



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y DE LA SALUD

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD PREBIOTICA DE INULINA DE
AGAVE, INULINA DE ACHICORIA Y ALBEDO DE NARANJA SOBRE
BACTERIAS LACTICAS TERMOTOLERANTES PROBIOTICAS

TESIS

que para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

presenta

Juan Díaz Vela

Directora de Tesis:

DRA. MARÍA DE LOURDES PEREZ CHABELA

Asesores:

DR. ALFONSO TOTOSAUS SANCHEZ (TESE)

DR. LINO MAYORGA REYES (UAM-XOCHIMILCO)

Agosto 2010

Vob. J.



El Posgrado de Maestría en Biotecnología está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado, con categoría de Alto Nivel con el número de convenio 471-0.

Esta Tesis fue realizada con el apoyo de la Beca No.224727 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos

Primeramente y de manera especial a la Dra. María de Lourdes Pérez Chabela por la dirección de este trabajo de Tesis, por sus consejos, su amistad y sobretodo por el aprendizaje recibido de su parte. Al Dr. Alfonso Totosaus por seguir brindándome su gran apoyo y consejos dirigidos a mi formación profesional, además de sus valiosas aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Lino Mayorga Reyes por aceptar formar parte del comité de asesores para este trabajo y por permitirme realizar actividades junto con su equipo de trabajo en la UAM-Xochimilco. Sus observaciones objetivas fortalecieron el resultado de este trabajo. Resaltando sus consejos y amistad desinteresada, por lo que siempre estaré agradecido.

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta y a la Dra. Alma Cruz Guerrero por aceptar realizar la revisión del trabajo de Tesis, sus observaciones y comentarios de gran calidad fueron de gran ayuda.

A mis padres: Ana y Juan por ser mis pilares y por los valores inculcados en mi persona, así como a mis hermanos: Carlos y Mauricio, por su cariño y apoyo incondicional.

A Diana por su paciencia, comprensión, consejos, y por estar siempre a mi lado.

A todos mis amigos de Bioquímica de Macromoléculas por esos momentos que hicieron más ligero el trabajo en el laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo de Tesis.

A la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, por permitirme continuar con mi formación profesional.

Índice

0	Resumen y Abstract.....	ix
1	Introducción	1
2	Antecedentes.....	3
2.1	Prebióticos.....	3
2.1.1	Definición	3
2.1.2	Características	3
2.1.3	Tipos de Prebióticos	5
2.1.4	Oligosacáridos	7
2.1.5	Oligosacáridos como Prebióticos	10
2.1.5.1	Lactulosa.....	10
2.1.5.2	Inulina y fructo-oligosacáridos	11
2.1.5.3	Galacto-oligosacáridos.....	12
2.1.5.4	Oligosacáridos de soya.....	13
2.1.5.5	Lactosucrosa	14
2.1.5.6	Isomalto-oligosacáridos.....	14
2.1.5.7	Gluco-oligosacáridos	14
2.1.5.8	Xilo-oligosacáridos	15
2.1.5.9	Transgalacto-oligosacáridos.....	15
2.1.6	Prebióticos en la salud humana.....	16
2.1.7	Uso de Prebióticos en alimentos.....	18
2.1.8	Prebióticos en productos cárnicos	19
2.2	Sub-productos agroindustriales utilizados como prebióticos	21
2.3	Bacterias Ácido Lácticas.....	23
2.3.1	Características	23
2.3.2	Termotolerancia de bacterias ácido lácticas	26
2.3.3	Probióticos.....	29
3	Justificación	32
4	Objetivos.....	33
4.1	Objetivo general	33
4.2	Objetivos Particulares.....	33
5	Hipótesis	34
6	Materiales y Métodos	35
6.1	Preparación del albedo de naranja.	35
6.2	Análisis Bromatológicos	39
6.2.1	Contenido de humedad	39
6.2.2	Contenido de proteína total	39
6.2.3	Determinación de pH.....	40
6.2.4	Determinación de cenizas.....	40
6.2.5	Determinación de grasa.....	40
6.3	Análisis microbiológicos.	41

6.4	Proceso de fermentación	41
6.4.1	Activación de cepas.....	41
6.4.2	Adaptación de cepas y preparación del inóculo	41
6.4.3	Fermentaciones	42
6.4.3.1	Crecimiento bacteriano.....	42
6.5	Determinación de ácidos grasos de cadena corta	42
7	Diseño experimental y análisis estadístico	43
8	Resultados y Discusión.....	45
8.1	Análisis Bromatológico.....	45
8.2	Composición microbiológica de las inulinas (agave y achicoria) y albedo de naranja.	47
8.3	Curvas de crecimiento	49
8.4	Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación	61
8.5	Producción de ácidos orgánicos de cadena corta.	64
9	Conclusiones.....	70
10	Bibliografía	71

Índice de Tablas

Tabla 1. Características distintivas de los cinco géneros de bacterias ácido lácticas (Silliker y Elliott, 1980).....	25
Tabla 2. Parámetros y condiciones de operación de análisis de ácidos orgánicos de cadena corta.	43
Tabla 3. Composición proximal de la diferentes inulinas (agave y achicoria) albedo de naranja. (g/100g).	47
Tabla 4. Composición microbiológica de las diferentes inulinas (agave y achicoria) y del albedo de naranja. (Log UFC/ g)	48
Tabla 5. Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación para <i>Pediococcus pentosaceus</i> en diferentes tipos y concentraciones de fuente de carbono.....	62
Tabla 6. Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación para <i>Aerococcus viridans</i> en diferentes tipos y concentraciones de fuente de carbono.....	63
Tabla 7. Producción de ácidos orgánicos de cadena corta por <i>Pediococcus pentosaceus</i> con diferentes tipos de fuente de carbono.	66
Tabla 8. Producción de ácidos orgánicos de cadena corta por <i>Aerococcus viridans</i> con diferentes tipos de fuente de carbono.....	67

Índice de Figuras

Figura 1. Componentes monosacáridos de oligosacáridos no-digeribles.....	8
Figura 2. Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (A) y con una molécula terminal de fructosa (B).....	12
Figura 3. Proceso de obtención del albedo de naranja.....	36
Figura 4. Diagrama de flujo de análisis químico y microbiológico de albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria.....	37
Figura 5. Proceso de fermentación y análisis cromatográfico de metabolitos de cepas ácido lácticas con diferentes fuentes de carbono.....	38
Figura 6. . Cinéticas de crecimiento para <i>Pediococcus pentosaceus</i> con albedo de naranja como fuente de carbono.....	50
Figura 7. Comportamiento del pH para <i>Pediococcus pentosaceus</i> con albedo de naranja como fuente de carbono.....	50
Figura 8. Cinéticas de crecimiento para <i>Pediococcus pentosaceus</i> con inulina de agave como fuente de carbono.....	51
Figura 9. Comportamiento del pH para <i>Pediococcus pentosaceus</i> con inulina de agave como fuente de carbono.....	51
Figura 10. Cinéticas de crecimiento para <i>Pediococcus pentosaceus</i> con inulina de achicoria como fuente de carbono.....	53
Figura 11. Comportamiento del pH para <i>Pediococcus pentosaceus</i> con inulina de achicoria como fuente de carbono.....	53
Figura 12. Cinéticas de crecimiento para <i>Aerococcus viridans</i> con albedo de naranja como fuente de carbono.....	54
Figura 13. Comportamiento del pH para <i>Aerococcus viridans</i> con albedo de naranja como fuente de carbono.....	54
Figura 14. Cinéticas de crecimiento para <i>Aerococcus viridans</i> con inulina de agave como fuente de carbono.....	56
Figura 15. Comportamiento del pH para <i>Aerococcus viridans</i> con inulina de agave como fuente de carbono.....	56
Figura 16. Cinéticas de crecimiento para <i>Aerococcus viridans</i> con inulina de achicoria como fuente de carbono.....	57
Figura 17. Comportamiento del pH para <i>Aerococcus viridans</i> con inulina de achicoria como fuente de carbono.....	57

0 Resumen y Abstract

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar a la inulina de agave, inulina de achicoria y albedo de naranja como prebióticos para bacterias lácticas termotolerantes. Este estudio se dividió en dos partes. En la primera se llevó a cabo la caracterización bromatológica y microbiológica de estos ingredientes, determinado humedad, pH, proteína, grasa, cenizas y fibra total, así como conteos de enterobacterias, hongos y levaduras y cuenta total. El albedo tuvo el mayor porcentaje de fibra total y cenizas en comparación con ambas inulinas, pero tuvo menor contenido de proteína y grasa. Los conteos microbiológicos se encontraron dentro de los límites. En la segunda parte, se estudio la capacidad prebiótica *in vitro* de estos ingredientes a través de procesos fermentativos utilizándolos como fuente de carbono a concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5%, analizando la producción de ácidos grasos de cadena corta para determinar desviaciones en el metabolismo, con dos cepas de bacterias lácticas reportadas como probióticas, *Pediococcus pentosaceus* y *Aerococcus viridans*. El albedo, con un mayor porcentaje de fibra y cenizas, tuvo el menor tiempo de duplicación en comparación con las inulinas para *Pediococcus pentosaceus* y *Aerococcus viridans*, lo que indica su potencial como prebiótico al mejorar el crecimiento de los microorganismos estudiados al reducir el tiempo de generación de las bacterias. La producción de ácidos grasos de cadena corta fue principalmente ácido láctico, lo cual sugiere que estas fuentes pueden ser metabolizadas sin modificar la producción del metabolito principal.

Abstract

The aim of this work was to evaluate agave inulin, chicory inulin and orange albedo as prebiotic ingredients for thermotolerant lactic acid bacteria. This study was divided into two stages. In the first stage, bromatological and microbiological characterization was done, analyzing moisture, pH, protein, fat, ashes and total fiber, besides enterobacteria, molds and yeast, besides total count. The albedo has a highest content of total fiber and ashes as compared to agave and chicory inulins; but protein and fat were lower for orange albedo. Microbiological counts were acceptable. In the second part, prebiotic capacity of these ingredients were studied employing two lactic acid bacteria reported as probiotic, *Pediococcus pentosaceus* and *Aerococcus viridans*, at concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5% during 12 h, analyzing short chain fatty acids production in order to find out any metabolic change. The albedo, with high fiber and ash content, has the lower microbial duplication time as compared to agave and chicory inulins, indicating its higher prebiotic capacity, since improved bacteria growth was observed, by decreasing bacterial generation time. Production of short chain fatty acids were mainly lactic acid, suggesting that this probiotic sources can be metabolized with no changes in the production of the main metabolite.

1 Introducción

Hoy en día, la población mundial se ve afectada por el padecimiento de diversas enfermedades relacionadas con una alimentación deficiente. Son problemas de salud que no son exclusivos de la época contemporánea, con la diferencia de saber actualmente cuales son las causas de dichos padecimientos.

Existen enfermedades como el cáncer de colon, donde una de las posibles causas es el mal funcionamiento de la flora microbiana que habita en el tracto digestivo. Las bacterias que predominan en este sitio deben cumplir con la función de protegernos de los microorganismos patógenos, sin embargo, no siempre es así. Un crecimiento exponencial en un tiempo corto y en buenas condiciones asegura la superioridad sobre el otro tipo de microbiota generando beneficios a la salud.

Las bacterias que deben predominar el aparato digestivo son denominadas como probióticos, ya que son necesarias para la defensa contra infecciones. Se ha demostrado que el suministro de ciertos carbohidratos llamados prebióticos, favorece el crecimiento de los probióticos.

Los prebióticos son sustancias obtenidas de fuentes vegetales, las cuales son digeribles solo en el colon donde se sitúa el mayor número de la flora intestinal. Gracias a su efecto sobre ciertos microorganismos se ha denominado como un alimento funcional, que por definición sería aquel que contiene un componente o nutriente con actividad selectiva beneficiosa lo que le confiere un efecto fisiológico adicional a su valor nutricional, el efecto positivo hacia la salud se refiere a una mejora de las funciones del organismo.

Diversas son las fuentes para la obtención de este tipo de alimentos funcionales con propiedades prebióticas. La inulina es un carbohidrato que ha sido empleado por su función prebiótica en distintos alimentos, sin embargo, existen subproductos como residuos de cáscara de cítricos a los cuales se le atribuyen propiedades funcionales que pudiesen ofrecer beneficios similares al de la inulina.

Por otro lado, las bacterias ácido lácticas termotolerantes debido a su efecto probiótico brindan efectos positivos a la salud del huésped, aunado a esto estas bacterias se pueden utilizar en productos cárnicos cocidos ya que pueden sobrevivir en ambientes con temperatura relativamente alta. Esto permite su uso en la elaboración de productos alimenticios logrando un alimento funcional mediante la simbiosis entre bacterias benéficas (probióticos) y carbohidratos no digeribles (prebióticos).

Diversas investigaciones han demostrado que la proliferación de bacterias específicas mediante la fermentación de carbohidratos no digeribles (efecto bifidogénico de fructanos parecidos a la inulina) logra inhibir la colonización de patógenos, ejerciendo un efecto protector frente a diversas enfermedades intestinales.

En este trabajo se tuvo como objetivo evaluar la capacidad prebiótica de diferentes tipos de inulina (achicoria y agave) y albedo de naranja sobre bacterias lácticas termotolerantes.

2 Antecedentes

2.1 Prebióticos

2.1.1 Definición

Los alimentos con efecto prebiótico, fueron definidos primeramente como: ingredientes alimenticios no-digeribles que afectan benéficamente al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, generando beneficios a la salud (Gibson y Roberfroid, 1995). Recientemente han redefinido el concepto de prebiótico como un ingrediente fermentable selectivo que permite cambios específicos, además de conferir beneficios sobre la composición y/o actividad de la microflora gastrointestinal (Gibson y col., 2004). Sin embargo, el concepto de prebiótico se le ha atribuido a diversos ingredientes alimenticios sin la debida consideración de los criterios requeridos. De manera que cualquier alimento que contenga carbohidratos, en particular oligosacáridos y polisacáridos (incluyendo algunas fibras dietéticas) podría ser un prebiótico, pero no todos los carbohidratos y fibras dietéticas son prebióticos (Gibson, 2004).

De esta manera, los ingredientes prebióticos se consideran además parte de aquellos alimentos funcionales que tienen gran interés en la población, la industria alimentaria y la comunidad científica, ya que pueden modificar de manera positiva los procesos fisiológicos y biológicos en la nutrición ó como auxiliares en el tratamiento de enfermedades humanas (Salminen y col., 1998).

2.1.2 Características

Dentro de los criterios de clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico se encuentran tres que han sido considerados como los más importantes (Gibson y Roberfroid, 1995):

- Resistencia a los procesos digestivos en la parte superior del tracto gastrointestinal.
- Ser fermentables por la microflora intestinal, específicamente la que reside en el colon.
- Estimulación selectiva de crecimiento y/o actividad de un número limitado de las bacterias promotoras de la salud.

La resistencia a diversos procesos enzimáticos a través del tracto gastrointestinal es parte esencial de aquellos alimentos llamados *nutrientes del colon*, ya que deben ser no-digeribles, pueden ser monómeros, oligómeros o polímeros adsorbidos hasta ser hidrolizados por la microbiota que habita el colon y por consiguiente ser precursores de células procariotas. Estos nutrientes del colon pueden ser clasificados como generales (como las fibras dietéticas) ó específicos de acuerdo a las funciones que estos desempeñan junto con los microorganismos benéficos (Roberfroid, 2008). Así mismo, las reacciones enzimáticas llevadas a cabo en el páncreas ó en el intestino no contemplan al tipo de carbohidrato con carácter prebiótico, de tal manera que los métodos para poder confirmar el potencial prebiótico pueden ser mediante la administración de prebióticos a pacientes con ileostomía y medir la recuperación de prebióticos en la parte terminal del íleon o por la descripción detallada de su estructura química para predecir la susceptibilidad a la degradación enzimática y estabilidad a los jugos gástricos (Kolida y Gibson, 2008).

Con respecto a la fermentabilidad, los prebióticos deberán ser fermentados únicamente por bacterias del colon, lo cual puede ser demostrado por fermentaciones *in vitro* en reactores simuladores de alguna parte del intestino en condiciones controladas. La fermentación de los prebióticos puede promover algunas funciones fisiológicas específicas a través de la liberación de metabolitos por las bacterias, en especial los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, lactato, etc.) al lumen intestinal (Cummings y col., 2001).

Las bacterias del colon presentan diferentes grados de fermentación dependiendo de los carbohidratos que vayan a metabolizar, aquellos carbohidratos con un bajo nivel de polimerización son metabolizados de una forma más efectiva aun por encima de azúcares como la glucosa (Bustamante y col., 2006).

Aunque cada uno de estos criterios es importante, la demostración de selectividad en la estimulación del crecimiento y/o actividad de bacterias no resulta ser tan sencillo, debido al número tan variado de especies que habitan en el sistema digestivo. Siendo la selectividad, la característica más importante para un ingrediente que pueda ser considerado como prebiótico, debido a la variedad de microorganismos y por consiguiente las rutas metabólicas que utilice para metabolizar los carbohidratos (Roberfroid, 2008). Los prebióticos más que proporcionar bacterias exógenas como los probióticos, se dirigen a favorecer a las bacterias ya presentes en el colon, cuya atención se ha centrado en incrementar el número de bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Otra de las características presentes en los prebióticos es la absorción de una variedad de minerales, como pueden ser el calcio, magnesio, hierro y zinc, mediante la fermentación de ácidos grasos de cadena corta, esto mediante la disminución del pH del medio y de esta manera solubilizar los minerales (Scholz-Ahrens y col., 2001).

2.1.3 Tipos de Prebióticos

Las sustancias presentes en el aparato digestivo que sirve de sustrato para los microorganismos que lo habitan es diversa. Por lo que existen sustancias con características prebióticas dentro del grupo de los carbohidratos, en especial los oligosacáridos no digeribles (Gibson y Roberfroid, 1995).

Los efectos benéficos de la presencia de microorganismos en el tracto gastrointestinal depende de su viabilidad y actividad metabólica, fomentado principalmente por el tipo de carbohidratos suministrados en el espacio donde ésta microflora reside. Dentro de los carbohidratos existen compuestos que tienen una

conformación desde monomérica hasta polimérica que podrían tener un efecto prebiótico, sin embargo, se sabe que no todos los carbohidratos presentan tal característica (Kolida y Gibson, 2008). De tal manera que existe una serie de carbohidratos que si presentan efecto prebiótico, los cuales difieren en su conformación estructural.

Los diferentes tipos de prebióticos que pertenecen al grupo de los carbohidratos se pueden obtener tanto de forma natural como los fructanos (inulina), oligosacáridos de la soya como rafinosa y estaquiosa por extracción directa del concentrado de la soya; por hidrólisis de polisacáridos que puede ser química ó enzimática (ejemplo: Xilo-oligosacaridos e Isomalto- oligosacáridos); ó por síntesis química y enzimática, esta última por transglicosilación y/o hidrólisis inversa usando hidrolasas y/o glicosiltransferasas a partir de sustratos como disacáridos (ejemplo: lactosucrosa y galacto–oligosacáridos) (Swennen y col., 2006).

Otro tipo de prebióticos pertenecientes a los carbohidratos son los derivados de la lactosa, dentro de los principales se encuentran los galacto-oligosacáridos que son funcionalmente similares a la inulina. Sin descartar a las fibras dietéticas, las cuales forman parte de un grupo de cereales como: maíz, sorgo, trigo, avena, etc.; ya que estos alimentos presentan características que las hace prebióticas (Charalampopoulos y col., 2002).

Algunos carbohidratos no-fructanos con características de fermentación y resistencia similares a los prebióticos son tomados en cuenta. En particular, los almidones resistentes han sido objeto de numerosos estudios que han documentado efecto prebiótico (Brown, 2004).

Por otro lado, la fibra dietética podría ser considerada dentro del grupo de prebióticos de acuerdo a las características que presentan. La fibra dietética es la parte comestible de las plantas o carbohidratos análogos, los cuales resisten la hidrólisis de las enzimas del tracto digestivo. La fibra soluble puede ser dividida en dos categorías de acuerdo a la solubilidad, proporcionando beneficios a la salud (Charalampopoulos y col., 2002). La fibra hidrosoluble consiste principalmente en

β -glucanos y arabinosilanos, los cuales facilitan el tránsito gastrointestinal y reducen la adsorción de grasa y glucosa en el intestino; mientras que la fibra insoluble contiene lignina, celulosa, hemicelulosa y polisacáridos como arabinosilanos con efectos similares a la fibra soluble que beneficia a la salud (Marlett, 1990).

