

## EFEECTO DE LA FIBRA SOLUBLE DE ALCAUCIL EN EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS INTESTINALES ASOCIADAS CON LA BUENA SALUD

Fissore E.N. (1), Santo Domingo C. (1), Gerschenson L.N. (1), Gianuzzi L. (2)

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

(2) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). CONICET- Universidad de la Plata (UNLP).

eliana@di.fcen.uba.ar

### RESUMEN

Se estudió el efecto de diferentes fracciones enriquecidas en fibra soluble obtenidas a partir de alcaucil usando ácido cítrico o ácido cítrico/hemicelulasa, sobre el crecimiento selectivo de *Lactobacillus plantarum* 8114 y de *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863. El modelado según Gompertz del crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 mostró una mayor tasa de crecimiento específico ( $\mu$ : 0,16 h<sup>-1</sup>) en presencia de la fracción aislada de tallo utilizando hemicelulasa (fracción A) que en presencia de glucosa ( $\mu$ : 0,09 h<sup>-1</sup>). En el caso de *Bifidobacterium bifidum* 11863, el mayor  $\mu$  se obtuvo para el microorganismo que creció en presencia de la fracción aislada de tallo utilizando buffer citrato, siendo su tasa de crecimiento el doble que la observada para glucosa ( $\mu$ : 0,04 h<sup>-1</sup>). A su vez, se obtuvieron scores positivos de actividad prebiótica con respecto a *Escherichia coli* 25922, esto indicó que las fibras ensayadas son metabolizadas tan bien como la glucosa por *Lactobacillus plantarum* 8114 y por *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863, y que son metabolizadas selectivamente por dichos microorganismos. La capacidad potencial de la fracción A de estimular selectivamente el crecimiento de las bacterias intestinales asociadas con la buena salud, se puede atribuir a su alto contenido de inulina y de pectina de bajo grado de metilación.

**Palabras claves:** prebiótico, fibra dietaria, residuos de alcaucil.

### ABSTRACT

The effect of different fractions enriched in soluble fiber obtained from artichoke using citric acid or citric acid / hemicellulase on the selective growth of *Lactobacillus plantarum* 8114 and *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 was evaluated. Gompertz modeling of *Lactobacillus plantarum* 8114 growth showed a higher specific growth rate ( $\mu$ : 0.16 h<sup>-1</sup>) in the presence of fraction isolated from stem using hemicellulase (fraction A) than in the presence of glucose ( $\mu$ : 0.09 h<sup>-1</sup>). In the case of *Bifidobacterium bifidum* 11863, the highest  $\mu$  was obtained for the microorganism grown in the presence of fraction A and for the fraction isolated from stem without hemicellulase, their rate being twice that observed for glucose (0.04h<sup>-1</sup>). The positive prebiotic activity scores observed with respect to *Escherichia coli* 25922 indicated that fibers assayed are metabolized as well as glucose by *Lactobacillus plantarum* 8114 and *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 and that they are selectively metabolized by these microorganisms. The potential capacity to selectively stimulate the growth of intestinal bacteria associated with health shown by fraction A can be ascribed to its high inulin and low methylation degree pectin contents.

**Keywords:** prebiotic, dietary fiber, residues of artichoke.

### INTRODUCCIÓN

La microflora intestinal humana se ve afectada por muchos factores tales como la edad, el consumo de medicamentos, la dieta, la fisiología del huésped, el peristaltismo, la inmunidad local y el metabolismo bacteriano "in situ" (Berg 1996). Sin embargo, la dieta es probablemente el factor más importante para determinar el tipo de flora intestinal que se desarrolla, debido a que los productos alimenticios proveen las principales fuentes de nutrientes para las bacterias del colon. Esto ha dado origen al concepto de prebióticos.



La primera definición de prebiótico fue “ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, y que por consiguiente mejora la salud del huésped” (Gibson y Roberfroid 1995). En particular, muchos oligosacáridos y polisacáridos de los alimentos han sido reivindicados por tener actividad prebiótica, pero no todos los carbohidratos de la dieta son prebióticos (Gibson et al. 2004). De acuerdo a Roberfroid (2007), la clasificación de un ingrediente alimentario como prebiótico requiere una demostración científica de que el ingrediente:

- (1) resiste la acidez gástrica, la hidrólisis de las enzimas de mamíferos y la absorción gastrointestinal,
- (2) es fermentado por la microflora intestinal,
- (3) estimula selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar.

