scientific and Innovative Research*. 2 (4), 751-758.
- Yoon, K.Y., Woodams, E.E., Hang, Y.D., 2004. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. *J. Microbiol.* 42, 315–318.
- Zambrowicz, A., Eckert, E., Pokora, M., Bobak, L., Drabrowska, A., Szoltysik, M., Trziczka, T., Chrzanowska, J. 2015. Antioxidant and antidiabetic activities of peptides isolated from a hydrolysate of an egg-yolk protein by-product prepared with a proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *An international journal to further the chemical sciences*. 14:10460-10467.