2.1.4 Oligosacáridos

Los oligosacáridos (del griego *oligo*, “pocos”) son carbohidratos de bajo peso molecular los cuales varían de acuerdo a el número de monómeros que los conformen. Los carbohidratos pueden ser clasificados de acuerdo a su peso molecular ó grado de polimerización (número de unidades de monosacáridos unidos) en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. De acuerdo a la IUPAC (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*), los oligosacáridos son definidos como sacáridos que contienen entre tres y diez unidades de monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos (Mussatto y Mancilha, 2007).

Las diferencias químicas entre los diferentes tipos de oligosacáridos están de acuerdo a la longitud de las cadenas, composición de monómeros, grado de ramificación y pureza. Dentro de los cuales se pueden presentar los principales monosacáridos: glucosa, fructosa, galactosa y/o xilosa (Fig. 1).

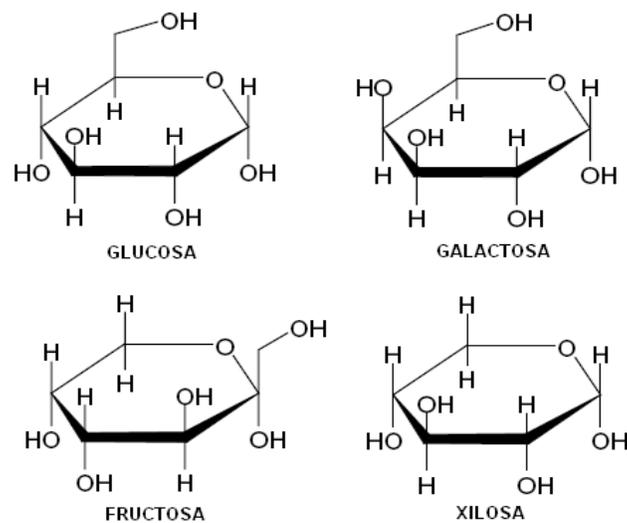


Figura 1. Componentes monosacáridos de oligosacáridos no-digeribles.

Los oligosacáridos son hidrosolubles y normalmente 0.3-0.6 veces más dulces que la sacarosa, de hecho su dulzor depende sobre todo de su estructura química, el grado de polimerización de los oligosacáridos presentes y los niveles de mono y disacáridos en la mezcla (Voragen, 1998).

Durante la síntesis de los oligosacáridos, se establece el enlace glucosídico generado por la eliminación de uno de los grupos OH anomérico de uno de los monómeros; al monómero que los precede se le agrega el sufijo "sil" al final de su nombre. En el caso de que los dos monosacáridos estén unidos mediante sus respectivos carbonos anoméricos se producen azúcares no reductores (Valdés, 2006).

Al igual que sucede con los polisacáridos, el organismo humano sólo utiliza los oligosacáridos que han sido hidrolizados enzimáticamente en el intestino grueso y convertidos en sus respectivos monosacáridos, mismos que serán absorbidos por la pared intestinal y transportados por el torrente sanguíneo. En base a sus propiedades fisiológicas, los carbohidratos pueden ser clasificados como digeribles y no-digeribles. El concepto de oligosacárido no-digerible se origina de la observación que el átomo de carbono anomérico (C1 ó C2) de las unidades de

monosacáridos de algunos oligosacáridos dietéticos tienen una configuración de tal manera que forman enlaces glucosídicos no-digeribles a la actividad hidrolítica de las enzimas digestivas humanas (Roberfroid y Slavin, 2000).

Algunos carbohidratos oligoméricos presentan además características prebióticas, aportan poca energía calórica y se ha reportado que no constituyen factores causantes de caries dental por la estructura compleja para la microflora bucal (Barreteau y col., 2006). No obstante, algunos oligosacáridos presentan propiedades fisicoquímicas específicas y de resistencia a procesos digestivos, mientras estos pasan al colon muchos de los oligosacáridos no-digeribles son hidrolizados en pequeños oligómeros y monómeros, los cuales son metabolizados por una o varias bacterias anaerobias. Incluso aunque los oligosacáridos no sean suministrados al cuerpo humano como monosacáridos estos son fuente de energía indirecta y reguladores metabólicos (Mussatto y Mancilha, 2007).

Los procesos metabólicos llevados a cabo en el colon, conocidos como fermentación, no solo sirven a las bacterias para proveerle de energía para proliferar y generar gases (H_2 , CO_2 , CH_4), también producen ácidos grasos de cadena corta dependiendo del tipo de oligosacáridos que se haya suministrado así como la composición de la flora intestinal (Sako y col., 1999).

En estudios realizados, se ha encontrado que el consumo de oligosacáridos crea un efecto en la salud del consumidor, como la modificación significativa de la microflora del colon (Sangeetha y col., 2005) una disminución del pH en el colon que permite la eliminación de la microflora patógena (Manning y Gibson, 2004), producción de nutrientes como vitaminas del complejo B y ácido fólico (Gibson, 2004), un incremento en la excreción fecal (Bielecka y col., 2002), evitan el estreñimiento al actuar similarmente a la fibra dietética (Rivero-Urgell y Santamaría-Orleans, 2001), inhibición de diarreas relacionadas con infecciones intestinales (Roberfroid y Slavin, 2000), efecto protector contra infecciones gastrointestinales, urogenitales y respiratorias debido a su capacidad de inhibir la adhesión de bacterias patógenas al intestino (Sako y col., 1999), incremento en la

adsorción de diferentes minerales (Fe, Ca y Mg) por la unión a los oligosacáridos (Ziemer y Gibson, 1998) y efecto benéfico sobre la metabolización de lípidos (Younes y col., 1996).

2.1.5 Oligosacáridos como Prebióticos

Existen actualmente en el mercado una serie de ingredientes alimenticios considerados como prebióticos, a los cuales se les ha determinado el efecto prebiótico mediante métodos *in-vitro*, utilización en animales y humanos. Sin embargo, no todos los oligosacáridos son considerados como prebióticos aunque presenten algunas de las características. De manera que se han clasificado algunos carbohidratos como prebióticos (lactulosa, inulina, galactooligosacáridos) y posibles prebióticos (oligosacáridos de soya, lactosucrosa, isomaltooligosacáridos, glucooligosacáridos, xilooligosacáridos y transgalactooligosacáridos) (Kolida y Gibson, 2008).

2.1.5.1 Lactulosa

La lactulosa (4-O- α -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) es un disacárido reductor sintético en la forma galactosa β (1-4) fructosa unido mediante enlaces glucosídicos, sintetizado a partir de la isomerización de la lactosa, y que además puede formarse a partir del calentamiento de la lactosa de la leche al epimerizarse la glucosa en fructosa (Valdés, 2006). Aunque los oligosacáridos son formados mínimo por tres monosacáridos, la lactulosa es un disacárido que posee propiedades similares que los oligosacáridos y por esta razón está incluida dentro del grupo de los oligosacáridos (Crittenden y Playne, 1996).

Este disacárido fue originalmente usado como un laxante al no ser absorbido e hidrolizado por el intestino delgado, además de ser considerado como un factor bifidogénico por lo que ha sido ampliamente utilizado (Tamura, 1983).

Se ha encontrado que la β -galactosidasa del intestino humano, no degrada la lactulosa. Además que ciertas poblaciones microbianas (*Bacteroides bifidum*,

Bacteroides vulgatus y *Lactobacillus casei*) crecieron satisfactoriamente en presencia de este carbohidrato, demostrando su capacidad de estimulación selectiva (Terada y col., 1993).

2.1.5.2 Inulina y fructo-oligosacáridos

La inulina es un polisacárido de la forma glucosa α 1-2[β 1-2 Fructosa]_n, donde $n > 10$ (Crittenden y Playne, 1996). La estructura relativa de la inulina, el fructo-oligosacárido (una versión de bajo peso molecular) es producida mediante una hidrólisis enzimática parcial usando una endoinulinasa ó por síntesis enzimática de *Aspergillus niger* mediante una β -fructosidasa, ha sido el mejor oligosacárido documentado por su efecto sobre las bifidobacterias intestinales y es considerado como un importante sustrato prebiótico (Gibson y col., 1995). Además de ser producido en grandes cantidades por varios países para su uso en diversos alimentos.

La inulina es un polisacárido que se puede extraer de plantas de distintas familias *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramínea* y *Compositae*, aunque la principal fuente de la inulina es la achicoria (*Cichorium intybus*). De esta planta se obtiene un polisacárido complejo [α -D-glucopyranosil-(β -D-fructofuranosyl)_{n-1} β -D-fructofuranósido], siendo concretamente un heterofructano con un grado de polimerización de 10 a 60 unidades de D-fructosa unidos por enlaces glucosídicos β (1-2), obtenida de la hidrólisis enzimática parcial por la inulinasa (Madrigal y Sangronis, 2007).

La inulina está constituida por moléculas de fructosa, siendo el término “fructanos” usado para denominar este tipo de compuestos. Las cadenas de fructosa tienen la peculiaridad de terminar en una unidad de glucosa unida por un enlace α (1-2) (residuo -D-glucopiranosil), como en la sacarosa (Flamm y col., 2001), pero también el monómero terminal de la cadena puede corresponder a un residuo de β -D-fructopiranosil (Roberfroid, 1999) (Fig. 2).

La resistencia al proceso digestivo de la inulina ha sido ampliamente estudiada, siendo considerada como fibra dietética, además, de ser un compuesto que mediante estudios *in-vitro* e *in-vivo* resulta efectivo sobre el crecimiento de la microflora intestinal, disminuyendo microorganismos patógenos como *Clostridium*, donde en algunos tratamientos se incremento la relación de butirato indicando un cambio en la actividad bacteriana (Roberfroid, 1993).

La actividad prebiótica de la inulina ha sido determinada, debido a que estos carbohidratos tienen una especificidad relacionada con bifidobacterias ya que estas presentan una enzima (β -fructanofuranosidasa) compitiendo así con las distintas especies en el tracto gastrointestinal (Kolida y Gibson, 2007).

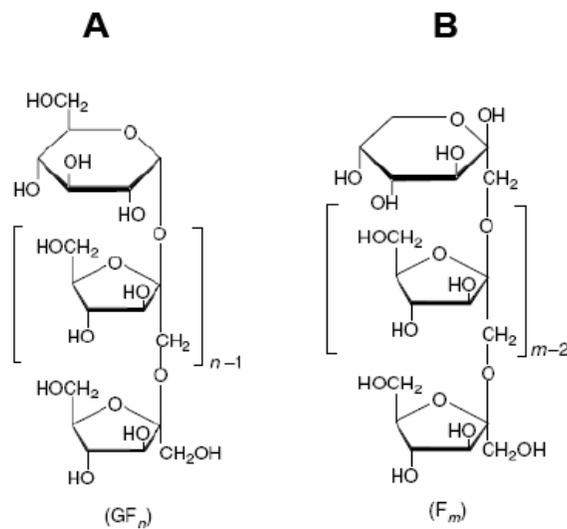


Figura 2. Estructura química de la inulina: con una molécula terminal de glucosa (A) y con una molécula terminal de fructosa (B).

2.1.5.3 Galacto-oligosacáridos

Los galacto-oligosacáridos son oligosacáridos que contienen galactosa de la forma glucosa α 1-4[β 1-6 galactosa] $_n$, donde $n= 2-5$. La cual es obtenida de la lactosa

usando la actividad *trans*-galactosidasa de la enzima β -galactocidasa, glicosidasas que a condiciones apropiadas de reacción tienen actividades de transgalactosilación, la cual origina la formación de cadenas 4' ó 6'-galactosil-lactosa, entre cadenas más largas de oligosacáridos y algunos disacáridos transgalactosilados (Macfarlane y col., 2007).

Este oligosacárido se encuentra en bajas concentraciones en la leche humana y de ganado vacuno, lo cual es de gran ayuda debido a que favorece la presencia de bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal (Crittenden y Playne, 1996). Este es un oligosacárido que gracias a sus características de resistencia a la acidez gástrica y fermentabilidad es considerado como prebiótico (Roberfroid, 2008). Además de ello, son solubles actuando como fibra dietética soluble, demostrando bajo ciertos estudios realizados en ratas, que estos oligosacáridos pueden aliviar la constipación, mejorar la adsorción de minerales como calcio, hierro y magnesio y retardar el desarrollo de cáncer de colon (Meyer y Tunmland, 2002).

Los galacto-oligosacáridos han sido reconocidos como un aditivo alimentario GRAS (generalmente reconocidos como seguros) ya que son componentes de la leche materna y yogures tradicionales y son producidos de la lactosa ingerida por las bacterias residentes en el intestino. Según estudios realizados, no se ha demostrado algún efecto tóxico ni mutanogénico, recomendando dosis de 20 g por persona (Sako y col., 1999).

2.1.5.4 Oligosacáridos de soya

El principal oligosacárido contenido en la soya es la rafinosa. Estos oligosacáridos tienen unidades de α -galactosil sucrosa (Crittenden y Playne, 1996). La mayoría de los experimentos en humanos han sido llevados a cabo mediante el análisis con oligosacáridos de soya, en los cuales se ha demostrado que no presentan resistencia a la acidez gástrica, pero han presentado respuesta a ser fermentables por parte de ciertas bifidobacterias (Roberfroid, 2008). Por lo que no se le

considera como un prebiótico, aunque presente algunos de los criterios de este género de ingredientes alimenticios.

2.1.5.5 Lactosucrosa

Este carbohidrato es producido por una mezcla de lactosa y sucrosa usando la enzima β -fructofuranosidasa. El residuo fructosil es transferido desde la sucrosa al carbono de la posición uno de la glucosa, produciendo un oligosacárido no-reducido (Playne y Crittenden, 1996).

Dadas las pocas características que aporta, aun no puede ser considerado como prebiótico (Roberfroid, 2008). Sin embargo, se ha demostrado su capacidad bifidogénica en cultivos puros, así como en el incremento de la microflora del colon y disminución de *Clostridium* en humanos, sin embargo, no ha sido comprobada su capacidad de resistencia al proceso de digestión (Tamura, 1983).

2.1.5.6 Isomalto-oligosacáridos

Estos carbohidratos son ligeramente digeribles, pero no se consideran como prebióticos, aunque su capacidad fermentable ha sido comprobada con algunas bifidobacterias dentro del intestino (Roberfroid, 2008). Los isomalto-oligosacáridos están compuestos de monómeros de glucosa unidos por enlaces $\alpha(1-6)$ glucosídicos, los cuales han sido considerados como prebióticos al ser un buen sustrato para las bacterias que habitan el aparato digestivo (Olano y col., 2000).

2.1.5.7 Gluco-oligosacáridos

Una preparación de oligosacáridos como esta, es sintetizada enzimáticamente, usando una glucosil-transferasa de *Leuconostoc mesenteroides*, la cual transfiere moléculas de glucosa de un donador a un aceptor, llamado maltosa. Los oligosacáridos resultantes contienen enlaces $\alpha(1-2)$ los cuales se encuentran en la forma de tetrasacáridos (Valette y col., 1993).

Su resistencia en el tracto gastrointestinal, no ha sido demostrada. Existen algunos bacteroides que se benefician por la presencia de estos oligosacáridos, aunque no todas las especies de lactobacilos, lo cual genera la incertidumbre de poderlos considerar como prebióticos (Djouzi y col., 1995).

2.1.5.8 Xilo-oligosacáridos

Los xilo-oligosacáridos son cadenas de moléculas de xilosa unidas por enlaces β (1-4) y compuestas principalmente de xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa (Hopkins y col., 1998).

Un compuesto similar, el xilano, es considerado como fibra dietética indicando su capacidad para mantener el sistema digestivo en buen estado, aunque hasta el momento no se haya determinado la capacidad de resistir a la acidez gástrica y adsorción gastrointestinal. Por otro lado, se ha demostrado la fermentabilidad de este carbohidrato por parte de diversas bifidobacterias y lactobacilos (Roberfroid, 2008), aunque no todas las especies logran fermentar la variedad de estos carbohidratos, existen evidencias de que las bifidobacterias fermentan solo los xilo-oligosacáridos, pero no los xilanos (Crittenden y Playne, 2002).

2.1.5.9 Transgalacto-oligosacáridos

La transglucosilación enzimática de la lactosa produce una mezcla de oligosacáridos, conocidos como transgalacto-oligosacáridos (Crittenden y Playne, 1996). La composición de la mezcla depende sobre todo de la enzima utilizada y las condiciones de reacción. Generalmente consiste de oligosacáridos de tri ó penta sacáridos con enlaces β (1-6), β (1-3) y β (1-4).

La no-digestibilidad no ha sido comprobada, sin embargo, reaccionan favorablemente en el aparato digestivo conjuntamente con el crecimiento abundante de bacterias probióticas (Roberfroid, 2008).

2.1.6 Prebióticos en la salud humana

Diversos compuestos obtenidos de manera natural en frutos y cereales, principalmente los residuos generados después de un procesamiento, conocidos como fibra dietética, se le han atribuido propiedades prebióticas. La fibra dietética ha sido estudiada por un largo periodo de tiempo donde ha sido sujeto de gran controversia debido a sus propiedades benéficas reflejadas a nivel fisiológico dentro del organismo humano (Rodríguez y col., 2006).

Los oligosacáridos son los principales componentes de la leche materna y en muchos productos de manera natural como son frutas, verduras, legumbres y semillas. Algunos oligosacáridos no-digeribles presentes de forma natural que no pueden ser metabolizados por el cuerpo humano son considerados prebióticos debido a la capacidad de aumentar significativamente el número de bacterias benéficas, lo cual ha sido demostrado por estudios *in vitro* donde la acción combinada de galacto-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos han mostrado un aumento en la cuenta de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias con una inhibición concomitante de otras especies como bacteroides y *Clostridium* en el colon, mostrando así una relación directa entre el aumento de prebióticos y bacterias benéficas y disminución de flora patógena (Moro y col., 2002). Esta proliferación de flora benéfica en el colon ha sido asociada a diversos beneficios a la salud. Algunos beneficios reportados son la fuerte habilidad de la flora intestinal de defensa contra flora potencialmente patógena, reducción de metabolitos tóxicos y prevención de constipación (Spiegel y col., 1994).

Wang y Gibson (1993) estudiaron el efecto *in vivo* de la oligofruktosa, ellos reportaron una disminución del número de *E. coli* y *Clostridium* lo cual fue asociado a la generación de ácidos orgánicos de cadena corta, así como encontraron un incremento en el número de bifidobacterias.

Otros estudios han demostrado que la microflora dominante en niños es conformada en su mayoría por bifidobacterias y bacterias ácido lácticas (Harmsen

y col., 2000). Dicha flora bacteriana que coloniza la parte inferior del tracto gastrointestinal es la encargada de mantener el equilibrio dentro de este sistema, sin embargo, se ve afectada por diversos factores como puede ser alimentación deficiente, el uso excesivo de medicamentos y en la mayoría de los casos por proliferación de microflora patógena. Además, con el paso del tiempo, esta microflora pierde su capacidad para colonizar, sin embargo, es posible modificar esta descompensación por la administración oral de cultivos bacterianos (probióticos), o por la administración de ingredientes no digeribles que incrementen el número de dichos cultivos bacterianos debido a su capacidad estimulante selectiva, llamados prebióticos (Bruzzese y col., 2006).

Algunos estudios con personas de edad avanzada que incluyeron oligosacáridos no digeribles en su alimentación, observaron efectos fisiológicos benéficos como el aumentar el contenido de agua en las heces fecales estimulando hábitos regulares de defecación (Boehm y col., 2005).

El suministro de prebióticos como la inulina en la dieta, induce una modificación significativa en la microflora intestinal incrementando el número de bifidobacterias y lactobacilos, así como una mejor adsorción de calcio, magnesio (Kruse y col., 1999; Van Den Heuvel y col., 1999) y hierro al consumir diferentes tipos de oligosacáridos e inulina (Yeung y col., 2005). Personas con dietas altas en contenido de fibra reducen el riesgo de contraer enfermedades como cáncer, problemas cardíacos, obesidad y diabetes (Cánovas y Pérez-Álvarez, 2006); aunado a la disminución de los niveles de triglicéridos ya que su degradación fortalece a la interacción de la fibra sobre las lipasas pancreáticas (Sajilata y col., 2006).