En general, los cambios de la flora en respuesta a la dieta han sido estudiados usando cepas de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* y comparando su crecimiento con el de otras bacterias tales como *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.* y *Escherichia coli* (Leach et al. 2006). Actualmente, para la definición de un ingrediente alimentario como prebiótico se propone evaluar el cumplimiento de los tres requisitos mencionados anteriormente, siendo la estimulación selectiva del crecimiento la primera etapa a evaluar (Gibson et al. 2004).

Varios estudios han demostrado que la capacidad de los lactobacilos y las bifidobacterias para fermentar carbohidratos prebióticos es específica del sustrato y de la cepa (Kaplan y Hutkins 2000, Schrezenmeir y Vrese 2001). Además, no está claro qué carbohidratos prebióticos son los sustratos más adecuados para el crecimiento selectivo de cepas específicas.

En este trabajo, se utilizaron fracciones de fibra dietaria soluble aisladas mediante digestión con buffer citrato de sodio o con hemicelulasa /buffer citrato de sodio, a partir de corazón, brácteas y tallo de alcaucil (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). El objetivo fue cuantificar el grado en que distintas fracciones de fibra estimulan selectivamente el crecimiento de las cepas de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 con el propósito de evaluar la potencialidad de las diferentes fibras para que actúen como sustratos prebióticos. Además, se estudiaron los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del material de pared celular (CWM)

Se utilizaron alcauciles (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*) adquiridos en un mercado local. Se separaron el tallo, las brácteas y el corazón y luego de lavarlos, se secaron en estufa con convección a 85°C durante 2,5 horas (velocidad del aire: 0,5 m/s). El residuo seco de cada tejido se molió en un molinillo doméstico (Wemir E 909, Argentina) y constituyó la fracción enriquecida en material de pared celular (CWM) de tallos, brácteas y corazón.

Cada CWM fue tratado de la siguiente manera:

Se colocaron 10g de CWM de cada tejido en un vaso de precipitados con 1000 ml de una solución de buffer citrato de sodio 0,05 mol/L (pH 5,2) con 0,01g cada 100g de azida sódica (concentración final). Cada sistema se calentó durante 5 minutos a 70°C, con agitación constante, se enfrió a 30°C y luego se mantuvo bajo agitación constante durante 20 h con o sin el agregado de 0,25g de hemicelulasa. El residuo insoluble se separó por filtración y al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de etanol 96% (v/v) para precipitar los polisacáridos de la pared celular. El precipitado fue filtrado bajo vacío, lavado y finalmente se liofilizó. Las fracciones obtenidas se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Diferentes fracciones obtenidas a partir de los tratamientos de material de pared celular de alcaucil (CWM)

Fracción	CWM	Tratamiento con hemicelulasa
A	Tallo	+



B	Tallo	-
C	Brácteas	+
D	Brácteas	-
E	Corazón	+
F	Corazón	-



**Cepas bacterianas**

Para este trabajo se usaron *Lactobacillus plantarum* 8114 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.), *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863 (MEDICA-TEC, Buenos Aires, Argentina) y *Escherichia coli* 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU.). Todas las cepas se mantuvieron a -80°C.

En el caso de *Lactobacillus plantarum* se utilizó caldo MRS (Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) conteniendo 15% (p/v) de glicerol mientras que para *E. coli* se utilizó un caldo triptico de soja (TSB; Difco Laboratories) conteniendo 15% (p/v) de glicerol y para *Bifidobacterium bifidum* se utilizó un caldo MRS (Difco Laboratories Sparks, MD, USA) suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl (disminuye el potencial de óxido-reducción).

**Score de la actividad prebiótica**

Huebner et al (2007) establecieron una puntuación cuantitativa para describir el grado en que los prebióticos permiten el crecimiento selectivo de los lactobacilos y las bifidobacterias. Esta puntuación es calculada como:

$$\text{Score de Actividad Prebiótica} = \left( \frac{\log \text{ UFC probiótico/ml del prebiótico a 48 h} - \log \text{ UFC probiótico/ml del prebiótico a 0 h}}{\log \text{ UFC probiótico/ml de glucosa a 48 h} - \log \text{ UFC probiótico/ml de glucosa a 0 h}} \right) - \left( \frac{\log \text{ UFC entérico/ml del prebiótico a 48 h} - \log \text{ UFC entérico/ml del prebiótico a 0 h}}{\log \text{ UFC entérico/ml de glucosa a 48 h} - \log \text{ UFC entérico/ml de glucosa a 0 h}} \right) \quad (1)$$

UFC = unidades formadoras de colonias.

Los hidratos de carbono tienen un score de actividad prebiótica positivo si las cepas probióticas los metabolizan tan bien como a la glucosa y si son metabolizados selectivamente por los microorganismos probióticos pero no por otras bacterias intestinales.

**Ensayo de score de la actividad prebiótica**

El procedimiento utilizado se describe en la **figura 1**.

Para el estudio de la actividad prebiótica, se sembraron las cepas en agar MRS para *L. plantarum* 8114, en agar suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl para *B. bifidum* 11863 y sobre agar triptico de soja para *E. coli* ATCC 25922. Luego, *E. coli* fue incubado a 37°C por 24-48 h en condiciones aeróbicas, *L. plantarum* y *B. bifidum* fueron incubados a 37°C por 24-48 h en cámara de anaerobiosis (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) bajo atmósfera de anaerobiosis (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemania). Luego, una colonia de cada placa fue transferida dentro de 10ml de un caldo de MRS para *L. plantarum* o dentro de un caldo MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl para *B. bifidum* y luego incubados toda la noche bajo anaerobiosis. Para *E. coli*, una colonia fue transferida a 10ml de un caldo triptico de soja e incubado en condiciones de aerobiosis por 48 h.

El ensayo se realizó mediante la adición de un cultivo de una noche de *L. plantarum* 1% (v/v) en tubos que contenían caldo MRS con 1% (p/v) de glucosa o de 1% (p/v) de las distintas fibras. El cultivo de *B. bifidum* (1%, v/v), se añadió en tubos que contenían caldo MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl y 1% (p/v) de glucosa o 1% (p/v) de las muestras de fibras. En ambos casos, los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48h bajo sistema de generación de atmósfera anaeróbica (Anaerocult A, Merck, Darmstadt, Alemania) en una cámara anaeróbica (Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Luego de 0 y 48 h de incubación, las muestras se realizaron por triplicado utilizando el método de dilución en serie en agar MRS (*L. plantarum*) o agar MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína HCl (*B. bifidum*) con incubación a 37°C en condiciones anaeróbicas y los resultados fueron calculado como UFC / ml de cultivo.

El cultivo de *E. coli* ATCC 25922 (1%, v/v) se añadió a tubos con caldo Medio Mínimo M9 (Atlas, 1993) conteniendo 1% (p/v) de glucosa o 1% (p/v) de las muestras de fibra y se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones aerobicas como lo describieron Huebner et al. (2007 y 2008) y Marotti et al. (2012). Luego, a las



0 y 48 h de incubación, las muestras inoculadas fueron enumeradas por duplicado en placas de TSA e incubadas a 37°C en condiciones aeróbicas. Los resultados se expresaron como UFC / ml de cultivo. Cada ensayo se repitió un mínimo de tres veces.