Existen evidencias que los productos de la fermentación de carbohidratos por parte de bacterias residentes en el colon promueven beneficios a la salud. El caso específico del ácido butírico ha demostrado que reduce los riesgos de cambios malignos en células disminuyendo la incidencia de contraer cáncer de colon (Tharanathan y Mahadevamma, 2003).

Otra área de gran importancia es el metabolismo lipídico. Estudios sobre prebióticos demuestran la disminución de colesterol y lipoproteínas de baja densidad en plasma debido a los componentes generados de la fermentación de carbohidratos como son los ácidos orgánicos de cadena corta, los cuales se asocian a la solubilidad en el medio ácido seguido de la excreción de ácidos biliares (Gallaher y col., 1992; Macfarlane y col., 2006).

Sin descartar casos en donde la aplicación de prebióticos y probióticos de manera simbiótica han demostrado el mejoramiento de problemas atípicos relacionados con enfermedades de la piel, específicamente estudios realizados con niños (Passeron y col., 2006).

2.1.7 Uso de Prebióticos en alimentos

Existen diversos compuestos oligoméricos con características funcionales los cuales proporcionan beneficios a nivel nutricional. Los aspectos fisicoquímicos en alimentos como lácteos y productos cárnicos han sido de gran relevancia debido a los beneficios que brindan estos ingredientes (Voragen, 1998).

En la industria alimentaria, los oligosacáridos no digeribles con características prebióticas han sido empleados en la elaboración de bebidas y dulces potencializando el sabor, color e incrementando la viscosidad (Crittenden y Playne, 1996). De la misma manera en la elaboración de pan y productos fermentados actúan como estabilizadores de proteínas, de emulsiones y de sabores (Swennen y col., 2006).

La inulina, una fibra soluble obtenida de la achicoria, es ampliamente reconocida por su carácter prebiótico. Con el advenimiento de productos reducidos en grasa, la funcionalidad de la inulina la convierte en un ingrediente potencial de sustitución de grasa en los alimentos. La propiedad de sustituir grasa se basa en la formación de geles con baja fuerza de corte, resultando en productos con una textura similar a la formulación tradicional, principalmente en la industria cárnica (Jánváry, 2009). La inulina favorece la palatabilidad que podría ser afectada por la disminución de

grasa, generando además sensación de saciedad sin ingerir grandes cantidades del alimento con baja densidad calórica (Archer y col., 2004).

Aunado al mejoramiento de características fisicoquímicas, recientemente se realizaron estudios incorporando fibras dietéticas extraídas de residuos agroindustriales con características prebióticas, las cuales se ha reportado reducen considerablemente el nivel de nitritos residuales en productos cárnicos curados, lo cual genera bienestar con la disminución de sustancias que afecten la salud (Viuda-Martos y col., 2009).

En la industria láctea también se han realizado estudios, reportando que la aplicación de inulina en la formulación de helados no afecta las propiedades sensoriales, mejorando las características fisicoquímicas aunado a un aumento en la cuenta final de lactobacilos y bifidobacterias (Akin y col., 2007).

Estudios realizados en productos con almidón sugieren el uso de polisacáridos no-almidonados como la inulina para aumentar el nivel nutricional al observar una relación más baja de carbohidratos durante la digestión *in vitro* del almidón, sin deteriorar las propiedades de cocción y texturales (Brennan y col., 2004).

De manera general, los componentes hidrocarbonados oligoméricos y poliméricos con características prebióticas al presentar características sensoriales particulares y funcionales potencializan su aplicación en diversos alimentos, sin embargo, su uso es limitado por factores fisiológicos. Devereux y col. (2003) realizaron estudios de aceptabilidad de diversos productos bajos en grasa como galletas, pasteles, helados y productos cárnicos reportando el límite de aplicación de inulina y oligofruktosa (4-13g /100g de producto) en función de los efectos fisiológicos provocados en la salud humana.

2.1.8 Prebióticos en productos cárnicos

La inulina, oligofruktosa y galactooligosacáridos han sido estudiados en diversos países y se han considerado como seguros (Coussement, 1999; Spiegel y col., 1994), sin embargo, presentan algunos problemas de salud como pueden ser

flatulencias y ligeros espasmos estomacales sin llegar a ser considerados como importantes (Briet, 1995).

En la práctica, los niveles de uso de prebióticos oscilan entre 2 y 4 g/kg de producto, ofreciendo un valor calórico estimado entre 1 y 2 kcal/g (Livesey, 1992; Roberfroid y col., 1993).

Se han realizado estudios para incorporar inulina a productos cárnicos fermentados secos, a los cuales se les redujo el porcentaje de grasa hasta un 75% sobre el total que normalmente es incorporado (20%). Resultando productos con buena aceptación organoléptica, dadas las características de textura como suavidad, adhesividad y resiliencia similares a las formulaciones convencionales (Mendoza y col., 2001).

La incorporación de inulina en productos cárnicos bajos en grasa ha generado gran interés debido al porcentaje de grasa que puede ser reducido (desde 20 hasta 80%) mediante la incorporación de inulina (4 - 13 g inulina / 100 g de producto) sin afectar propiedades sensoriales (Devereux y col., 2003).

Existen estudios donde la incorporación de inulina en la formulación de salchichas ó mortadela reducidas en grasa afecta negativamente los parámetros de color y textura, sin embargo, el uso de citrato en lugar de fosfatos mimetiza tales efectos mejorando así dichos parámetros además de presentar una composición microbiológica similar a la formulación tradicional (Nowak y col., 2007).

Dentro de la elaboración de salchichas bajas en grasa también se han utilizado ingredientes considerados como prebióticos, como es el caso de la inulina. Ruiz y Pacheco-Delahaye (2007) incorporaron este prebiótico junto con carragenina como sustitutos de grasa, reportando un aumento en el porcentaje de proteína y disminuyendo con esto el porcentaje de grasa. El uso de la inulina disminuyó también el número de colonias de *E. coli*.

Los prebióticos pueden usarse debido a sus propiedades nutricionales ó tecnológicas, con respecto a la última, se han realizado diversos estudios al

incorporar inulina como sustituto de grasa, mejorar la textura y estabilidad de productos cárnicos (Franck, 2008). Además, ciertos oligosacáridos dependiendo de lo largo de sus cadenas poliméricas, pueden presentar resistencia a temperaturas relativamente altas (100 °C) así como condiciones ácidas ó básicas (Courtin y col., 2009) lo que les permitirían formar parte de productos alimenticios que requieran estas condiciones de elaboración.

2.2 Sub-productos agroindustriales utilizados como prebióticos

Existe una gran variedad de cítricos producidos en territorio mexicano, de los cuales se pueden obtener beneficios derivados de casi toda su composición. La naranja es en la actualidad uno de los frutos más importantes debido a su gran producción y consumo per cápita, obteniendo grandes cantidades de residuos orgánicos de gran valor agregado que son desperdiciados y en el mejor de los casos son ocupados como parte de las compostas ó alimento para el ganado. De estos residuos considerados agroindustriales se pueden obtener materiales como el albedo (parte blanca de la cáscara) y la cáscara, siendo éstas una fuente importante de carbohidratos que aportan beneficios a la salud.

Parte de los componentes (como la pectina) en la cáscara de naranja se les ha atribuido propiedades funcionales que pueden ser utilizados en el área alimentaria (Fernández-López y col., 2004). De igual modo, el albedo ha sido utilizado en la elaboración de productos cárnicos con la finalidad de mejorar las propiedades funcionales, mecánicas y hasta prebióticas (Aleson-Carbonell y col., 2005b; Saricoban y col., 2008).

El albedo es un tejido alto en fibra que se encuentra en diversas frutas cítricas, es de color blanco y esponjoso localizado en la cáscara. Este material puede ser considerado como ingrediente funcional debido al contenido de fibra (30%, aproximadamente) aunado al porcentaje aproximado de humedad y cenizas (70 y 3 %, respectivamente), los cuales pueden variar de acuerdo a la especie. El albedo de cítricos además de tener propiedades nutricionales, beneficia la textura

en productos alimenticios (Aleson-Carbonell y col., 2005a). El albedo contiene componentes como la pectina que favorece la capacidad de retención de agua, siendo una alternativa en la aplicación de alimentos funcionales (Schoder y col., 2004).

La utilización de cereales (tales como trigo y avena) y fibras de frutos (como manzana, durazno y naranja) en concentraciones de 1.5 y 3% respectivamente, han sido alternativas para la sustitución de grasa en embutidos fermentados reducidos en grasa (García y col., 2002). Obteniendo buenos resultados con aquellas formulaciones con 1.5% de fibra de naranja y 10% de grasa.

Cáceres y col. (2004) reportaron buena aceptación en salchichas cocidas elaboradas con fibra dietética soluble como sustituto de grasa, mejorando además características como color y textura sin afectar de manera significativa la apariencia de estos productos.

En el área de lácteos se han realizado estudios incorporando fibra funcional (almidón resistente) y/o inulina en la elaboración de queso y yogurt bajo en grasa, reportando que es viable la utilización de fibra como mimetizador de los efectos producidos al disminuir el contenido de grasa en la formulación, ya que gracias a la funcionalidad de estos ingredientes se logran características fisicoquímicas y tecnológicamente similares a los productos comerciales sin afectar la apariencia, conservación y microestructura de éstos productos (Hennelly y col., 2006; Kip y col., 2006; Noronha y col., 2007).

Fernández-Ginés y col. (2004) estudiaron el efecto de la adición de albedo de limón en salchichas a diferentes concentraciones (0, 2.5, 5, 7.5 y 10%), reportando que la incorporación de un ingrediente funcional mejora las propiedades nutricionales al disminuir los niveles de nitritos formados en la salchicha por razones de manufactura, concluyendo ser una alternativa para disminuir un compuesto que genera problemas de salud, como son los nitritos.

Fernández-López y col. (2004) mencionan que la efectividad de subproductos cítricos en productos cárnicos es evidente dadas las propiedades que estos ingredientes contienen, como los son algunos compuestos bioactivos sin descartar el contenido de fibra dietética, logrando posicionarse dentro de los compuestos con carácter prebiótico.

Aleson-Carbonell y col. (2005b) incorporaron albedo de limón en la elaboración de productos cárnicos encontrando una mejora en las propiedades de textura en relación a muestras control, observando además una influencia sobre la oxidación lipídica y pH del producto, considerándolo un ingrediente potencial para la elaboración de estos productos.

Fernández-López y col. (2008) evaluaron los perfiles microbiológicos y fisicoquímicos de salchichas fermentadas enriquecidas con diferentes concentraciones de fibra de naranja (0, 1 y 2%), reportando un aumento en la cuenta de bacterias ácido lácticas al igual que una disminución del pH durante la fermentación, argumentando ser una opción viable para elaborar productos saludables y de calidad.

Saricoban y col. (2008) realizaron estudios acerca de la influencia del albedo de limón sobre las características de un sistema de emulsión cárnico, señalando que la adición de albedo incrementa la capacidad de emulsión así como su estabilidad, logrando tener un sistema estable que proporcione propiedades funcionales y tecnológicas a productos emulsionados como las salchichas.

2.3 Bacterias Ácido Lácticas

2.3.1 Características

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram positivos, normalmente inmóviles y no esporuladas, producen ácido láctico y algunos otros metabolitos (Parés y Juárez, 1997; Axelsson, 1998). Todas las BAL crecen aeróbicamente, a diferencia de algunos microorganismos anaerobios, la mayoría

no son sensibles al O₂ y por lo tanto pueden crecer tanto en presencia como en ausencia del mismo, siendo así anaerobios aerotolerantes. Son microorganismos con una limitada capacidad biosintética. Como carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones por ende reciben energía por fosforilación a nivel sustrato, siendo de esta manera que obtienen la energía por fermentación (Ingram, 1975).

En preparaciones al microscopio aparecen aisladas o formando cadenas de cocos o de bacilos, forman pequeñas colonias nunca pigmentadas y poseen gran tolerancia a la acidez (Madigan y col., 1998). Son denominadas como bacterias ácido lácticas debido a que la mayoría de sus miembros tiene como producto final el ácido láctico durante la metabolización de carbohidratos.

Normalmente son benignas e incluso necesarias, habitan en el cuerpo humano y el de otros animales (Prescott y col., 2000). Requieren de un ambiente rico en nutrientes para reproducirse basado en carbohidratos, aminoácidos, péptidos, sales y vitaminas (Carr y col., 2002).

De acuerdo con una revisión taxonómica de este grupo de bacterias se encuentran los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, sin embargo, los géneros más representativos que forman la parte central de este grupo de bacterias son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (Axelsson, 1998). La clasificación de las bacterias ácido lácticas está basada de acuerdo a su morfología, crecimiento a diferentes temperaturas, adaptación a diferentes concentraciones de sal, tolerancia a condiciones ácidas y sobre todo a sus diferencias entre los tipos de fermentación de azúcares.

En la tabla 1 se observa la morfología y otras características que permiten determinar cada uno de los cinco géneros más representativos de la bacterias ácido lácticas.

Tabla 1. Características distintivas de los cinco géneros de bacterias ácido lácticas (Silliker y Elliott, 1980).

Género	Fermentación	Catalasa	Forma
<i>Streptococcus</i>	Homoláctica	-	Cocos en cadenas o parejas
<i>Leuconostoc</i>	Heteroláctica	-	Cocos en cadenas o parejas
<i>Pediococcus</i>	Homoláctica	-	Cocos en tétradas
<i>Aerococcus</i>	Homoláctica	± (pseudocatalasa si la reacción es positiva)	Cocos en tétradas
<i>Lactobacillus</i>	Homo ó heteroláctico	-	Bacilos usualmente en cadenas

Las bacterias ácido lácticas son asociadas a hábitats ricos en nutrientes como puede ser la carne, leche y vegetales. El crecimiento de estas bacterias depende de las condiciones del ambiente como lo son la temperatura, pH, Aw, y moléculas necesarias para el metabolismo de la célula y desarrollo de sus estructuras (Leroy y Vuyst, 2001). Debido a que requieren medios nutritivos complejos para su desarrollo, en el laboratorio es necesario emplear medios especiales como agar sangre, de Etwars ó el de Man-Rogosa-Sharpe (MRS), éste último es un medio comercial que fue desarrollado especialmente para el cultivo de bacterias ácido lácticas (de Man y col., 1960). Uno de los ingredientes importantes dentro de estos medios es la presencia de azúcares y otros compuestos naturales para el aislamiento e inhibición de otros microorganismos no deseables.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes dando lugar a productos estables y relativamente seguros (Reyes-Menéndez, 2005). La estabilidad de estos productos ha sido atribuida a la conversión de azúcares en ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina ó bacteriocinas dependiendo del patrón fermentativo

(homofermentativo ó heterofermentativo), lo cual ha sido importante para desarrollar una acción antimicrobiana por el efecto de estos metabolitos en combinación con un descenso del pH y al consumo de carbohidratos (Hugas, 1998). En conjunto con los metabolitos ya mencionados, existen otros en menor proporción pero no menos importantes, ya que tienen un espectro de inhibición que abarca microorganismos fúngicos que son inhibidos tanto por ácidos grasos, péptidos cíclicos y ácidos como el fenil-láctico (Schnûrer y Magnusson, 2005).

2.3.2 Termotolerancia de bacterias ácido lácticas

Durante la elaboración de embutidos, éstos son sometidos a un cocimiento de manera que la temperatura interna del producto alcanza una temperatura de 72 °C (temperatura de pasteurización) necesaria para eliminar un gran porcentaje de microorganismos patógenos y alterantes.

En la conservación de batidos cárnicos, los microorganismos responsables (bacterias ácido lácticas) que son incorporados para realizar esta acción deben mantener resistencia a la temperatura a la cual se somete el sistema donde residen. Por otro lado, durante el crecimiento de los microorganismos se generan diversos metabolitos que podrían disminuir el pH del entorno afectando su capacidad de resistir temperaturas elevadas como la de pasteurización (O'Bryan y col., 2006; Splittstoesser y col., 1975; Palop y col., 1996). El efecto de la temperatura sobre la estructura superficial de los microorganismos suele ser irreversible causando la muerte instantánea de éstos, debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas transportadoras de la membrana celular, particularmente la membrana plasmática (Weitzel y col., 1987), en conjunto con la desintegración de la capa lipídica de la membrana externa celular. Cuando la temperatura excede el rango de estabilidad fisiológico de la célula, la membrana plasmática se vuelve más fluida provocando la fuga de iones de la célula afectando la integridad de la célula. Además, el agua que se encuentra en contacto con las proteínas de la célula puede ser un factor para la inactivación de

la célula a temperaturas elevadas, debido a que el calor provoca vibración de las moléculas de agua lo que ocasiona rompimiento de enlaces disulfuro y puentes de hidrogeno dentro de la célula dañando la estructura tridimensional de las proteínas (Earnshaw y col., 1995).

Se ha demostrado que la termotolerancia de los microorganismos aumenta de manera que disminuye la cantidad de agua en su hábitat (Corry, 1973) y en el interior de las células con un A_w por debajo de 0.7 unidades (Laroche y col., 2005). Además, la concentración de sal y azúcar también favorece la resistencia al calor de los microorganismos (Mañas y col., 2001; Splittstoesser y col., 1975). Pepler (1942) demostró que la resistencia al calor de algunos microorganismos (*Streptococcus thermophilus*) se ve favorecida al contacto con bacterias que disminuyeran el pH del medio, junto con la adición de peptonas y extracto de malta. La prolongada exposición a temperaturas relativamente altas, puede ser un factor que promueva la termotolerancia de las bacterias (Franz y von Holy, 1996), o bien, si son sometidas a una serie de choques térmicos favoreciendo adaptación al medio (Milbourne, 1983).

Existen algunas biomoléculas que favorecen a algunos microorganismos que son afectados en su conformación externa celular a causa de la temperatura, se trata de proteínas que se sintetizan en condiciones de estrés como altas temperaturas ó presencia de agentes químicos, denominadas chaperonas moleculares. Estas chaperonas moleculares facilitan a un mejor plegamiento de el polipéptido producido, protegiendo a la célula de agentes dañinos, de tal manera que son llamadas proteínas de choque térmico, las cuales son sintetizadas por la célula y son adheridas al péptido recién sintetizado para ayudar a un mejor plegamiento de éste y ser resistente a condiciones de estrés térmico (Prescott, 2000).

Durante la exposición a situaciones extremas como la temperatura, la célula disminuye la incorporación de Na_2CO_3 en las proteínas de su pared celular, al mismo tiempo se generan subgrupos específicos para la formación de proteínas de choque térmico dándole protección a la célula (Jerez, 1988).

Victoria-León y col. (2006) estudiaron el efecto de temperaturas elevadas sobre 8 cepas comerciales de bacterias lácticas, ellos encontraron que solo 4 pudieron resistir temperaturas de 70°C durante 30 minutos, a estas cepas se les llamó termoresistentes, las cepas identificadas fueron *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus piscicola* y *Enterococcus spp.* Posteriormente estas cepas se inocularon en un producto cárnico cocido para ver su efecto sobre las propiedades sensoriales del producto. De las cuatro cepas solo *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus lactis* mostraron características sensoriales similares o mejores que el control, las 4 cepas mostraron una disminución en el número de enterobacterias durante los 15 días de estudio, ellos concluyeron que las bacterias lácticas termoresistentes podrían ocuparse en embutidos cocidos para aumentar la vida de anaquel del producto mejorando las características sensoriales del mismo.

Pérez-Chabela y col. (2008) aislaron e identificaron bacterias lácticas termotolerantes y las inocularon en un embutido cocido para ver su efecto sobre color, textura y conteo de enterobacterias. Cuatro cepas mostraron resistencia al calor a 70°C durante 30 minutos, las cepas identificadas fueron: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilacti*, ninguna de las cepas mostró cambios respecto a color, en textura *Lactobacillus curvatus* mostró una salchicha más blanda lo cual fue percibido también en la evaluación, por lo que tuvo resultados desfavorables, sin embargo, las 4 cepas mostraron reducción de enterobacterias después de 12 días de almacenamiento.

Ramírez-Chavarín y col. (2010) aislaron e identificaron bacterias lácticas resistentes al calor. Ellos encontraron valores $D_{75^{\circ}\text{C}} = 4.0$ min con lo cual concluyeron que estas cepas eran termotolerantes. Los géneros identificados fueron *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus* y *Enterococcus*.