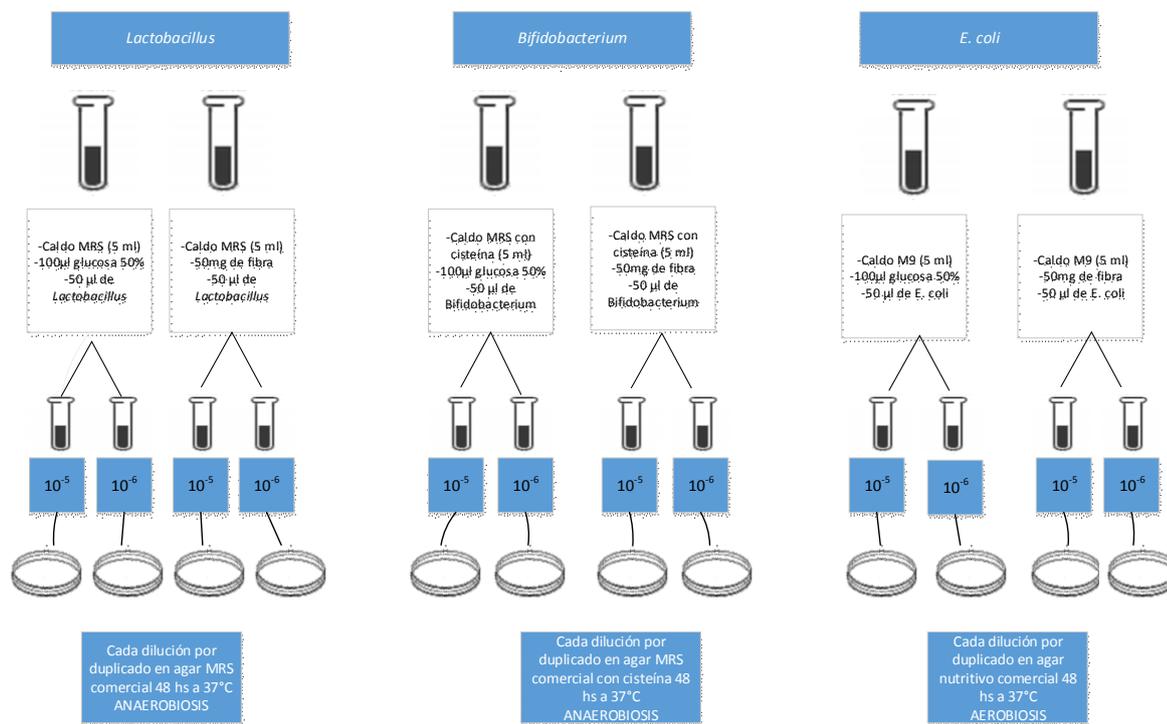


Figura 1 Gráfico de flujo del método usado para el ensayo del score de la actividad prebiótica.

### Modelado del crecimiento microbiano

Los recuentos de células se evaluaron por triplicado luego de 12, 24, 36, 48 y 60 h de la fermentación a 37°C. Las muestras (1,0 ml) fueron agregadas a 9,0 ml de agua peptonada estéril (0,1g / 100g); a continuación, se realizaron diluciones adecuadas. Posteriormente, *L. plantarum* 8114 se sembró en agar MRS y se incubaron en condiciones anaerobias a 37°C. *B. bifidum* 11863 se plaqueó en agar MRS suplementado con 0,05% L-cisteína HCl a 37°C en condiciones anaeróbicas. La incubación se realizó durante 60 h.

Los recuentos de *L. plantarum* y *B. bifidum* se modelaron matemáticamente para entender el comportamiento de los cultivos en presencia de las diferentes fracciones de interés.

Se utilizó el modelo de Gompertz que es uno de los modelos matemáticos más recomendados (Zwietering et al. 1990; Giannuzzi et al. 1998) y se expresa a través de la siguiente ecuación:

$$\log N = a + c \exp(-\exp(-b)(t-m)) \quad (2)$$

donde log N es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos (log (UFC / ml)) al tiempo  $t$ ;  $a$  es el log de la asíntota del recuento al tiempo que disminuye de forma indefinida, que es aproximadamente el equivalente del nivel inicial de bacterias (log (UFC / ml));  $c$  es el log del incremento del recuento o el número de ciclos log del crecimiento al tiempo de crecimiento indefinido (log (UFC / ml));  $b$  es la tasa de crecimiento máximo relativo al tiempo  $m$  (1/día);  $m$  es el tiempo requerido para alcanzar la tasa máxima de crecimiento (días). Utilizando estos parámetros, la tasa de crecimiento específico  $\mu = bc/e$  con  $e = 2,7183$  (log (UFC / mL por día)), duración de la fase lag (LPD =  $m - (1/b)$ ) (días) y la máxima densidad de población, MPD =  $a+c$  (log (UFC / ml) pueden ser evaluados.

### Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos se presentaron como promedio  $\pm$  desvío estándar de tres determinaciones



independientes. Para comparar los valores promedios ( $\alpha$ : 0,05), se realizó el análisis de la variancia de una vía (ANOVA) seguido por un ensayo de rangos múltiples nuevos de Duncan. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con SYSTAT INC, versión 12.0 (Systat Software INC., San Jose, CA, EE.UU.).

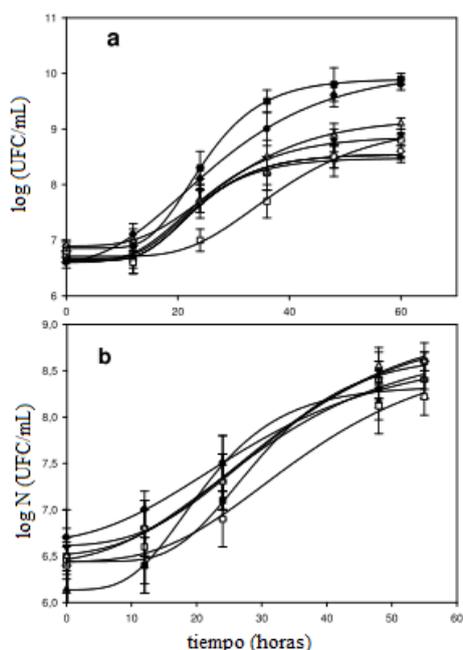
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a lo publicado por Fissore et al (2014), las fracciones utilizadas en esta investigación están enriquecidas en fibra dietaria soluble conteniendo 72,0-96,8g de carbohidratos cada 100g de fracción, compuestos por pectina de bajo grado de metilación (ácidos urónicos: 14,0-18,2g cada 100g), azúcares neutros (0,8-44,3%) e inulina (38,0-55,0%). Los mayores contenidos de inulina fueron observados para todas las fracciones en ausencia de enzima (fracciones B, D y F). Los menores grados de metilación de pectina se observaron en las fracciones obtenidas a partir de tallo en presencia de hemicelulasa (fracción A). Las fracciones aisladas de brácteas (fracciones C y D) fueron las que tenían menor contenido de proteínas y polifenoles.

### Comportamiento cinético del crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en las diferentes fibras

Al estudiar los requerimientos de sustrato y especificidades individuales de las cepas de bifidobacterias y lactobacilos, dos factores son especialmente importantes. El primero es la velocidad a la que un organismo puede crecer sobre una fuente de carbono en particular, ya que esto influirá en su capacidad de competir con otras bacterias en el colon (Hopkins et al. 1998). El otro es el grado en el cual el sustrato se convierte en masa bacteriana, porque el número de células afectará el grado de actividad pre o probiótico. Por esta razón, es importante el estudio del comportamiento cinético de la bacterias probióticas *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en los diferentes sustratos.

En la **figura 2** se muestra el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 (panel a) y *Bifidobacterium bifidum* 11863 (panel b) en las diferentes fracciones de fibra dietaria, incubadas a 37°C durante un período máximo de 60 h. Las líneas continuas representan el modelado matemático de los datos con la ecuación de Gompertz. Como se puede observar, se obtuvo un buen ajuste entre el modelo y los datos experimentales; los parámetros obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.



**Figura 2.** Aplicación del modelo de Gompertz para los datos experimentales en el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 (a) y *Bifidobacterium bifidum* 11863 (b) en diferentes tipos de fibras:



- caldo MRS con glucosa (1%, p/v), ■ caldo MRS con fibra A (1%, p/v), ▲ caldo MRS con fibra B (1%, p/v), ▼ caldo MRS con fibra C (1%, p/v), ○ caldo MRS con fibra D (1%, p/v), □ caldo MRS con fibra E (1%, p/v) y Δ caldo MRS con fibra F (1%, p/v).