2.3.3 Probióticos

El concepto de probiótico ha sobresalido en distintos sectores principalmente en la industria alimenticia. Con el avance en la investigaciones se han llegado a considerar ciertos aspectos para que un microorganismo sea considerado como probiótico, los aspectos son principalmente: resistencia al tracto gastrointestinal, considerando el pH bajo a causa de los ácidos presentes especialmente la bilis; adhesión a las células epiteliales intestinales; estabilización de la microflora intestinal; no ser patógenas; estabilidad en el proceso de los alimentos y óptima proliferación y colonización en el intestino por un periodo largo (Fuller, 1989).

Hacia 1970 un microorganismo probiótico se definía como un microorganismo que se utiliza como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés. Desde entonces, esta definición ha evolucionado notablemente, de modo que hoy se define como: un microorganismo vivo que se introduce en la dieta, y que tras ser ingerido en cantidad suficiente ejerce un efecto positivo a la salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales (Reid, 2008).

Los probióticos no son géneros ó especies, son simplemente tipos de bacterias que proveen de un beneficio específico. Las bacterias ácido lácticas son las mayores representantes de los probióticos tanto en el área de alimentos como el farmacéutico. Además están asociadas a varios hábitats, particularmente aquellos ricos en nutrientes que puedan fermentar como lo es el tracto gastrointestinal, debido a eso son consideradas probióticos a su vez por la cantidad de propiedades que aportan: beneficios nutricionales, producción de vitaminas, producción de importantes enzimas digestivas (β -galactosidasa), efectos de barrera contra infecciones intestinales, disminución de colesterol y mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica (Holzapfel y Schillinger, 2002).

Un factor importante en la selección de cepas con efecto probiótico es su habilidad para sobrevivir a condiciones de ambientes ácidos (*in vitro*) y condiciones adversas del tracto gastrointestinal (*in vivo*). La supervivencia de las bacterias

probióticas *in vitro* podría ser influenciada por la formación de metabolitos por los cultivos iniciadores como lo es el ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Saarela y col., 2000). Aunque existen diferencias entre especies y cepas específicas, los lactobacilos son considerados generalmente como intrínsecamente resistentes (Jin y col., 1998). Existen algunas bacterias de este género como *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* que aparentan tener una vida media más larga en comparación con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus reuteri* (Lee y Salminen, 1995). Otro de los aspectos que favorece la permanencia de ciertas bacterias probióticas (como *Bifidobacterium*) y colonizar el colon en condiciones de elevada acidez, es la presencia de secuencias para numerosos genes de el cromosoma que codifican para numerosas enzimas con actividad glicosil-hidrolasas que participan en la degradación de oligosacáridos (Schell y col., 2002).

Se sabe poco del efecto de los probióticos sobre el sistema inmune. Las primeras experiencias indican que en niños tratados con *Lactobacillus casei* la cantidad de Iga circulante es más elevada que en los no tratados y que su respuesta ante infecciones del tracto digestivo es mucho mejor. De igual forma, los alimentos enriquecidos con *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* aumentan la actividad de los granulos circulares (Hoerr y Bostwick, 2000).

Dentro de las bacterias presentes en el intestino con carácter anaerobio y que más usan los prebióticos, se encuentran la de los géneros *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*. Además, se ha comprobado que las *Bifidobacterias* inhiben el crecimiento de bacterias alterantes (*Clostridium perfringens*) y patógenas (*E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *Shigella*) (Grizart y Barhomeuf, 1999; Mussatto y Mancilha, 2007).

Algunos estudios mostraron que algunas bacterias lácticas con carácter probiótico mostraron actividad antagónica principalmente contra microorganismos del género *Pseudomonas* aunado a la producción de ácido láctico lo cual favorecería la

disminución de microflora patógena en productos cárnicos (Ramírez-Chavarín, y col., 2009).

3 Justificación

Actualmente el desarrollo de alimentos funcionales ha ido en aumento mediante el aporte de sustancias que favorecen la disminución de padecimientos de origen alimenticio.

En el estudio de los alimentos, se han desarrollado mecanismos de defensa contra microorganismos patógenos que aquejan el buen funcionamiento del sistema digestivo mediante la proliferación de bacterias con propiedades probióticas, las cuales deben permanecer y colonizar el aparato digestivo para lograr su función. Los probióticos necesitan de óptimas condiciones para poder colonizar el sistema digestivo, para lo cual, se han empleado ingredientes no-digeribles de composición hidrocarbonada como fuente de carbono alterna para lograr su objetivo, llamados prebióticos. Existen diversas fuentes de estos ingredientes prebióticos, destacando la función de la inulina al igual que otros sub-productos naturales. La naranja es un fruto del cual se pueden obtener beneficios de sus residuos, tal es el caso de la cáscara donde se obtiene el albedo, un residuo con gran cantidad de carbohidratos que puede ser aprovechado por sus propiedades funcionales y nutricionales en la formulación de productos alimenticios. Así, este trabajo pretende evaluar la capacidad prebiótica de la inulina y el albedo de naranja sobre bacterias lácticas probióticas termotolerantes, para favorecer el desarrollo de estos microorganismos importantes para la salud humana.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad prebiótica de la inulina de agave, inulina de achicoria y albedo de naranja sobre bacterias lácticas probióticas termotolerantes.

4.2 Objetivos Particulares.

Evaluar las características fisicoquímicas de la inulina de agave, inulina de achicoria y el albedo de naranja.

Conocer la calidad microbiológica de la inulina de agave, de achicoria y el albedo de naranja.

Evaluar el efecto prebiótico del albedo de naranja y la inulina de achicoria y agave a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 % p/v) sobre bacterias lácticas termotolerantes.

Determinar el contenido de ácidos grasos de cadena corta producidos durante la fermentación de oligosacáridos por parte de bacterias probióticas.

5 Hipótesis

Se espera que el contenido de oligosacáridos dentro de la composición del albedo de naranja e inulina (agave y achicoria) estimulen el crecimiento de bacterias lácticas termotolerantes (probióticas), así como la producción de ácidos orgánicos como índice de metabolización de ingredientes alternos de fuente de carbono.

6 Materiales y Métodos

Este trabajo se dividió en 2 partes: en la primera parte se obtuvo el albedo de naranja como un sub producto del fruto (Figura 3), después se realizaron los análisis bromatológicos (humedad, proteína total, pH, cenizas, grasa y fibra soluble, insoluble y total) y microbiológicos (enterobacterias, cuenta total, hongos y levaduras) de la inulina de agave, inulina de achicoria (inulinas comerciales: Nano Nutrition, S. de R. L. de C. V.; Naucalpan, Edo. de México) y albedo de naranja (Figura 4). En la segunda parte se determinó la capacidad prebiótica de inulina de agave, inulina de achicoria y albedo de naranja usando bacterias ácido lácticas. Las cepas utilizadas fueron: *Pediococcus pentosaceus* y *Aerococcus viridans*, las cuales se sometieron a un proceso de fermentación para determinar la capacidad de utilización de distintas fuentes de carbono a diferentes concentraciones, así como la producción de ácidos grasos de cadena corta producto de la metabolización de dichos sustratos (Figura 5).

Primera parte

6.1 Preparación del albedo de naranja.

El albedo de naranja (parte blanca y esponjosa de la cáscara) se obtuvo de cáscaras de naranjas maduras obtenidas en un establecimiento comercial. Se eliminó la limolina con una solución de NaCl (15%) (95°C/30 min) de acuerdo a la metodología propuesta por Durán-Mendoza y col. (2008). Posteriormente se secó el residuo a 60°C/24 h. Después se trituró en un procesador de alimentos y se tamizó con una malla de 0.25 mm de diámetro de partícula. Por último, se empacó al vacío y almacenó a temperatura ambiente en un área seca y sin luz hasta la realización de los análisis correspondientes.

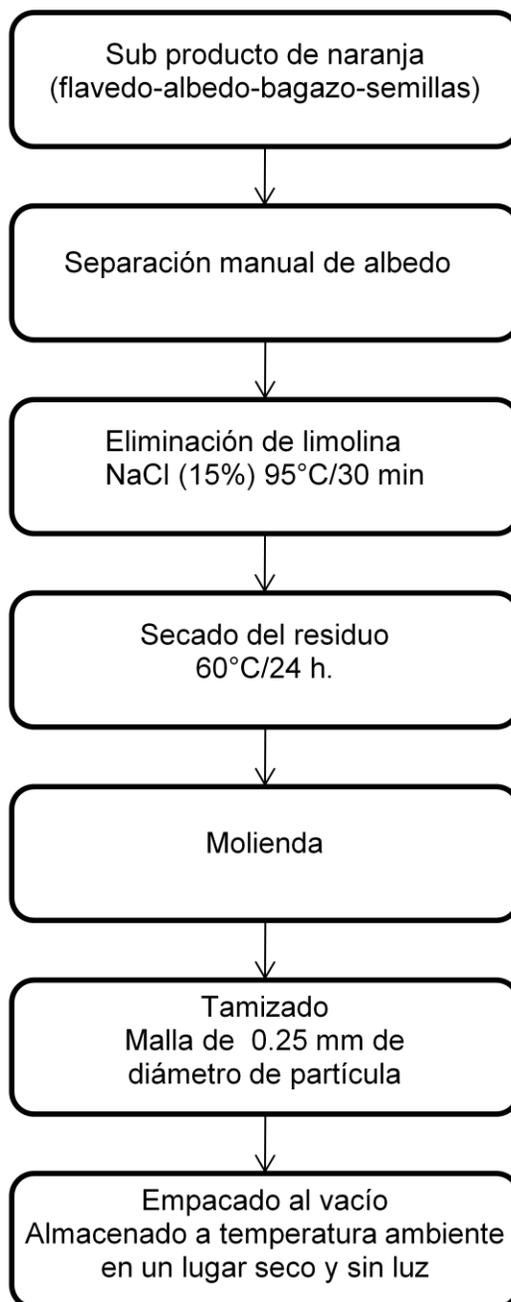


Figura 3. Proceso de obtención del albedo de naranja.

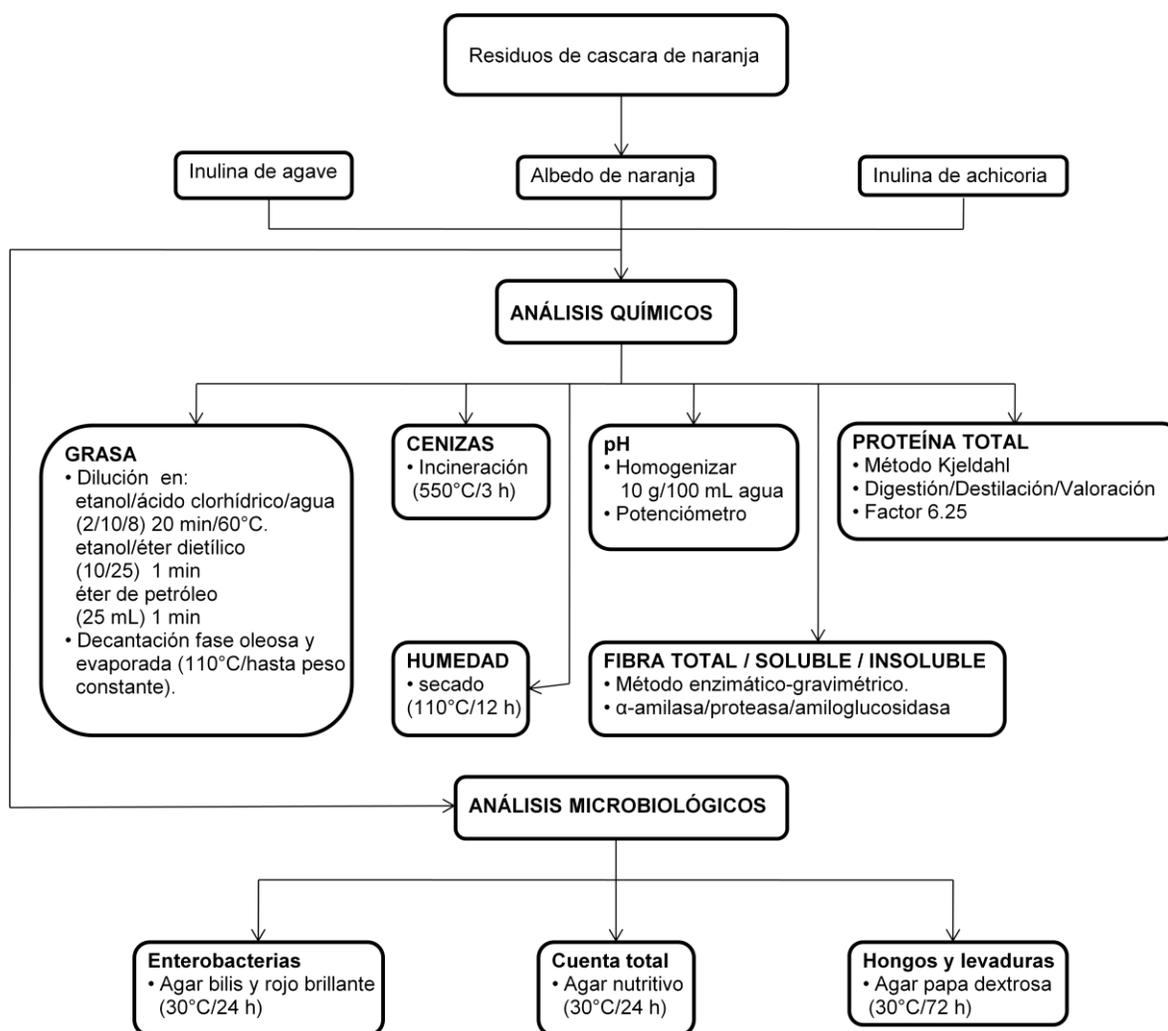


Figura 4. Diagrama de flujo de análisis químico y microbiológico de albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria.

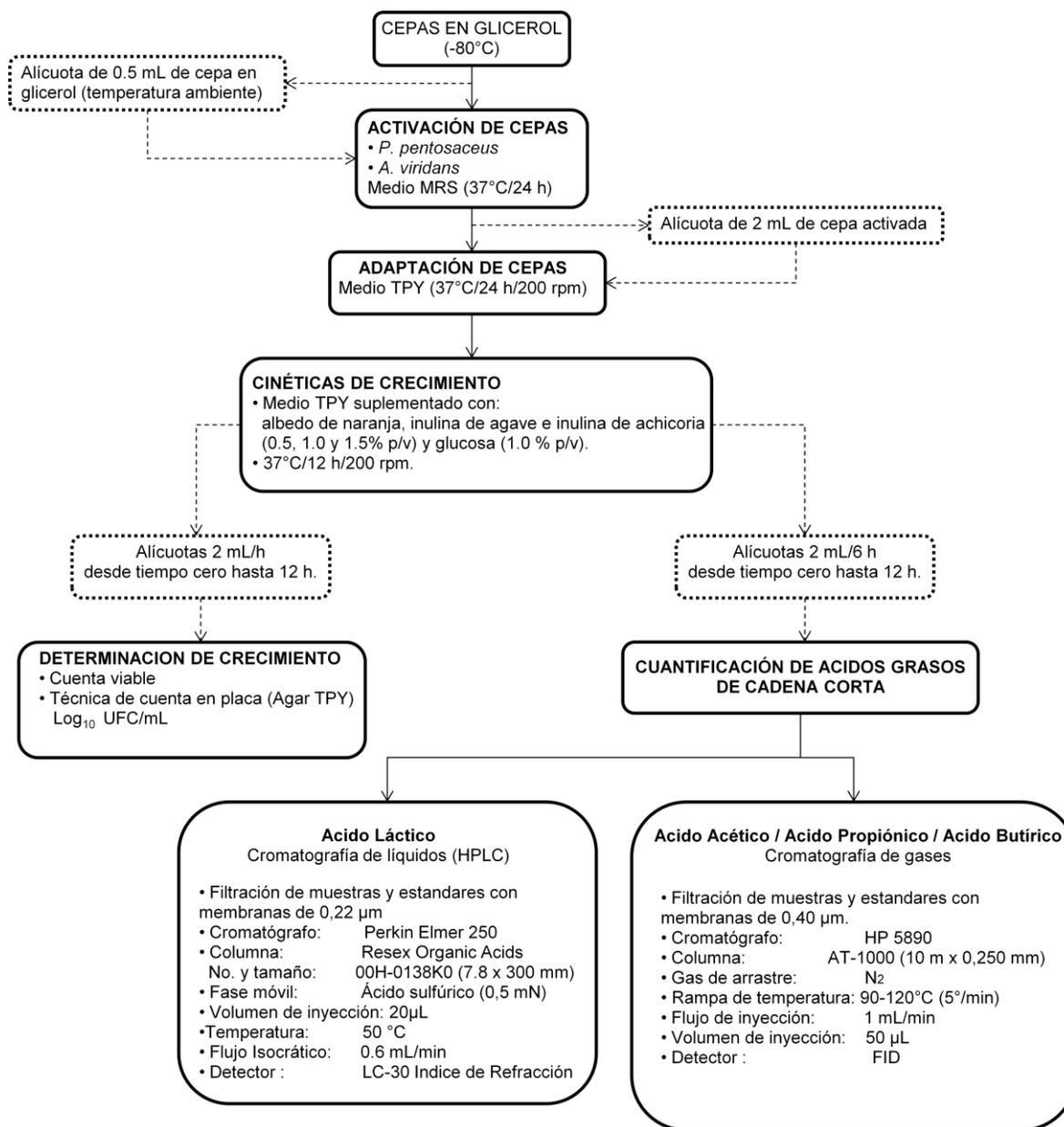


Figura 5. Proceso de fermentación y análisis cromatográfico de metabolitos de cepas ácido lácticas con diferentes fuentes de carbono.

6.2 Análisis Bromatológicos

6.2.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó de acuerdo al método oficial de prueba No. 950.46 de la A.O.A.C (1996). Se colocaron 2 g de muestra en cápsulas de aluminio a peso constante y se colocaron en una estufa a una temperatura de 110°C durante 12 h. Después de este tiempo se retiraron las muestras de la estufa y se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de peso.

6.2.2 Contenido de proteína total

El contenido de proteína se determinó por el método de Kjeldahl de acuerdo al método oficial de prueba No. 960.52 (AOAC, 1996). Se colocaron 2 g de muestra en los tubos digestores, más los reactivos (0.42 g de CuSO_4 , 9 g de KSO_4 y 15 mL de H_2SO_4 concentrado), las muestras se digirieron hasta que se alcanzó un color verde claro, para después dejarlos enfriar por 2 h. Posteriormente se destilaron las muestras digeridas en un destilador Labconco Rapidstill I (Labconco Corporation, Kansas City, Missouri), recibiendo el destilado en 100 mL de solución de ácido bórico al 20% hasta recolectar 250 mL de destilado. Finalmente se tituló el destilado con una solución valorada de H_2SO_4 al 0.2N.

El porcentaje de proteína total se calculó de la siguiente ecuación, convirtiendo a proteína multiplicando el resultado por 6.25, de acuerdo a:

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(\text{mL } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados} - \text{mL blanco})(\text{N } \text{H}_2\text{SO}_4)(1.4007)}{\text{g de muestra}}$$

6.2.3 Determinación de pH

Se utilizó la metodología de acuerdo al método oficial de prueba del AOAC (1996), donde se homogenizaron 10 g de muestra con 100 mL de agua destilada, posteriormente se midió el pH de la mezcla homogénea con un potenciómetro Beckman (Beckman Instruments, Palo Alto, California).

6.2.4 Determinación de cenizas

El porcentaje de cenizas se determinó de acuerdo al método oficial de prueba del AOAC (1996). Se colocaron a peso constante los crisoles y se dejaron enfriar por 15 min. para después registrar su peso en una balanza analítica. Se agregaron 2 g de muestra en los crisoles y se pre incineraron exponiéndola a la flama de un mechero. Una vez hecho lo anterior, las muestras se colocaron a una mufla a una temperatura de 500 °C por 3 h. Se sacaron los crisoles y se colocaron en un desecador para que la muestra lograra una temperatura ambiente, por último se pesaron las muestras y se determino el porcentaje de cenizas por diferencia de peso.

6.2.5 Determinación de grasa

Se determinó el contenido de grasa de acuerdo al método oficial de prueba de la AOAC (1996). Se pesaron 2 g de muestra adicionando 2 mL de alcohol al 95%, 10 mL de ácido clorhídrico concentrado y 8 mL de agua destilada, se colocó toda la solución en un frasco y se colocó en un baño maría a 60 °C durante 20 min; se dejó enfriar para después obtener la grasa separada del solvente, se adicionaron 10 mL de alcohol, 25 mL de éter dietílico y se agitó durante 1 min. Después se adicionaron 25 mL de éter de petróleo y se agitó durante 1 min, hasta que la grasa se separó por decantación en un frasco, el cual se dejó en una campana de extracción. Una vez evaporados se colocaron en una estufa a una temperatura de 110 °C y se pesaron cada hora hasta obtener un peso constante.

6.3 Análisis microbiológicos.

Para el análisis microbiológico las muestras fueron disueltas en agua, para el albedo e inulina se disolvieron 10 g de muestra en 100 mL de agua destilada y se hicieron diluciones sucesivas hasta 10^{-4} . Una vez preparadas las muestras se inocularon 0.1 mL de muestra para determinar el crecimiento de enterobacterias, cuenta total, hongos y levaduras en las muestras, por lo que el medio de cultivo utilizado en cada caso fueron: agar bilis y rojo brillante, agar nutritivo y agar papa dextrosa, respectivamente. Se incubaron a 30°C durante 24 h, para el caso de hongos y levaduras se incubaron durante 48 h. Posteriormente se realizó el conteo de colonias (Harrigan, 1998).

Segunda parte

6.4 Proceso de fermentación

Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por Bustamante y col. (2006).

6.4.1 Activación de cepas

Las cepas utilizadas fueron *Pediococcus pentosaceus* y *Aerococcus viridans*, aisladas e identificadas previamente de productos cárnicos cocidos mexicanos (Ramírez-Chavarrín y col., 2010) estando estas en glicerol (-80 °C). Se tomó una alícuota de 0.5 mL de cada cepa en glicerol y se activaron en caldo MRS a 37 °C durante 12 h.

6.4.2 Adaptación de cepas y preparación del inóculo

Una vez que las cepas fueron activadas, se realizó la adaptación de las mismas en medios de cultivo TPY (triptona-fitona-extracto de levadura) (pH 6.5), tomando una alícuota de 1 mL del tubo de activación y pasándolo al tubo de adaptación. Las condiciones de adaptación fueron a 37°C durante 12 h. Los inóculos se

prepararon al transferir al medio nuevo de TPY 2 mL de los tubos de activación y se incubaron a 37°C durante 12 h y 200 rpm.

6.4.3 Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron en medio TPY, suplementando con 0.5, 1.0 y 1.5 % (p/v) de albedo de naranja, inulina de achicoria, inulina de agave ó glucosa usado como control, inoculando con 3 log₁₀ UFC/mL del cultivo de adaptación se incubaron a 37°C y 200 rpm, se tomaron 2 mL de muestra para la determinación del crecimiento bacteriano y 2 mL para determinar la producción de ácidos orgánicos, lo cual se realizó a partir del tiempo cero hasta completar 12 h de fermentación con intervalos de una hora.

6.4.3.1 Crecimiento bacteriano

El crecimiento de las bacterias se determinó realizando la técnica de cuenta viable en placas de agar TPY, incubando a 37°C durante 24 horas. Los valores de cuenta viable (UFC/mL) se determinaron con base a curvas estándar previamente elaboradas para cada cepa. La tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación fueron determinadas como medidas de la capacidad de adaptación que presentan las bacterias a los medios de cultivo.

6.5 Determinación de ácidos grasos de cadena corta

El análisis de ácidos grasos de cadena corta producidos durante la fermentación se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Manderson y col. (2005) con algunas modificaciones para este estudio. Para el análisis del ácido láctico se utilizó cromatografía de líquidos (HPLC), además de una curva estándar del mismo compuesto para su identificación y cuantificación. Para el análisis del ácido acético, propiónico y butírico se llevó a cabo mediante cromatografía de gases utilizando también curvas estándar para la identificación y cuantificación. Se siguieron los siguientes parámetros y condiciones de operación durante el análisis (Tabla 2):

Tabla 2. Parámetros y condiciones de operación de análisis de ácidos orgánicos de cadena corta.

Parámetros	Cromatografía de líquidos (HPLC)	Cromatografía de gases
Cromatógrafo	Perkin Elmer 250	HP 5890
Columna	Organic Acids (7.8 x 300 mm) PI/No: 00H-0138K0	AT-1000 (10m x 0,250 mm)
Detector	Índice de refracción	Ionización de flama
Fase móvil	Acido sulfúrico (0,5 mN)	-----
Gas de arrastre	-----	N ₂
Volumen de inyección	20 µL	50 µL
Temperatura	50 °C	(rampa de temperatura) 90 – 120 °C (5°/min)
Flujo	0.6 mL/min	1 mL/min

7 Diseño experimental y análisis estadístico

El desarrollo experimental se llevará a cabo mediante un diseño factorial de tres factores (tipo de cepa, tipo y porcentaje de inóculo), el modelo a utilizar según Montgomery (2006), fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

- Y_{ijk} = es la variable respuesta al i-ésimo nivel de tipo de cepa para el j-ésimo nivel de tipo de prebiótico y al k-ésimo nivel de porcentaje de inóculo;
- μ = es la media global del modelo;

- α_i , β_j , y γ_k = son el efecto por los factores principales para el tipo de cepa, tipo de fuente de carbono y porcentaje de fuente de carbono, respectivamente; y ,
- ϵ_{ijk} = es el error experimental.

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa SPSS para Windows Versión 15.

La diferencia entre medias en la determinación de los parámetros fisicoquímicos se llevó a cabo mediante un análisis de medias de Duncan del mismo paquete estadístico.

8 Resultados y Discusión

Primera parte

8.1 Análisis Bromatológico

La Tabla 3 muestra los resultados de la composición proximal para las diferentes inulinas analizadas (agave y achicoria) y del albedo de naranja. De acuerdo al análisis de medias se demuestra que existen valores estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) en la mayoría de los parámetros determinados para las diferentes fuentes de carbono analizadas a excepción de los parámetros de humedad y fibra total al presentar valores similares entre algunos de los compuestos analizados.

El contenido de humedad más alto lo presentó el albedo de naranja (4.72 %), sin encontrar diferencia entre las diferentes inulinas. La metodología para procesar la harina del albedo de naranja en relación a las inulinas, obtenidas ya en forma de harina, pudo haber marcado la diferencia en este parámetro aunado a la naturaleza del producto. El porcentaje de humedad obtenido difiere con lo publicado por Pérez (2008) y Rincón y col. (2005), donde de igual manera analizaron residuos de naranja reportando valores de 7.7 y 3.3 %, respectivamente.

Con respecto al pH, el valor más bajo lo presentó el albedo de naranja (4.28) lo cual era de esperarse debido a que este presenta un mayor porcentaje de ácido cítrico reflejándose en el resultado de esta determinación.

El contenido de cenizas más bajo lo presento la inulina de agave (0.15%), mientras que el albedo de naranja tuvo el mayor porcentaje con un 4.99%, siendo este último similar a lo reportado por Pérez (2008) y Rincón y col. (2005), con valores de 4.8 y 4.86 %, respectivamente.

Respecto al contenido de grasa, fue mucho mayor para el albedo de naranja (2.12%) siendo mayor que lo reportado por Pérez (2008) y Rincón y col. (2005), con valores de 0.0249 y 1.64 %, respectivamente. Tal diferencia puede ser debido

a la técnica realizada para la determinación de este compuesto, así como la especie y grado de maduración de las naranjas.

El contenido de proteína fue mayor para la inulina de agave y menor para el albedo de naranja con valores de 1.02 y 0.58 %, respectivamente. Los valores presentados con el albedo de naranja son inferiores con respecto a lo reportado por la literatura (Pérez, 2008 y Rincón y col., 2005). El comportamiento de este parámetro puede ser debido a la naturaleza de la muestra, su estado de maduración y al contenido de glucoproteínas presentes en la pared celular primaria en donde estas forman estructuras con la celulosa (Carpita y Gibeaut, 1993).

Por último, el mayor contenido de fibra total se presentó con el albedo de naranja con 55.72% siendo un valor similar con lo reportado en la literatura (Pérez, 2008 y Rincón y col., 2005). Estos resultados son probablemente a que la naranja presenta celulosa, hemicelulosa y lignina dentro de su composición, siendo estos compuestos una fuente de fibra insoluble.

Tabla 3. Composición proximal de la diferentes inulinas (agave y achicoria) albedo de naranja. (g/100g).

	INULINA DE AGAVE	INULINA DE ACHICORIA	ALBEDO DE NARANJA
HUMEDAD	3.66 ^b ± 0.34	3.78 ^b ± 0.12	4.72 ^a ± 0.42
pH	6.44 ^a ± 0.65	5.13 ^b ± 0.25	4.28 ^c ± 0.19
CENIZAS	0.15 ^c ± 0.02	0.61 ^b ± 0.05	4.99 ^a ± 0.46
GRASA	1.96 ^c ± 0.11	1.33 ^b ± 0.12	2.12 ^a ± 0.20
PROTEINA	1.02 ^a ± 0.07	0.87 ^b ± 0.08	0.58 ^c ± 0.03
FIBRA TOTAL	33.16 ^b ± 2.26	31.19 ^b ± 1.53	55.72 ^a ± 2.96

^{a,b,c} Letras diferentes en una misma fila son significativamente diferentes (P<0.05).

8.2 Composición microbiológica de las inulinas (agave y achicoria) y albedo de naranja.

Los resultados de la composición microbiológica de las diferentes inulinas y albedo de naranja se muestran en la Tabla 4.

La presencia de hongos y levaduras estuvo presente en las tres muestras analizadas presentando valores más altos (3 log UFC/g) en el albedo de naranja, lo cual podría deberse al manejo y condiciones de proceso para llevarlo hasta harina, así como de las condiciones de almacenaje.

El crecimiento de coliformes totales solo fue presente en el albedo de naranja con una cuenta de 2 log UFC/g, probablemente a la cuenta inicial de coliformes en materia prima y contaminación durante el proceso de obtención del albedo.

Para el caso de la cuenta total, el albedo de naranja presentó los valores más altos con 3.77 log UFC/g sin haber diferencia entre las diferentes inulinas.

Tabla 4. Composición microbiológica de las diferentes inulinas (agave y achicoria) y del albedo de naranja. (Log UFC/ g)

	Hongos y levaduras	Enterobacterias	Cuenta total
INULINA DE AGAVE	2.47	AUSENTE	3.60
INULINA DE ACHICORIA	2.30	AUSENTE	3.60
ALBEDO DE NARANJA	3.00	2.00	3.77

El tratamiento térmico previo durante la obtención del albedo de naranja y las condiciones de almacenamiento de las inulinas probablemente provocó disminución en la microflora de alteración y patógena que pudo estar presente tanto en el albedo de naranja como en las diferentes inulinas, aunado a la baja humedad y biomoléculas disponibles.

Segunda parte

8.3 Curvas de crecimiento

La Figura 6 muestra las curvas de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* en medio TPY con diferentes concentraciones de albedo de naranja como fuente de carbono donde se observa una mejor adaptación de este microorganismo en albedo de naranja (1 % p/v) con respecto a glucosa observándose valores máximos de crecimiento de 8.6 y 7.6 (log UFC/mL), respectivamente; la fase exponencial inicia en la segunda hora del experimento en concentraciones de 0.5 y 1.5% (p/v) de albedo iniciando a la primera hora para el caso de albedo al 1.0%, manteniendo una fase estacionaria a partir de las siete horas del experimento para todos los casos. El pH fue similar para las tres concentraciones de albedo, observándose una tendencia en descenso a partir de la primera hora del experimento manteniendo este comportamiento hasta las ocho horas de fermentación, a partir de este punto se mantuvo constante registrando valores mínimos cercanos a 4.5 con una concentración de 1.5% (p/v) de albedo (Figura 7).

La Figura 8 muestra las curvas de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* en medio TPY con inulina de agave, observándose para las tres concentraciones una fase exponencial a partir de la segunda hora del experimento hasta la séptima hora donde inicia la etapa estacionaria, con niveles de 1.0 y 1.5% de inulina de agave presentaron una ligera disminución en el crecimiento a partir de las 10 horas de fermentación, sin embargo a una concentración de 1.0% de inulina de agave se observó una cuenta viable más elevada (7.9 log UFC/mL) aún con respecto al control.

El pH presentó un comportamiento en descenso para las tres concentraciones de inulina, observándose una mayor disminución al aumentar la concentración. Con niveles de 1.0 y 1.5% de inulina se obtuvieron los valores más bajos siendo estos cercanos a pH 4 aún con respecto al control, tal efecto puede deberse a la generación de ácidos orgánicos producto de la fermentación (Figura 9).

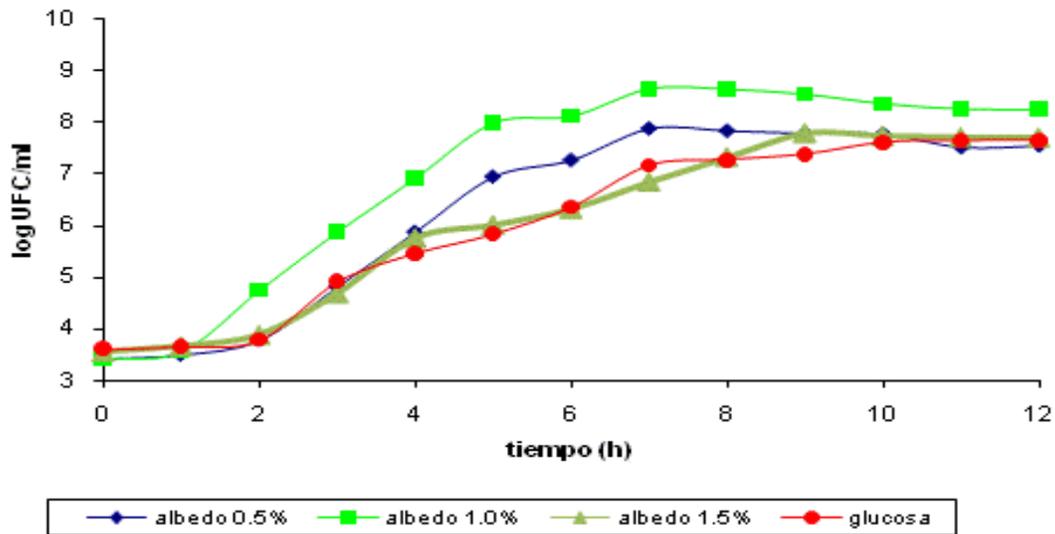


Figura 6. Cinéticas de crecimiento para *Pediococcus pentosaceus* con albedo de naranja como fuente de carbono.

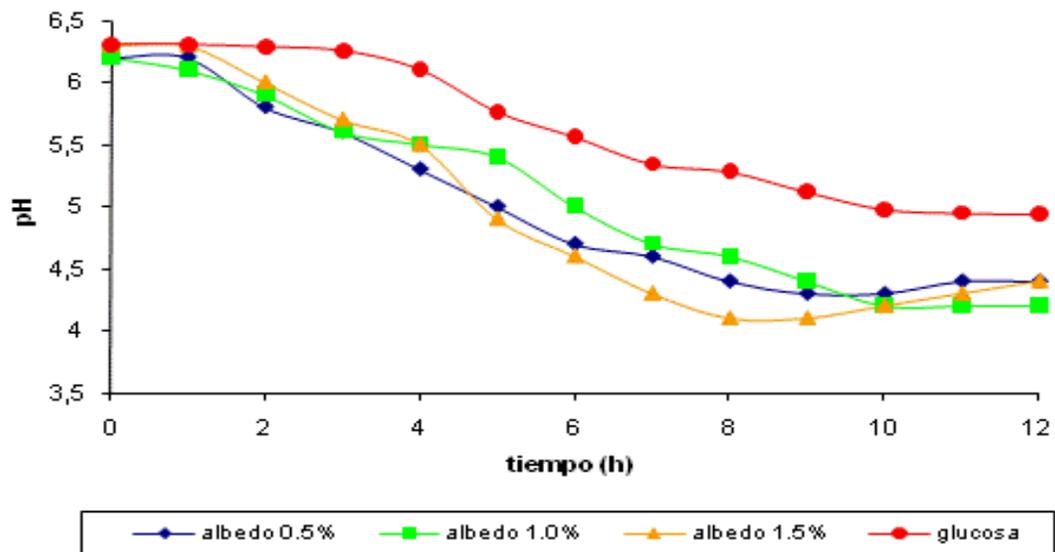


Figura 7. Comportamiento del pH para *Pediococcus pentosaceus* con albedo de naranja como fuente de carbono.

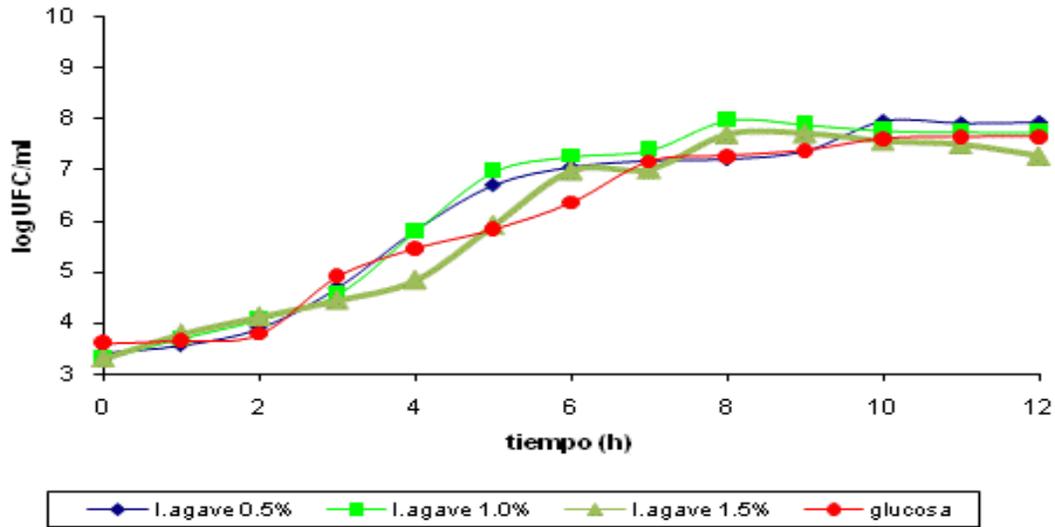


Figura 8. Cinéticas de crecimiento para *Pediococcus pentosaceus* con inulina de agave como fuente de carbono.

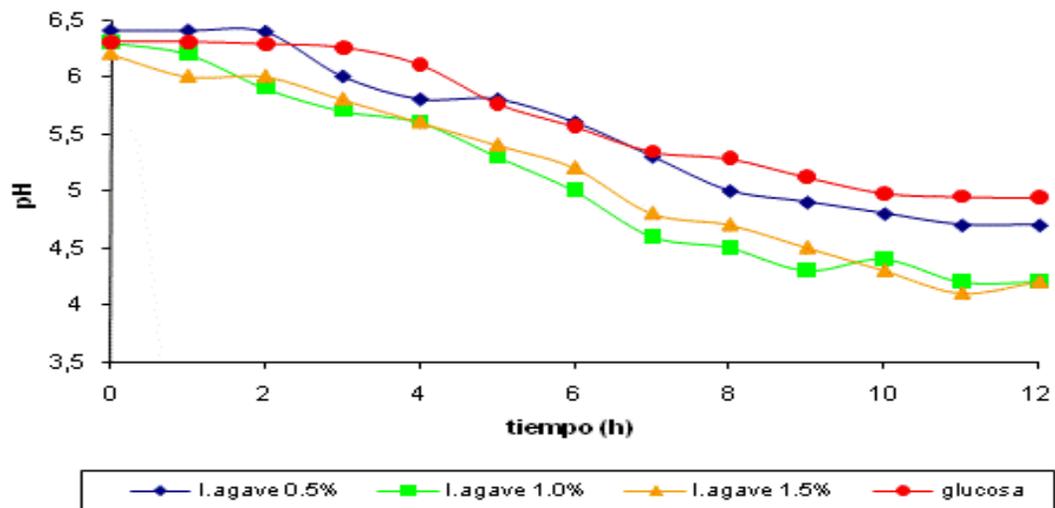


Figura 9. Comportamiento del pH para *Pediococcus pentosaceus* con inulina de agave como fuente de carbono.