En el caso de las cepas *Lactobacillus plantarum* 8114, la tasa específica más alta de crecimiento ( $\mu$ : 0,16 h<sup>-1</sup>) se observó para la fracción A, indicando que, sobre esta fuente de carbono, se produjo una tasa alta de proliferación celular dentro de un período corto de incubación (Tabla 2). Para las fracciones B, C, D, E y F, la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) fue similar a la observada para la glucosa (0,09 h<sup>-1</sup>). La máxima densidad de población (MPD) fue similar para la glucosa y la fracción A, y estos fueron los valores más altos observados (9,88 -10,11 log UFC / ml), mientras que para otras fracciones los valores MPD estuvieron en el rango de 8,47 - 9,18 log UFC / ml. La duración de la fase lag (LPD) para las fracciones varió de 11,62 a 21,62 h y para la glucosa tomó un valor significativamente menor de 4,90 h.

**Tabla 2.** Parámetros de Gompertz: velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ), máxima densidad de población (MPD) y duración de la fase lag (LPD) para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en caldo MRS con glucosa o con las diferentes fracciones aisladas a partir de alcaucil.

Sustrato	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	LPD (h)	MPD log (UFC/mL)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 8114			
Glucosa (MRS)	0,09 ± 0,009A	4,90 ± 0,98 <sup>a</sup>	10,11 ± 0,26A
Fracción A	0,16 ± 0,06B	14,75 ± 0,36BD	9,88 ± 0,05B
Fracción B	0,09 ± 0,02A	13,39 ± 1,88B	8,47 ± 0,18C
Fracción C	0,09 ± 0,04A	11,62 ± 6,07B	8,86 ± 1,67BC
Fracción D	0,09 ± 0,03A	13,53 ± 3,42B	8,54 ± 0,32C
Fracción E	0,07 ± 0,02A	21,62 ± 4,39CD	9,06 ± 0,40C
Fracción F	0,08 ± 0,01A	13,27 ± 0,45B	9,18 ± 0,05C
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 11863			
Glucosa (MRS)	0,04 ± 0,001A	4,62 ± 1,23 <sup>a</sup>	8,65 ± 0,10A
Fracción A	0,08 ± 0,05A	16,10 ± 4,25BD	8,66 ± 0,45A
Fracción B	0,09 ± 0,03B	9,70 ± 2,80B	8,32 ± 0,33A
Fracción C	0,05 ± 0,03A	13,54 ± 3,01B	8,83 ± 0,90A
Fracción D	0,05 ± 0,02A	10,20 ± 4,71B	8,63 ± 0,44A
Fracción E	0,07 ± 0,02A	21,16 ± 2,71CD	9,07 ± 0,40A
Fracción F	0,05 ± 0,03A	8,83 ± 5,20B	9,02 ± 0,78A

Las letras mayúsculas describen diferencias en los parámetros en cada columna. Distintas letras corresponden a diferencias significativas entre los valores.

En el caso de las cepas *Lactobacillus plantarum* 8114, la tasa específica más alta de crecimiento ( $\mu$ : 0,16 h<sup>-1</sup>) se observó para la fracción A, indicando que, sobre esta fuente de carbono, se produjo una tasa alta de proliferación celular dentro de un período corto de incubación (**Tabla 2**). Para las fracciones B, C, D, E y F, la tasa de crecimiento específico ( $\mu$ ) fue similar a la observada para la glucosa (0,09 h<sup>-1</sup>). La máxima densidad de población (MPD) fue similar para la glucosa y la fracción A, y estos fueron los valores más altos observados (9,88 -10,11 log UFC / ml), mientras que para otras fracciones los valores MPD estuvieron en el rango de 8,47 - 9,18 log UFC / ml. La duración de la fase lag (LPD) para las fracciones varió de 11,62 a 21,62 h y para la glucosa tomó un valor significativamente menor de 4,90 h.