La Figura 10 muestra las curvas de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* en medio TPY con diferentes concentraciones de inulina de achicoria como fuente de carbono observándose una adecuada adaptación de la bacteria al medio de cultivo, siendo el inicio de la fase exponencial a partir de la segunda hora del experimento, el comportamiento fue similar en las tres concentraciones de fuente de carbono, la fase estacionaria se inicio en la hora ocho del experimento manteniéndose en etapa estacionaria sin presentar etapa de decaimiento, sin embargo a cualquier concentración de fuente de carbono el máximo crecimiento fue similar que con glucosa (7.6 log UFC/mL).

El pH tuvo un comportamiento en descenso para las diferentes concentraciones de inulina de achicoria, conforme se aumentó el porcentaje de inulina disminuyó más el pH, sin embargo, los valores obtenidos se situaron por encima de lo reportado con glucosa con un valor cercano a 5 (Figura 11).

La Figura 12 muestra las curvas de crecimiento de *Aerococcus viridans* en medio TPY con albedo de naranja como fuente de carbono observándose una buena adaptación de la bacteria al medio, el inicio de la fase exponencial se observa a partir de la segunda hora del experimento para las tres concentraciones de albedo manteniéndose hasta la séptima hora donde inició la fase estacionaria. El aumento de la fuente de carbono de 0.5 a 1.0% provocó un retardo en el inicio de la fase exponencial para la bacteria, observándose además, una cuenta viable menor a un porcentaje de albedo de 1.5%, sin embargo, la cuenta viable final para las concentraciones de 0.5 y 1.0% de fuente de carbono estuvieron por encima de lo obtenido con el control (7.9, 8 y 7.6 log UFC/mL, respectivamente).

La Figura 13 muestra el comportamiento del pH para las diferentes concentraciones de albedo observándose una tendencia similar para los tres niveles de albedo presentándose un descenso de éste parámetro a partir de la cuarta hasta la sexta hora del experimento donde a partir de este punto se mantuvo constante finalizando en valores comprendidos entre 4 y 4.5 (1.0 y 1.5%

albedo, respectivamente), siendo menores estos niveles de pH en relación al control.

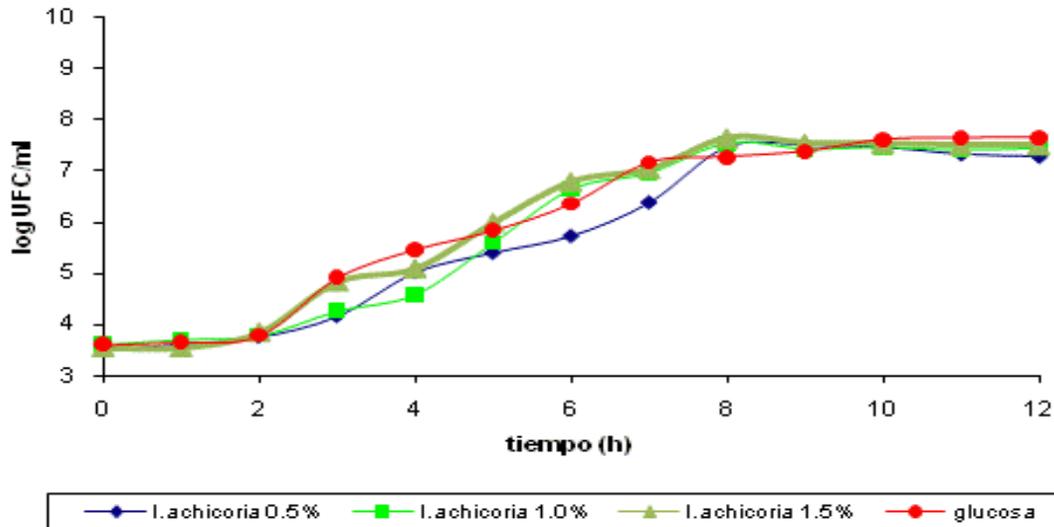


Figura 10. Cinéticas de crecimiento para *Pediococcus pentosaceus* con inulina de achicoria como fuente de carbono.

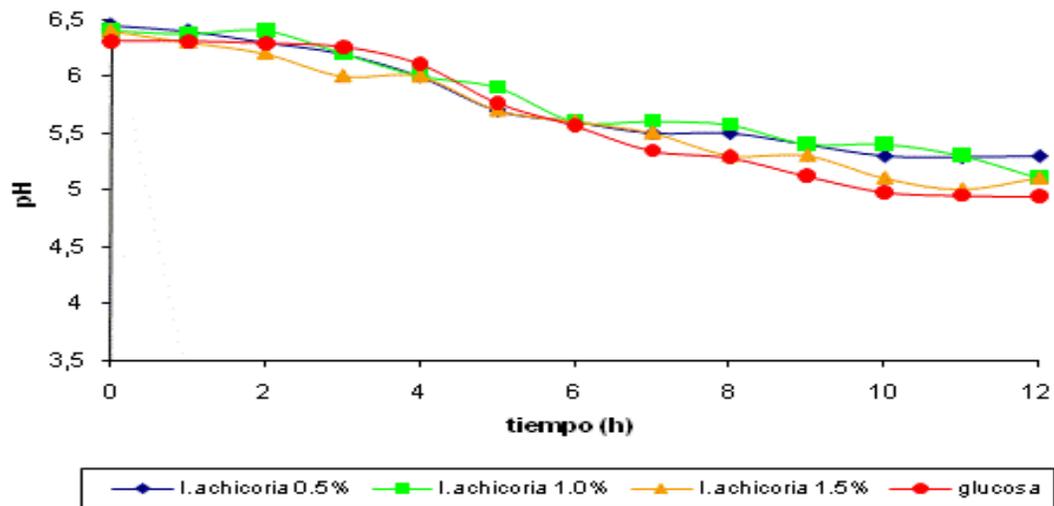


Figura 11. Comportamiento del pH para *Pediococcus pentosaceus* con inulina de achicoria como fuente de carbono.

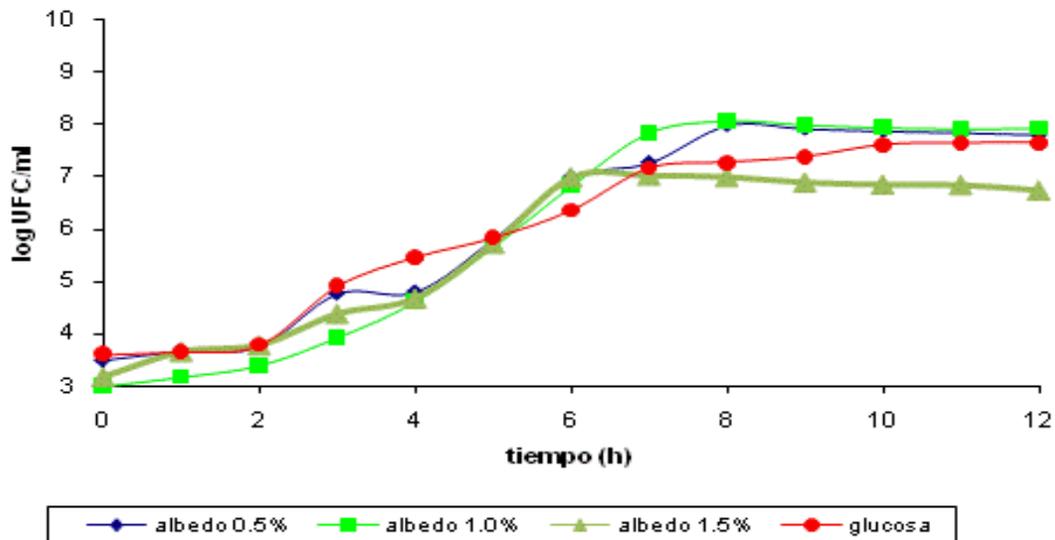


Figura 12. Cinéticas de crecimiento para *Aerococcus viridans* con albedo de naranja como fuente de carbono.

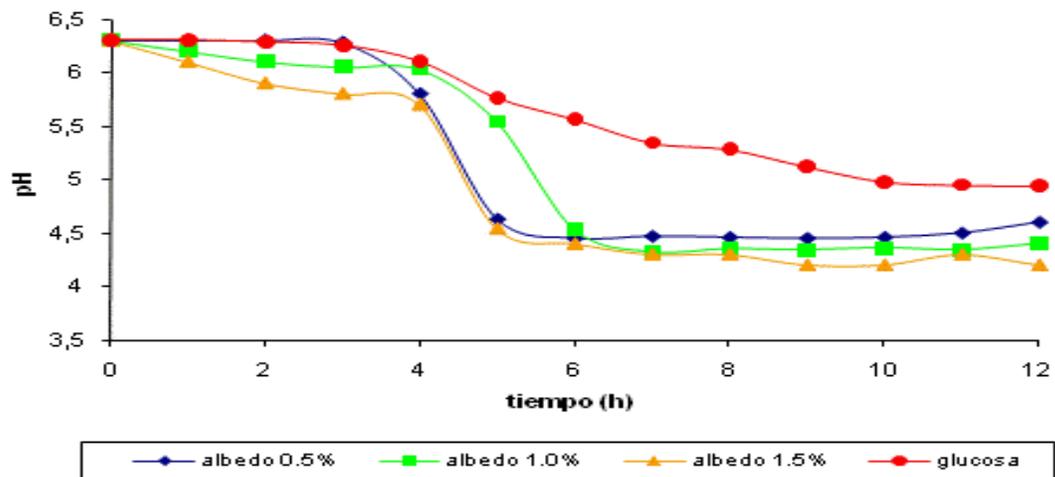


Figura 13. Comportamiento del pH para *Aerococcus viridans* con albedo de naranja como fuente de carbono.

La Figura 14 muestra las curvas de crecimiento de *Aerococcus viridans* en medio TPY con diferentes concentraciones de inulina de agave como fuente de carbono observándose una óptima adaptación de la bacteria al medio de cultivo, la fase exponencial inicio de manera similar para las diferentes concentraciones de inulina en la segunda hora del experimento alcanzando una fase estacionaria a partir de la séptima hora de fermentación. Con las dos concentraciones mínimas de inulina en el medio de cultivo (0.5 y 1.0%) se obtuvo un mayor crecimiento de la bacteria aún sobre el control (7.9 log UFC/mL para ambas concentraciones).

La Figura 15 muestra el comportamiento del pH a diferentes concentraciones de inulina de agave presentando en general una tendencia en descenso conforme aumentó el nivel de inulina de agave registrando valores mínimos por debajo de lo reportado con glucosa (5.4), siendo el medio de cultivo con 1.5% de inulina el que presento el valor más bajo de pH (pH 4).

La Figura 16 muestra las curvas de crecimiento de *Aerococcus viridans* en medio TPY con diferentes concentraciones de inulina de achicoria como fuente de carbono observándose una rápida adaptación de la bacteria al medio de cultivo, el inicio de la fase exponencial se presenta a partir de la segunda hora del experimento alcanzando una fase estacionaria a partir de la séptima hora manteniéndose constante sin presentar etapa de decaimiento durante las doce horas de la fermentación. A una concentración de 1.0% de inulina de achicoria se observa una mejor adaptación de la bacteria así como una cuenta viable mayor (8.2 log UFC/mL) que con glucosa (control).

El pH presentó en general una tendencia en descenso, con una concentración de inulina de achicoria de 1.5 % se registraron valores de pH por debajo de 4 durante el experimento, con respecto a los otros niveles de inulina se llegó a pH finales entre 4 y 5 situándose por debajo de lo registrado con el control (Figura 17).

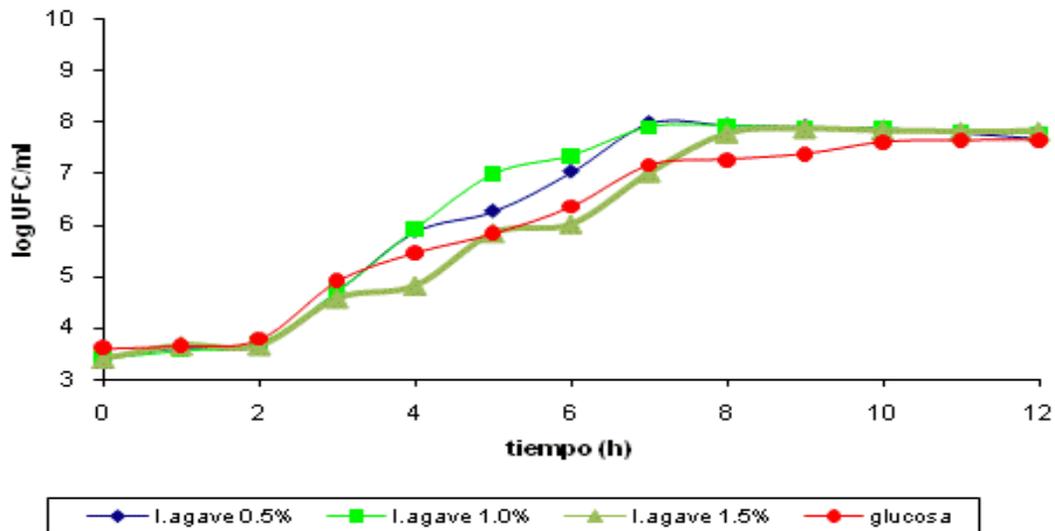


Figura 14. Cinéticas de crecimiento para *Aerococcus viridans* con inulina de agave como fuente de carbono.

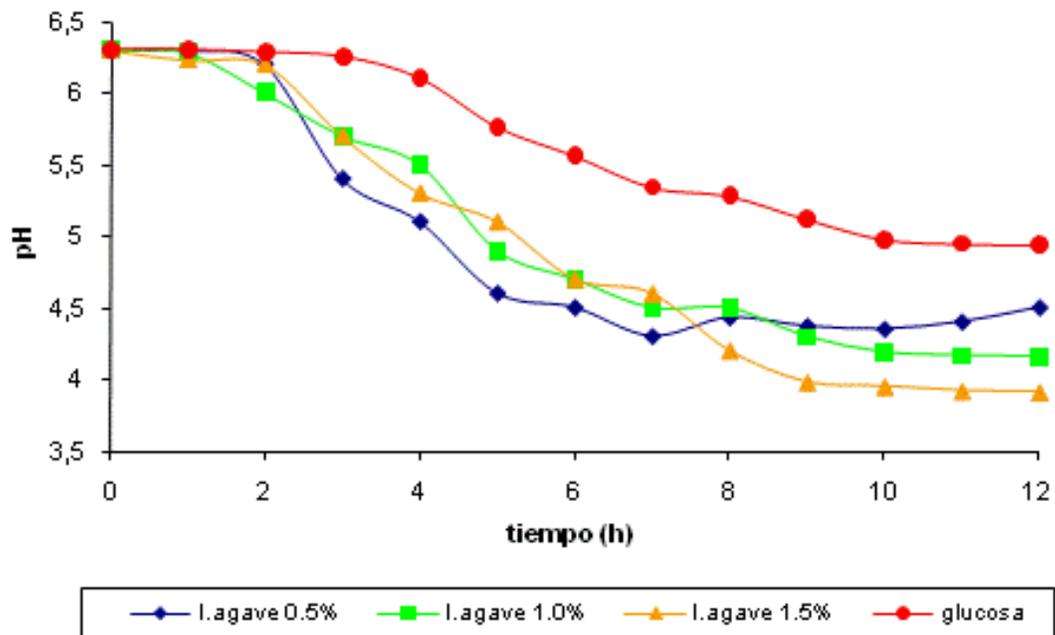


Figura 15. Comportamiento del pH para *Aerococcus viridans* con inulina de agave como fuente de carbono.

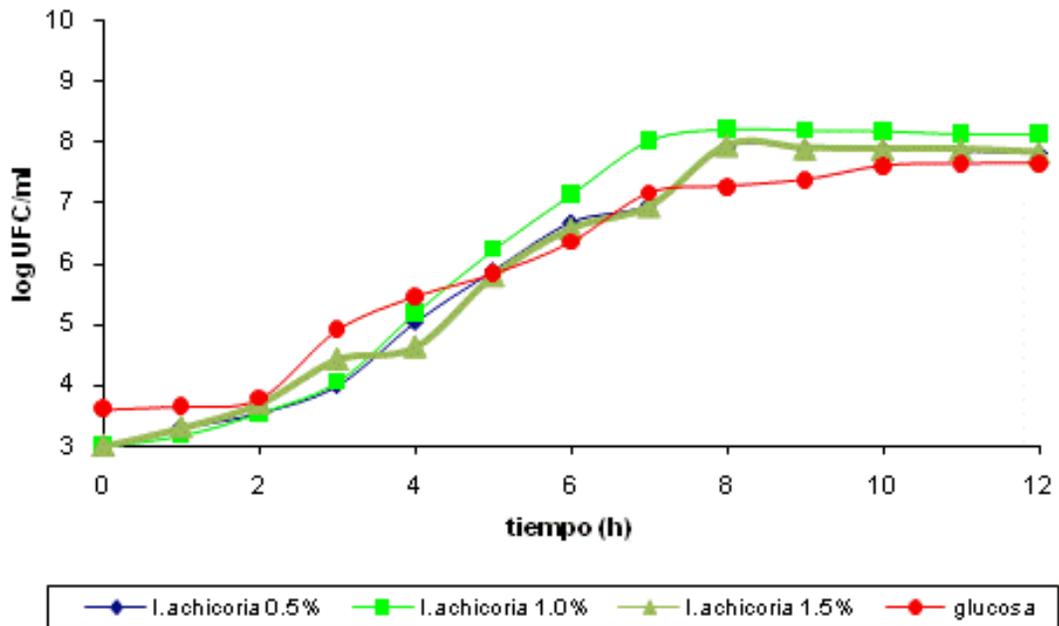


Figura 16. Cinéticas de crecimiento para *Aerococcus viridans* con inulina de achicoria como fuente de carbono.

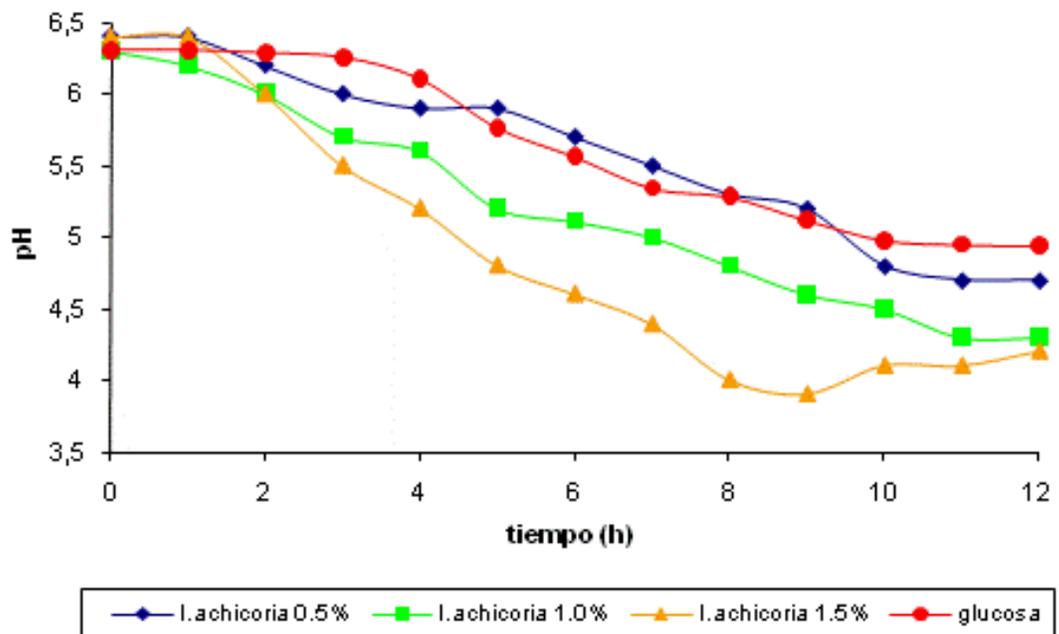


Figura 17. Comportamiento del pH para *Aerococcus viridans* con inulina de achicoria como fuente de carbono.

El comportamiento de las bacterias ácido lácticas utilizadas en un sistema con fuentes alternas de carbono resultó ser favorable, observándose la facilidad de las bacterias de metabolizar cadenas hidrocarbonadas de tipo polimérica como lo es la inulina y componentes de tipo oligomérico en el albedo de naranja en comparación con monómeros como la glucosa.