En el caso de *Bifidobacterium bifidum* 11863, la mayor tasa de crecimiento específico se obtuvo para las fracciones A y B (0,08- 0,09 h<sup>-1</sup>), duplicando el valor observado para el medio MRS con glucosa (0,04 h<sup>-1</sup>), pero no hubo diferencias significativas entre el crecimiento en la fracción A y en glucosa. Las otras fibras mostraron una tasa de crecimiento específico de 0,05 - 0,07 h<sup>-1</sup>, y las diferencias entre las distintas fibras no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Los valores de MPD oscilaron entre 8,32 a 9,07 log (UFC / ml) para las diferentes fracciones mientras que para glucosa, el valor MPD fue 8,65 log (UFC / ml). La duración de la fase de lag (LPD) mostró una variación significativa para las diferentes fracciones (8,83 -



21,16 h), observándose un valor de 4,62 h para la glucosa (Tabla 2).

Se puede concluir que el *L. plantarum* 8114 mostró una tasa de crecimiento específico más alto en la fracción A que en glucosa. Los valores específicos de las tasas de crecimiento fueron más altos para esta cepa que para *Bifidobacterium bifidum* 11863, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

### Scores de la actividad prebiótica

Los scores de la actividad prebiótica para *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 se muestran en la **Tabla 3**, donde se puede observar que todos los scores calculados fueron positivos. A mayor score, mayor es el crecimiento relativo del probiótico y / o más bajo el crecimiento relativo de *E. coli*, lo que indica un mayor y más selectivo uso de los prebióticos en relación con la glucosa por parte de los microorganismos probióticos y/o un uso limitado del prebiótico en relación a la glucosa por *E. coli*.

Se observó que el score más alto de actividad prebiótica para *Bifidobacterium bifidum* se obtuvo con la fibra B (0,87) y los scores de las otras fibras no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Para *Lactobacillus plantarum*, el score más alto fue para la fibra A (0,58), observándose scores más bajos cuando *L. plantarum* creció en presencia de las fibras C, F, D, E y B (0,31, 0,24, 0,19, 0,16 y 0,14, respectivamente), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Como se puede observar en la **Tabla 3**, hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los scores de actividad prebiótica entre las dos cepas cultivadas en las fracciones B, C, D, E y F, siendo los valores de *Lactobacillus plantarum* menores que los de *Bifidobacterium bifidum*. Esto indica que existirían diferencias en su capacidad metabólica. La utilización de las diferentes fracciones por las bacterias estudiadas requiere la presencia de sistemas de hidrólisis y de transporte específicos y su presencia o ausencia puede ser la causa de los distintos scores observados (Huebner et al. 2007).

**Tabla 3.** Scores de la actividad prebiótica de los crecimientos de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863 en las diferentes fracciones aisladas a partir de alcaucil

Fracción	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
A	0,58 ± 0,21 Aa	0,79 ± 0,19 Aa
B	0,14 ± 0,18 Aa	0,87 ± 0,20 Ab
C	0,31 ± 0,16 Aa	0,80 ± 0,23 Ab
D	0,19 ± 0,16 Aa	0,81 ± 0,21 Ab
E	0,16 ± 0,20 Aa	0,67 ± 0,19 Ab
F	0,24 ± 0,16 Aa	0,86 ± 0,21 Ab

Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre los valores dentro de cada columna. Letras minúsculas muestran diferencias significativas entre las filas.

Las Bifidobacterias pueden utilizar una diversa gama de carbohidratos de la dieta que escapan de la degradación en la parte superior del intestino, muchos de los cuales son oligo- y polisacáridos derivados de las plantas. Distintas cepas de bifidobacterias pueden poseer habilidades diferentes para utilizar los hidratos de carbono.

La capacidad de las especies y cepas individuales de Lactobacilos para metabolizar carbohidratos difiere sustancialmente. Esta diversidad metabólica se ajusta a la diversidad filogenética en el género *Lactobacillus*. Varias especies como *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. plantarum* metabolizan una gran diversidad de diferentes fuentes de carbono, incluyendo oligo- y polisacáridos. Se ha informado que la inulina y la oligofruktosa son prebióticos efectivos debido a la estimulación de bifidobacterias colónicas, y debido a sus propiedades prebióticas, son cada vez más utilizadas para el desarrollo de nuevos productos alimenticios (Kolida et al. 2002, Olano-Martín 2002, Joossens et al. 2011, Pinheiro de Souza Oliveira et al. 2011).