Durante la fermentación se observaron valores mayores de cuenta viable con inulina de agave, achicoria y albedo de naranja al utilizar *P.pentosaceus*, sin obtener los mismos resultados con *A. viridans* al no presentar diferencias de crecimiento respecto al control. Así mismo, se presentó una mayor crecimiento al incrementar la concentración de fuente de carbono alterna de 0.5 a 1.0% ya que a una mayor concentración (1.5%) de fuente de carbono alterna el crecimiento resultó ser menor que con glucosa, debido probablemente a la adaptación y desarrollo de bacterias ácido lácticas en medios con inulina como fuente de carbono, esto depende en gran medida del grado de polimerización de las cadenas fructo-oligoméricas (Pompei y col., 2008).

De acuerdo con lo reportado por Biedrzycka y Bielecka (2004), los factores principales que determinan la utilización de carbohidratos durante su fermentación son su estructura química, grado de polimerización, composición de unidades monoméricas, estructuración ramificada ó lineal y grado de solubilidad. A pesar de no realizarse las pruebas en condiciones en anaerobiosis, el comportamiento de las cepas en estudio se vio favorecido al utilizar componentes alternos como fuente de carbono coincidiendo con lo reportado por Van der Meulen y col. (2004), donde demuestran que las velocidades de crecimiento y cuenta viable son mayores con oligosacáridos que con componentes monoméricos bajo condiciones anaerobias.

La corta duración de la fase de adaptación con inulina y albedo de naranja refleja una óptima adaptación al medio de cultivo tanto con *P.pentosaceus* como con *A. viridans*, resaltando una diferencia entre ambas cepas respecto a la velocidad de crecimiento y número de células viables durante el experimento, lo cual se

relaciona con lo reportado por Kaplan y Hutkins (2000) donde muestran que existe diferencia de crecimiento bacteriano entre diferentes cepas (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) al utilizar fructooligosacaridos como fuente de carbono bajo condiciones anaeróbicas, registrando valores de pH finales comprendidos entre 4 y 5 para medios de cultivo con fructooligosacaridos, obteniendo valores cercanos a 6 para medios con glucosa. El probable aprovechamiento de otros compuestos dentro de la composición del albedo de naranja como por ejemplo oligosacáridos de pectina pueden ser la causa del comportamiento cinético en este trabajo, ya que se ha reportado el efecto de asimilación de oligosacáridos y prebióticos de pectina extraídos del albedo de naranja (Manderson y col., 2005), así como también oligosacáridos de pectina extraída enzimáticamente (Olano y col., 2002) resultando en cinéticas de crecimiento similares al control con glucosa, donde se aumenta en dos unidades logarítmicas el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Existen estudios (Bustamante y col., 2006; Mandalari y col., 2007) donde determinan un mejor aprovechamiento de carbohidratos con un grado de polimerización mayor de tres, por parte de bifidobacterias y lactobacilos reflejándose una producción de biomasa superior a la obtenida con glucosa, en este trabajo se demuestra lo contrario probablemente al haber diferencias en el tipo de cepa y condiciones del experimento.

El metabolismo de compuestos como los fructanos derivados de la inulina, así como albedo de naranja, se vio acompañado de la disminución del pH en el medio de cultivo, lo cual indica que las bacterias utilizadas son capaces de aprovechar la inulina de agave, de achicoria y albedo de naranja para su posible fermentación produciendo ácidos orgánicos provocando la disminución del pH (Rastall y Maitini, 2002). Aunque es un indicador relativamente pobre de crecimiento bacteriano, el patrón de disminución del pH en el medio de cultivo, supone que las bacterias ácido lácticas utilizadas son capaces de metabolizar diferentes tipos de fuente de carbono como la inulina (achicoria y agave) y albedo de naranja. Pompei y col. (2008) utilizaron bacterias ácido lácticas en un medio de cultivo con inulina y

fructooligosacaridos donde reportaron disminución del pH por debajo de 4 siendo datos significativamente diferentes con respecto al control.

La inulina, así como el albedo de naranja, contienen compuestos como fructooligosacaridos los cuales están formados por unidades de fructosa unidas por enlaces glucosídicos β (1-2) y en algunos casos, como en la inulina, con una unidad terminal de glucosa. Para poder metabolizar este tipo de compuestos, el microorganismo debe poseer la enzima β -fructofuranosidasa ya que es la enzima necesaria para hidrolizar los enlaces β (1-2) y así formar monómeros fácilmente aprovechables para el microorganismo (Rossi y col., 2005), lo cual supone que las cepas utilizadas en este estudio pueden presentar esta enzima al observar un crecimiento mayor que el control para la mayoría de los tratamientos.

La disponibilidad de sustancias pectínicas en el albedo de naranja supone su aprovechamiento por las bacterias utilizadas al observarse un óptimo crecimiento con esta fuente de carbono. Existen reportes donde proponen la metabolización de compuestos de pectina, caracterizada como dependiente de cada cepa. Este sistema propone el aprovechamiento de la pectina mediante la acción de la enzima 2-ceto-3-dioxi-6-fosfogluconato aldolasa, una enzima que cataliza el metabolismo de galacturonato, siendo este compuesto el principal componente monomérico en la pectina (Slováková y col., 2002). Lo cual hace suponer que tanto *P. pentosaceus* como *A. viridans* poseen el compuesto enzimático al observar buen crecimiento al utilizar albedo de naranja como fuente de carbono.

Las bacterias ácido lácticas pueden ser tanto homofermentativas como heterofermentativas, donde la glucosa es la principal fuente de carbono y energía. Sin embargo, existen otras hexosas como fructosa, manosa y galactosa que podrían convertirse en las principales fuentes de carbono al utilizar rutas de isomerización y fosforilación, compitiendo de una forma dependiente de fuente de carbono contra la glucosa (Siok-Koon y Min-Tze, 2009). Además, las cepas con carácter probiótico tienen la capacidad de utilizar carbohidratos complejos y de

ellos obtener su fuente de carbono al hidrolizarlos con enzimas degradadoras de pectina, α -galactosidasas y β -fructofuranosidasas (Amaretti y col., 2006).

El patrón de fermentación en el presente trabajo demuestra una dependencia con la composición y concentración de la fuente de carbono. Existen varios mecanismos que probablemente puedan explicar el comportamiento de metabolización de compuestos no monoméricos. Van del Meulen y col. (2004) proponen un mecanismo donde se involucra la hidrólisis intracelular de los oligosacáridos dando lugar a compuestos fácilmente asimilables para la célula, por otro lado, podría haberse presentado la hidrólisis de los componentes oligoméricos por medio de enzimas extracelulares y una vez obteniéndose sus respectivos monómeros estos pueden ser tomados desde fuera de la célula, lo cual supone una acumulación de fuente de carbono en el medio de cultivo (Amaretti y col., 2006), lo que favorecería el crecimiento de células sin descartar la metabolización de glucosa inicialmente disponible aumentando aun más la tasa de crecimiento.

8.4 Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación

La capacidad de adaptación al medio de cultivo por parte de la bacteria se ve reflejada obteniendo algunos parámetros como la tasa específica de crecimiento (k) y el tiempo de duplicación (g). La Tabla 5 muestra los parámetros antes mencionados para el caso de *Pediococcus pentosaceus* donde se observan valores de k significativamente mayores ($P < 0.05$) con el albedo de naranja respecto al control, destacando que a una concentración 1.0% se obtiene un valor de k (1.45 h^{-1}) superior a cualquier tratamiento con un tiempo de duplicación de 0.69 h. Con inulina de achicoria se obtuvieron los valores más bajos de k , siendo estos similares al control.

Tabla 5. Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación para *P. pentosaceus* en diferentes tipos y concentraciones de fuente de carbono.

TRATAMIENTO	%	k (h ⁻¹)	g(h)
<i>P. pentosaceus</i> – Glucosa	1	1.10 ^c	0.91 ^a
	0.5	1.24 ^b	0.81 ^b
<i>P. pentosaceus</i> – Albedo	1.0	1.45 ^a	0.69 ^d
	1.5	1.17 ^c	0.85 ^b
<i>P. pentosaceus</i> – Inulina agave	0.5	1.26 ^b	0.80 ^b
	1.0	1.29 ^b	0.78 ^b
	1.5	1.22 ^b	0.82 ^b
<i>P. pentosaceus</i> – Inulina achicoria	0.5	1.11 ^c	0.90 ^a
	1.0	1.09 ^c	0.92 ^a
	1.5	1.13 ^c	0.88 ^{ab}

^{a,b,c,d} Letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes (P<0.05)

La Tabla 6 presenta los valores de las tasas específicas de crecimiento y tiempos de duplicación para *Aerococcus viridans* observándose valores significativamente mayores (P<0.05) de *k* al utilizar otra fuente de carbono distinta a la glucosa a excepción del albedo de naranja (1.5%). Utilizando inulina de achicoria (1.0%) y albedo de naranja (1.0%) se obtienen valores para *k* de 1.44 y 1.40 h⁻¹, respectivamente, siendo estos mayores que cualquier tratamiento y unos tiempos de duplicación de 0.69 y 0.71 h, respectivamente.

Tabla 6. Tasa específica de crecimiento y tiempo de duplicación para *A. viridans* en diferentes tipos y concentraciones de fuente de carbono.

TRATAMIENTO	%	k (h ⁻¹)	g(h)
<i>A. viridans</i> – Glucosa	1	1.10 ^d	0.91 ^a
	0.5	1.24 ^c	0.80 ^b
<i>A. viridans</i> – Albedo	1.0	1.40 ^a	0.71 ^c
	1.5	1.06 ^d	0.95 ^a
<i>A. viridans</i> – Inulina agave	0.5	1.26 ^c	0.79 ^b
	1.0	1.25 ^c	0.80 ^b
	1.5	1.23 ^c	0.81 ^b
<i>A. viridans</i> – Inulina achicoria	0.5	1.36 ^b	0.73 ^c
	1.0	1.44 ^a	0.69 ^d
	1.5	1.37 ^b	0.73 ^c

^{a,b,c,d} Letras diferentes en una misma columna son significativamente diferentes (P<0.05)

La disponibilidad de fuente de carbono depende en gran medida del tipo de enzimas sintetizadas por parte de la bacteria. Cabe señalar el efecto del tipo de fuente de carbono y el tiempo de adaptación para la síntesis de enzimas, por ejemplo, la 6-fosfogluconato que forma parte del proceso de catálisis de carbohidratos sobre el óptimo desempeño de la bacteria en la etapa inicial de la fermentación (Rossi y col., 2005). En este estudio, las bacterias utilizadas fueron sometidas a una etapa de adaptación, probablemente ambas bacterias lograron sintetizar en las primeras horas de la adaptación las enzimas necesarias para hidrolizar carbohidratos más complejos teniendo como consecuencia una mejor

adaptación al medio de cultivo, aún cuando este haya sido modificado. Dobrogosz y Demoss (1963) crecieron *P. pentosaceus* utilizando un medio de cultivo con diferentes hexosas como fuente de carbono, ellos observaron una tasa específica de formación enzimática mayor con glucosa, lo que ellos suponen existe represión catabólica enzimática por efecto del sustrato, provocado por la inhibición de síntesis de RNA responsable de la expresión enzimática. De acuerdo a lo obtenido en este trabajo, probablemente no existe represión catabólica ya que se observan tasas específicas de crecimiento mayores con inulina y albedo de naranja al 1% (p/v) que con glucosa. De manera general, la presencia de monómeros de carbono disponibles favorecería una adaptación rápida del microorganismo por lo que se presentaron valores más altos de tasas de crecimiento y menor tiempo de duplicación.

8.5 Producción de ácidos orgánicos de cadena corta.

La producción de ácidos orgánicos de cadena corta durante la fermentación por parte de *Pediococcus pentosaceus* se observan en la Tabla 7. La producción de ácido láctico fue incrementando con respecto al tiempo para todos los tratamientos, sin embargo, se obtuvieron menores cantidades a las 12 horas de la fermentación al utilizar fuentes de carbono alternas. Con albedo de naranja se produce una cantidad significativamente mayor ($P < 0.05$) que las otras dos fuentes de carbono con un valor de 3,680 g/L. La producción de ácido acético también fue aumentando con respecto al tiempo de fermentación, aunque con cualquier fuente de carbono alterna se produjo mayor cantidad de dicho metabolito con respecto al control, solo con albedo de naranja se obtuvieron valores significativamente mayores con respecto a la glucosa (1,120 g/L). Respecto a la producción de ácido propiónico, utilizando una fuente de carbono alterna se obtienen valores menores que con glucosa al término de la fermentación, aunque sin encontrar diferencias significativas ($P < 0.05$) al utilizar inulina de agave ó achicoria, con albedo de naranja se obtuvieron los valores más bajos de producción resultando en 0,026 g/L a las doce horas de fermentación. La producción de ácido butírico fue

significativamente mayor ($P < 0.05$) con albedo de naranja e inulina de achicoria respecto al control no siendo así con inulina de agave donde se obtuvo un valor de 0,030 g/L a las 12 horas de fermentación.

La Tabla 8 muestra la producción de ácido orgánicos por *A. viridans*, observándose para el caso de ácido láctico una cantidad significativamente menor ($P < 0.05$) con una fuente de carbono alterna, siendo con inulina de agave la fuente de carbono con la que se produjo un valor de 3,331 g/L mayor que lo reportado con albedo e inulina de achicoria con valores a los 12 horas de la fermentación de 1,837 y 1,936 g/L, respectivamente. Al utilizar inulina y albedo de naranja como fuente de carbono se obtienen valores significativamente mayores que con glucosa, siendo con albedo con el que se produjo una mayor cantidad de ácido acético (0,998 g/L). La producción de ácido propiónico resulto ser mayor al usar inulina de agave (0,304 g/L) siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) que con glucosa, aunque con albedo se produjo solo un valor de 0,117 g/L colocándose debajo de lo producido por el control (0,163 g/L) a las 12 horas de la fermentación. Para el caso de la producción de ácido butírico, con las fuentes de carbono alternas se produjeron valores significativamente mayores ($P < 0.05$) que el control, con inulina de agave se obtuvo la mayor producción de este metabolito con 0,042 g/L.

Tabla 7. Producción de ácidos orgánicos de cadena corta por *P. pentosaceus* con diferentes tipos de fuente de carbono.

Tratamiento/Tiempo de fermentación	Concentración (g/L)			
	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico
Glucosa				
0	0.900 ^c	0.652 ^b	0.141 ^b	0.013 ^b
6	3.330 ^b	0.740 ^a	0.232 ^a	0.052 ^a
12	4.280 ^a	0.747 ^a	0.257 ^a	0.056 ^a
Albedo				
0	0.007 ^c	1.002 ^a	0.010 ^b	0.009 ^c
6	2.853 ^b	1.012 ^a	0.013 ^{ab}	0.024 ^b
12	3.680 ^a	1.120 ^a	0.026 ^a	0.069 ^a
Inulina agave				
0	0.003 ^c	0.524 ^b	0.113 ^b	0.023 ^b
6	1.568 ^b	0.738 ^a	0.217 ^a	0.030 ^{ab}
12	2.273 ^a	0.815 ^a	0.230 ^a	0.036 ^a
Inulina achicoria				
0	0.002 ^c	0.648 ^b	0.125 ^b	0.045 ^c
6	1.246 ^b	0.815 ^a	0.182 ^b	0.057 ^b
12	2.271 ^a	0.897 ^a	0.227 ^a	0.084 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes en una misma columna por cada tratamiento son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Tabla 8. Producción de ácidos orgánicos de cadena corta por *A. viridans* con diferentes tipos de fuente de carbono.

Tratamiento/Tiempo de fermentación	Concentración (g/L)			
	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiónico	Ácido butírico
Glucosa				
0	1.932 ^b	0.605 ^b	0.073 ^c	0.003 ^c
6	4.308 ^a	0.623 ^a	0.108 ^b	0.012 ^b
12	4.315 ^a	0.631 ^a	0.163 ^a	0.020 ^a
Albedo				
0	0.001 ^b	0.671 ^b	0.026 ^b	0.001 ^b
6	1.602 ^a	0.801 ^a	0.051 ^{ab}	0.002 ^b
12	1.837 ^a	0.998 ^a	0.117 ^a	0.032 ^a
Inulina agave				
0	0.084 ^c	0.677 ^c	0.241 ^c	0.018 ^c
6	2.785 ^b	0.787 ^a	0.283 ^b	0.035 ^b
12	3.331 ^a	0.809 ^a	0.304 ^a	0.042 ^a
Inulina achicoria				
0	0.035 ^b	0.530 ^c	0.161 ^c	0.011 ^b
6	1.782 ^a	0.675 ^b	0.192 ^b	0.034 ^a
12	1.936 ^a	0.713 ^a	0.229 ^a	0.039 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes en una misma columna por cada tratamiento son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

La disminución de pH en el medio de cultivo se debe principalmente a la acumulación de ácidos grasos de cadena corta generados en el proceso de fermentación, los cuales han sido considerados como metabolitos benéficos debido a la inhibición de microorganismos patógenos del sistema gastrointestinal (Gibson, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que utilizando fuentes alternas de carbono se estimula la producción de ácidos orgánicos, lo cual se relaciona con lo obtenido por Donkor y col. (2007) donde reportaron un incremento en la producción de ácido láctico utilizando inulina como fuente de carbono en un sistema lácteo.

Algunas cepas de bacterias ácido lácticas presentan un patrón de fermentación heterofermentativo de tipo facultativo, tal es el caso de *P. pentosaceus* y *A. viridans* a pesar de reportarse un patrón homofermentativo estricto de acuerdo a sus características ya establecidas (Silliker y Elliott, 1980). Las bacterias homofermentativas llevan a cabo la fermentación usando la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas con un balance neto de 1 mol de glucosa por 2 moles de ácido láctico, por otro lado, la fermentación heterofermentativa se lleva a cabo mediante la ruta de las hexosas monofosfato produciendo una mol de ácido láctico/etanol/acetato y dióxido de carbono por cada mol de glucosa, lo cual indica que este tipo de microorganismos producen principalmente ácido láctico y acético producto de la metabolización de los carbohidratos, destacando una producción final del 50 al 85 % de ácido láctico como producto final. En el presente trabajo se obtuvo una mayor producción de ácido láctico al usar albedo de naranja con *P. pentosaceus*, no siendo así con *A. viridans* al presentarse tasas de producción mayores con inulina. La variación de concentraciones de ácido láctico con diferentes géneros de bacterias ácido lácticas se debe probablemente a las distintas rutas de fermentación por ausencia ó sobreexpresión de isomerasas que participan en el aprovechamiento de la glucosa (Siok-Koon y Min-Tze, 2009).

Existen estudios donde muestran represión catabólica de bacterias ácido lácticas por efecto del tipo de sustrato y la edad fisiológica de la cepa, generando cierta inhibición de isomerasas que participan en la ruta de las pentosas, hexosas monofosfato y la glucolisis repercutiendo en la baja producción de metabolitos como los ácidos orgánicos de cadena corta (Slováková y col., 2002).

9 Conclusiones

El albedo de naranja debido a la gran cantidad de fibra que contiene favorecería su utilización en productos cárnicos, siendo mayor el contenido de fibra en este subproducto que en las dos inulinas estudiadas (achicoria ó agave).

La utilización de otras fuentes de carbono como albedo de naranja al 1% (p/v) favorecen un crecimiento mayor de bacterias lácticas probióticas (*Pediococcus pentosaceus*) sobre fuentes de carbono monoméricas (glucosa), obteniendo valores menores del tiempo de generación.

Las bacterias lácticas estudiadas en este trabajo pueden metabolizar muy bien los subproductos agroindustriales utilizados, reflejándose esto en la producción de ácidos orgánicos.

De los 3 productos utilizados como prebióticos el albedo de naranja fue con el que se obtuvieron los mejores resultados, con lo cual se concluye que la utilización de subproductos agroindustriales podría ser una buena fuente de fibra y un prebiótico de bacterias lácticas termotolerantes probióticas.