La fracción A fue la más adecuada para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863, y ello se puede atribuir a su alto contenido de inulina y de pectina de bajo grado de metilación.



## CONCLUSIONES

Las fracciones de fibra dietaria estudiadas mostraron, en general, una capacidad potencial de estimular selectivamente el crecimiento de bacterias intestinales asociadas con la salud. La fracción aislada a partir de tallo de alcaucil con hemicelulosa (fracción A) fue la de mayor score de actividad prebiótica para *Lactobacillus plantarum* 8114 y *Bifidobacterium bifidum* 11863. Este comportamiento podría ser atribuido a su contenido de inulina y de pectina de bajo grado de metilación.

Las otras fracciones también presentaron altos scores de actividad prebiótica para *Bifidobacterium bifidum* 11863 pero los scores fueron más bajos para *Lactobacillus plantarum* 8114.

El potencial de la fibra A para promover el crecimiento de las dos cepas estudiadas es promisorio. Es necesario continuar los estudios para evaluar la resistencia de las fracciones de fibra dietaria a los distintos pHs y a las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal humano y para analizar su absorción gastrointestinal y su fermentación por la microflora intestinal, donde la competición por nutrientes puede influenciar la supervivencia, colonización y actividad metabólica bacteriana en el huésped.



## BIBLIOGRAFÍA

- Atlas RM. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, Florida, Park L. pag 673.
- Berg RD. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in Microbiology, 4:430-435.
- Fissore E., Santo Domingo C., Pujol C., Damonte E., Rojas AM, Gerschenson L. 2014. Food & Function, 5, 3: 463-470.
- Gianuzzi L, Pinotti A, Zaritzky N. 1998. Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef at different temperature. International Journal of Food Microbiology, 39:101-110.
- Gibson G, Roberfroid M. 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. Journal of nutrition, 125:1401-1412.
- Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews, 17: 259-275.
- Hopkins MJ, Cummings JH, Macfarlane GT. 1998. Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. Journal of Applied Microbiology, 85:381-386.
- Huebner J, Wehling RL, Hutkins RW. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal, 17:770-775.
- Huebner J, Wehling RL, Parkhurst A, Hutkins RW. 2008. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. International Dairy Journal, 18:287-293.
- Joossens M, Huys G, Van Steen K, Cnockaert M, Vermeire S, Rutgeerts P, Verbeke K, Vandamme P, De Preter V. 2011. High-throughput method for comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis profiles from human fecal samples reveals significant increases in two bifidobacterial species after inulin-type prebiotic intake. FEMS Microbiology Ecology, 75 (2): 343-349.
- Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66(6): 2682-2684.
- Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition, 87(2): 193-197.
- Leach J, Rastall RA, Gibson GR. 2006. Prebiotics: Development & Application. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. pag. 237-247.
- Marotti I, Bregola V, Aloisio I, Di Gioia D, Bosi S, Di Silvestro R, Quinn R, Dinelli G. 2012. Prebiotic effect of soluble fibres from modern and old durum-type wheat varieties on Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Science of Food and Agriculture, 92(10):2133-2140.
- Olano-Martin E, Gibson GR, Rastall RA. 2002. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology, 93: 505-511.
- Palframan R, Gibson GR, Rastall RA. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. Letters in Applied Microbiology, 37:281-284.
- Pinheiro de Souza Oliveira R, Perego P, Nogueira de Oliveira M, Converti A. 2011. Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. Journal of Food Engineering, 107:36-40.
- Roberfroid M. 2007. Prebiotics:the concept revisited. Journal of Nutrition, 137: 830S-837S.
- Schrezenmeir J, de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition, 73 (2): 361S-364S.
- Zwietering MH, Jongenburger FM, Roumbouts M, vantRiet K. 1990. Modelling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 57: 1875-1881.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Universidad de Buenos Aires UBACYT (20020100100726 y 20020130100550BA), ANPCyT (PICT 2005-38239 y 2012-1941) y CONICET (PIP 11220090100531 y 11220120100507).