10 Bibliografía

- Akin, M. B., Akin, M. S. y Kirmaci, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*. 104: 93-99.
- Aleson-Carbonell, L., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. y Kuri, V. 2005a. Functional and sensory effects of fiber-rich ingredients on breakfast fresh sausages manufacture. *Food Science and Technology International*. 11(2): 89-97.
- Aleson-Carbonell, L., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. y Kuri, V. 2005b. Characteristics of beef burger as influenced by various types of lemon albedo. *Inovative Food Science and Emerging Technologies*. 6: 247-255.
- Amaretti, A., Tamburini, E., Bernardi, T., Pompei, A., Zanoni, S., Vaccari, G., Matteuzzi, D. y Rossi, M. 2006. Substrate preference of *Bifidum adolescentis* MB 239: compared growth on single and mixed carbohydrates. *Applied Microbial and Biotechnology*. 73: 654-662.
- AOAC, 1996: *Official Method of Analysis of AOAC International*, 16th edition. Washington, DC.
- Archer, B. J., Johnson, S. K., Devereux, H. M y Baxter, A. L. 2004. Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perception of satiety and food intake in men. *British Journal of Nutrition*. 91: 591-599.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Cap. 1 En *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Salminen, S. y Wrigth, A. V. (Editors). Marcel Dekker, Nueva York. pp: 1-72.
- Barreteau, H., Delattre, C. y Michaud, P. 2006. Production of Oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology and Biotechnology*. 44(3): 323-333.

- Biedrzycka, E. y Bielecka, M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 170-175.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A., Juskiewicz, J. y Wróblewska, M. 2002. Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. *Food Research International*. 35: 139-144.
- Boehm, G., Stahl, E., Jelinek J., Knol J., Miniello V. y Moro G. 2005. Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatrica*. 94(449): 18-21.
- Brennan, C. S., Kuri, V. y Tudorica, C. M. 2004. Inulin-enriched pasta: effects on textural properties and starch degradation. *Food Chemistry*. 86: 189-193.
- Briet, F. 1995. Symptomatic response to varying levels of fructo-oligosaccharides consumed occasionally or regularly. *European Journal of Clinical Nutrition*. 49:501.
- Brown, I. L. 2004. Applications and uses of resistant starch. *Journal of AOAC International*. 87: 727-732.
- Bruzzese, E., Volpicelli, M., Squaglia, M., Tartaglione, A., Guarino, A. 2006. Impact of prebiotics on human health. *Digestive and Liver Disease*. 38:283-287.
- Bustamante, C. P., Mayorga, R. L., Ramírez, S. H., Martínez, C. P., Barranco, F. E. y Azaola, E. A. 2006. Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. *Revista Mexicana de Ciencia Farmacéuticas*. 37(2): 5-9.
- Cáceres, E., García, M. L., Toro, J. y Selgas, M. D. 2004. The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages. *Meat Science*. 68: 87-96.
- Cánovas, A. y Pérez-Alvarez, J. A. 2006. La fibra dietética: Un ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales. *Alimentaria*. 370:65-68.

- Carpita, N. C. y Gibeaut, D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Journal of Plants*. 3: 1-30.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. 2002. The Lactic Acid Bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4): 281-370.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. y Webb, C. 2002. Application of cereal and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 79: 131-141.
- Courtin, C. M., Swennen, K., Verjans, P. y Delcour, K. 2009. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. *Food Chemistry* 112(4): 831-837.
- Corry, J.E.L. 1973. The water relations and heat resistance of microorganisms. *Progress in Industrial Microbiology* 12, 73– 108.
- Coussement, P. A. 1999. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition*. 129: 1412.
- Crittenden, R. G. y Playne, M. J. 2002. Purification of food-grade oligosaccharides using immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Applied of Microbiology Biotechnology*. 58: 297-302.
- Crittenden, R. G. y Playne, M. J. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends of Food Science and Technology*. 7:353-361.
- Cummings, J. I., Macfarlane, G. T. y Englyst, I. N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2): 415- 420.
- De Man, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied of Bacteriology*, 23:130-135.

- Devereux, H. M., Jones, G. P., MacCormak, L. y Hunter, W. C. 2003. Consumer acceptability of low fat foods containing inulin and oligofructose. *Journal of Food Science*. 68(5): 1850-1854.
- Djouzi, Z., Andreiux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P. y Szyllit, O. 1995. Degradation and fermentation of alpha-gluco-oligosaccharides by bacteria strains from human colon: *in vitro* and *in-vivo* studies in gnotobiotic rats. *Journal of Applied Bacteriology*. 79: 117-127.
- Dobrogosz, W. J. y Demoss, R. D. 1963. General physiological considerations of catabolite repression in *Pediococcus pentosaceus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 77: 639-648.
- Donkor, O. N., Nilmini, S. L., Stolic, P., Vasiljevic, T. y Shah, N. P. 2007. Survival and activity of selected probiotic organism in set.type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*. 17: 657-665.
- Durán-Mendoza, T., Mendiola-Campuzano, J. V. H., Urrieta-Saltijeral, J. M., Hernández-Vélez, R. M. y Angulo Guerrero, O. 2008. Evaluación de la incorporación de fibra dietética procedente del bagazo de naranja en un embutido tipo longaniza. *Memorias del IV Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Villahermosa, Tabasco, México.
- Earnshaw, R. G., Appleyard, J., Hurst, R. M. 1995. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 28:197-219.
- Fernández-Ginés, J. M., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Sendra, E. y Pérez-Álvarez, J. A. 2004. Lemon albedo as a new source of dietary fiber: Application to bologna sausages. *Meat Science*. 67: 7-13.
- Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J. M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E. y Pérez-Álvarez, J. A. 2004. Application of functional citrus

- by-products to meat products. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 176-185.
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C. y Pérez-Álvarez, J. A. 2008. Physico-chemical and microbiological profiles of "salchichón" (Spanish dry-fermented sausages) enriched with orange fiber. *Meat Science*. 80: 410-417.
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L. y Roberfroid, M. 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 41: 353-362.
- Franck, A. 2008. Food Applications of prebiotics. En: *Handbook of Prebiotics*. Editores: Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. CRC Press Boca Raton, FL. pp: 437-446.
- Franz, C. M. A. P. y von Holy, A. 1996. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 29: 59-73.
- Fuller, R. 1989. A review. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-378.
- Gallaher, D. D., Locket, P. L. y Gallaher, P. M. 1992. Bile acid metabolism in rats fed two levels of corn oil and brans of oat, rye and barley and sugar beet fiber. *Journal of Nutrition*. 122: 473-481.
- García, M. L., Domínguez, R., Galvez, M. D., Casas, C. y Selgas, M. D. 2002. Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Sciences*. 60(3): 227-236.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125: 1401-1412.

- Gibson, G. R., Beatty, E. R. Wang, X., Cummings, J. H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*. 108: 975-982.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J. A., Rastall, R. A. y Roberfroid, M. B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17: 259.
- Gibson, G. R. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutritions Supplements*. 1: 25-31.
- Grizard, D. y Barhomeuf, C. 1999. Review: Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reproduction and Nutrition Development*. 39: 563-588.
- Harmsen, H. J., Wildeboer, A. C., Rangs, G. C., Wagendorp, A. A. y Bindels, J. G. 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition*. 30:61-67.
- Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. Tercera edición. Academic Press, Londres, Gran Bretaña. pp: 278-280.
- Hennelly, P. J., Dunne, P. G., O'Sullivan, M. y O'Riordan, E. D. 2006. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. *Journal of Food Engineering*. 75(3): 388-395.
- Hoerr, R. A. y Bostwick, E. F. 2000. Bioactive protein and probiotic bacteria: modulation of nutritional health. *Nutrition*. 16: 711-713.
- Holzapfel, W. H. y Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probióticos. *Food Research International*. 35: 109-116.
- Hopkins, M. J., Cummings, J. H. y Macfarlane, G. T. 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.
- Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49(Suppl.1):S139-S150.
- Ingram, M. 1975. The Lactic Acid Bacteria: A Broad View. En *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Fourth Long Ashton Symposium*. Carr, J.G., Cutting, C. V. y Writhing, G. C. (Editors), Academic Press. pp:1-17.
- Jánváry, L. 2009. Inulina: una fibra soluble como sustituto de grasa. *Mundo Lácteo y Cárnico*. Noviembre-Diciembre: 9-12.
- Jerez, C. A. 1988. The heat shock response in meso- and thermoacidophilic chemolithotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 56(3): 289-293.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters of Applied Microbiology*. 27:183-185.
- Kaplan, H. y Hutkins, R. W. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2682-2684.
- Kip, P., Meyer, D. y Jellema, R. H. 2006. Inulins improve sensoric and textural properties of low fat yoghurts. *International Dairy Journal*. 16(9): 1098-1103.
- Kolida, S. y Gibson, G. R. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *Journal of Nutrition*. 137: 2503-2506.
- Kolida, S. y Gibson, G. R. 2008. The Prebiotic effect: Review of experimental and human data. En: *Handbook of Prebiotics*. Editores: Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. CRC Press, Boca Raton FL. pp:69-92.
- Kruse, H. P., Kleessen, B. y Blaut, M. 1999. Effects of inulin on faecal bifidobacteria in human subjects. *British Journal of Nutrition*. 82: 375-382.

- Laroche, C., Fine, F. y Gervais, P. 2005. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. *International Journal of Food Microbiology*. 97(3): 307-315.
- Lee, Y. K. y Salminen, S. 1995. The coming age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 241-245.
- Leroy, F. y Vuyst, L. 2001. Growth of the Bacteriosin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4407-4413.
- Livesey, G. 1992. The energy values of dietary fibre and sugar alcohols for man. *Nutrition Research Reviews*. 5: 61.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. y Cummings, J. H. 2006. Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 24: 701-714.
- Macfarlane, G. T., Steed, H. Y Macfarlane, S. 2007. Review: Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 305-344.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Park, J. 1998 Brock. *Biología de los microorganismos*. 8ª Edición. Editorial Prentice-Hall. Madrid, España. pp: 718-724.
- Madrigal, L. y Sangronis, E. 2007. La inulina y sus derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57(4): 387-296.
- Mandalari, G., Nueno-Palop, C., Touhy, K., Gibson, G. R., Bennett, R. N., Waldron, K. W., Bisignano, G., Narbad, A. y Faulds, C. B. 2007. *In vitro* evaluation of the prebiotic ctivity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 73: 1173-1179.

- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., Yadhay, M. P., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. 2005. *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 8383-8389.
- Manning, T. S. y Gibson, G. R. 2004. Prebiotics. Best practice and research clinical *Gastroenterology*. 18: 287-298.
- Mañas, P., Pagan, R., Leguerinal, I., Condon, S., Mafart, P. y Sala, F. 2001. Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and recovery of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*. 63(3): 209-216.
- Marlett, J. A. 1990. Analysis of dietary fiber in human foods. En: Kritchevsky, D., Bonfield, C., Anderson, J. W. (Editores). *Dietary fiber: Chemistry, physiology and health effects*. Plenum. Nueva York. pp. 31-48.
- Mendoza, E., García, M. L., Casas, C. y Selgas, M. D. 2001. Inulin as fat substitute, dry fermented sausages. *Meat Science*. 57(4): 387-393.
- Meyer, P. D. y Tunland, B. C. 2002. Fate and fiber in the gastrointestinal tract and consequences. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3: 78-92.
- Milbourne, K. 1983. Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. *Meat Science*. 9(2): 113-119.
- Montgomery, D. 2006. *Diseño y análisis de experimentos*. 2ª Edición. México, D. F. pp: 170-211.
- Moro, G., Minoli, I., Mosca, F., Jelinek, J., Stahl, B. y Boehm, G. 2002. Dosage related bifidogenic effects of galacto- and fructo-oligosaccharides in formula fed term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterologic and Nutrition*. 34:291-295.

- Mussatto, S. I. y Mancilha, I. M. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*. 68: 587-597.
- Noronha, N., O'Riordan, E. D. y O'Sullivan, M. 2007. Replacement of fat with functional fibre in imitation cheese. *International Dairy Journal*. 17(9): 1073-1082.
- Nowak, B., von Mueffling, T., Grotheer, J., Klein, G. y Watkinson, B. M. 2007. Energy content, sensory properties and microbiological shelf life of German bologna-type sausages produced with inulin as fat replacer. *Journal of Food Science*. 72(9): 629-638.
- O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Martin, E. M., Griffis, C. L. y Johnson, M. G. 2006. Heat resistance of *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* 0157:117, and *Listeria innocua* M1, a potential surrogate for *Listeria Monocytogenes*, in meat and poultry. *Journal of Food Science* 71: 23-30.
- Olano, M. E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. y Rastall, R. A. 2000. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextran by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*. 83: 247-255.
- Olano, M. E., Gibson, G. R. Y Rastall, R. A. 2002. Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 93: 505-511.
- Palop, A., Raso, J., Pagà, R., Condon, S. y Sala, F. J. 1996. Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29: 1-10.
- Parés, F. R. y Juárez, G. A. 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. 1ª edición. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp: 73-87.
- Passeron, T., Lacour, J. P., Fontas, E. y Ortonne, J. P. 2006. Prebiotics and symbiotics: two promising approaches for the treatment of atopic dermatitis in children above 2 years. *Allergy*. 61: 431-437.

- Peppler, H. J. 1942. The heat resistance of *Streptococcus thermophilus* grown in mixed culture with caseolytic-bacteria. Transactions of the Kansas Academy of Science. 45:36-39.
- Pérez, C. F. 2008. Caracterización fisicoquímica de harina de naranja como extensor funcional en productos cárnicos. Tesis de Licenciatura. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Estado de México, México.
- Pérez-Chabela, M.L., A. Totosaus, I. Guerrero. 2008. Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. Ciencia e Tecnología de Alimentos 28(1): 132-138.
- Playne, M. J. y Crittenden, R. G. 1996. Commercially available oligosaccharides. Bulletin the International Dairy Foundation, 313: 10-22.
- Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U., Matteuzzi, D. y Rossi, M. 2008. *In vitro* comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. Anaerobe. 14: 280-286.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. 2000. Microbiología. McGraw Hill Interamericana, 4ª Edición. España. pp. 49-51.
- Ramírez-Chavarín, N. L., Wachter-Rodarte, M. C. y Pérez-Chabela, M. L. 2009. Producción de metabolitos y pruebas de actividad antagónica de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos. Nacameh, revista electronica. 3(1): 33-47.
- Ramírez-Chavarín, N. L., Wachter-Rodarte, M. C. y Pérez-Chabela, M. L. 2010. Characterization and identification of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked sausage as bioprotective cultures. Journal of Muscle Foods. Artículo en prensa.
- Rastall, R. A. y Maitini, V. 2002. Prebiotics and symbiotics : towards the next generation. Current Opinion in Biotechnology. 13: 490-496.

- Reid, G. 2008. Probiotics and prebiotics-progress and challenges. *International Dairy Journal*. 18: 969-975.
- Reyes-Menéndez, C.V. 2005. Efecto de las Bacterias Lácticas Termorresistentes sobre el color y la textura de batidos cárnicos bajos en grasa y sal. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México.
- Rincón, A. M., Vásquez, A., Marina, A. y Padilla, F. 2005. Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citruis reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 55(3):1-9.
- Rivero-Urgell, M. y Santamaría-Orleans, A. 2001. Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development*. 65: S43-S52.
- Roberfroid, M. B. 2008. Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies, and products. En: *Handbook of Prebiotics*. Editores: Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 39-69.
- Roberfroid, M. B. 1993. Dietary fiber, inulin, and oligofructose. A review comparing by their physiological effects. *CRC. Critical Review of Food Science and Nutrition*. 33: 103-148.
- Roberfroid, M. B., Gibson, G. R. y Delzenne, N. 1993. The biochemistry of oligofructose, a non-digestible fiber : An approach to calculate its caloric value. *Nutrition Reviews*. 51:137.
- Roberfroid, M. B. 1999. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*. 129: 1398-1401.
- Roberfroid, M. B. y Slavin, J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40: 461-480.

- Rodriguez, R., Jimenez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillen, R. y Heredia, A. 2006. Dietary fiber from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science and Technology*. 17: 3-15.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S. y Matteuzzi, D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10): 6150-6158.
- Ruiz, M. D. y Pacheco-Delahaye, E. 2007. Utilización de inulina y carragenina en la elaboración de salchichas de carne bajas en grasa. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*. 33: 165-178.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. 84: 197-215.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S. y Kulkarni, P. R. (2006). Resistant-starch – A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5: 1-17.
- Sako, T., Matsumoto, K. y Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal*. 9:69-80.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M., Roberfroid, M. y Rowland, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*. 80: 147-171.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. y Prapulla. S. G. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*. 16: 442-457.
- Saricoban, C., Ozalp, B., Yilmaz, M. T., Ozen, G., Karakaya, M. y Akbulut, M. 2008. Characteristics of meat emulsions systems as influenced by different levels of lemon albedo. 80: 599-606.

- Schell, M. A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceeding National Academic Science. USA.* 99:14422-14427.
- Schnûrer, J. y Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology.* 16(1-3):70-78.
- Schoder, R., Clark, C. J., Sharrock, K., Hallett, C. y MacRea, E. A. 2004. Pectins from the albedo of immature lemon fruitlets have high water binding capacity. *Journal of Plant Physiology.* 161: 371-379.
- Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., van den Heuvel, E. G. y Schrezenmeir, J. 2001. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition.* 73: 459-464.
- Silliker, J. H. Y Elliott, R. P. 1980. *Ecología Microbiana de los Alimentos.* 1^a Edición. Editorial Acribia, Inc. España. pp: 97-142.
- Siok-Koon, Y. y Min-Tze, L. 2009. Effect of prebiotic on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *Journal of Food Science and Agricultural.* 90: 267-275.
- Slováková, L., Dusková, D. y Marounek, M. 2002. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Letters in Applied Microbiology.* 35: 126-130.
- Spiegel, J. E., Rose, R., Karabell, P., Frankos, V. H. y Schmitt, D. F. 1994. Safety and benefits of fructo-oligosaccharides as food ingredients. *Food Technology.* 48: 85-89.
- Splittstoesser, D. F., Lienk, L. L., Wilkison, M. y Stamer, J. R. 1975. Influence of wine composition on the heat resistance of potential spoilage organisms. *Applied Microbiology.* 30(3): 369-373.

- Swennen, K., Courtin, C. y Delcour, J. 2006. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46: 459-471.
- Tamura, Z. 1983. Nutriology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*. 2:3-16.
- Tharanathan, R. N. y Mahadevamma, S. 2003. Grain legumes: A boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*. 14: 507-518.
- Terada, A., Hara, H., Kato, S., Kimura, T., Fujimori, I., Hara, K., Maruyama, T. Y Mitsuoka, T. 1993. Effect of lactosucrose (4G-beta-D-galactosylsucrose) on fecal flora and fecal putrefactive products of cats. *Journal of Veterinary and Medical Science*. 55(2): 291-295.
- Valette, P., Pelenc, V. y Djouzi, Z. 1993. Bioavailability of new synthesised glucooligosaccharides in the intestinal tract of gnotobiotic rats. *Journal of Food Science and Agricultural*. 62: 121-127.
- Valdés, M. S. 2006. Hidratos de carbono. En: *Química de Alimentos*. 4^a edición. Editor: Badui, D. S. Editorial Pearson Educación. México, D. F. pp: 29-109.
- Van Den Heuvel, E. G., Muys, T., van Dokkum, T. y Schaafsma, G. 1999. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *American Journal of Clinical Nutrition*. 65: 544-548.
- Van der Meulen, R., Vonts, L. y De Vuyst, L. 2004. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173010. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4):1923-1930.
- Victoria-León, T., Totosaus, A., Guerrero, I., Pérez-Chabela, M.L. 2006. efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 5(2): 135-141.
- Viuda-Martos, M., Fernandez-López, J., Sayas-Barbera, E., Sendra, E., Navarro, C. y Pérez-Alvarez, J. A. 2009. Citrus co-products as technological strategy to

- reduce residual nitrite content in meat products. *Journal of Food Science*. 74(8): 93-100.
- Voragen, A. G. J. 1998. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science and Technology*. 9: 328-335.
- Wang, X. y Gibson, G. R. 1993. Effects of the *in vivo* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 373-380.
- Weitzel, G., Pilatus, U. y Rensing, L. 1987. The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat shock protein inducing treatments in yeast. *Experimental Cell Research*. 70:64-79.
- Yeung, C. K., Glahn, R. P., Welch, R. M. y Miller, D. D. 2005. Prebiotics and iron bioavailability- is there a connection?. *Journal of Food Science*. 70(5): 88-92.
- Younes, H., Demigné, C. y Remesy, C. 1996. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large in the large intestine of the rat. *British Journal of Nutrition*. 75: 301-314.
- Ziemer, C. J. y Gibson, G. R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept. Perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*. 8:473-479.