



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Evaluación *in vitro* e *in vivo* del bagazo de manzana como
prebiótico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

I.A. Angélica Cerda Tapia

Comité tutorial

Dra. Ma. de Lourdes Pérez Chabela

Dra. Claudia Delgadillo Puga

Dr. Manuel Viuda Martos

México, D.F. Septiembre de 2014

El Posgrado de Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT con la referencia 001465.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Pérez Chabela con el apoyo de la Beca No. 212380047 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
1 ANTECEDENTES	2
1.1 Alimentos funcionales	2
1.1.1 Definición y características	2
1.2 Probióticos	4
1.2.1 Definición y características	5
1.2.2 Géneros de microorganismos utilizados como probióticos	5
1.2.3 Mecanismos de acción	7
1.3 Prebióticos	7
1.3.1 Características de prebióticos.....	7
1.3.2 Clasificación.....	9
1.3.3 Fibra Dietética.....	14
1.4 Subproductos Agroindustriales	18
1.4.1 Subproductos agroindustriales como fuente de fibra y posibles prebióticos <i>in vitro</i>	19
1.4.2 Subproductos agroindustriales como prebiótico <i>in vivo</i>	22
1.4.3 Bagazo de manzana	23
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo General	23
2.2 Objetivos Particulares	23
3 JUSTIFICACIÓN	24
4 MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 Primera etapa: Caracterización del bagazo de manzana.....	28
4.1.1 Obtención de harina de bagazo de manzana (<i>Malus domestica</i>)	28
4.1.2 Caracterización bromatológica del bagazo de manzana	28
4.1.3 Análisis microbiológico.....	30

4.1.4	Determinación del contenido de fibra dietética total.....	31
4.2	Segunda etapa: El bagazo de manzana como prebiótico <i>in vitro</i>	32
4.2.1	Fermentación del bagazo de manzana por dos cepas probióticas	32
4.2.2	Estimulación selectiva de crecimiento de bacterias benéficas.....	35
4.2.3	Resistencia a procesos digestivos	36
4.3	Tercera etapa: El bagazo de manzana como prebiótico <i>in vivo</i>	37
4.3.1	Animales y Alojamiento.....	37
4.3.2	Características Fisiológicas	38
4.3.3	Características microbiológicas	40
4.4	Diseño experimental	41
4.4.1	Primera etapa	41
4.4.2	Segunda etapa	41
4.4.3	Tercera etapa	42
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1	Primera etapa.....	41
6.1.1	Caracterización bromatológica del bagazo de manzana	41
6.1.2	Caracterización microbiológica del bagazo de manzana	42
6.1.3	Cuantificación de fibra dietética en bagazo de manzana.....	44
5.2	Segunda etapa.....	46
5.2.1	Fermentación del bagazo de manzana utilizando dos cepas probióticas	46
5.3	Tercera etapa.....	58
5.3.1	Características Fisiológicas	59
5.3.2	Características Microbiológicas	64
7	CONCLUSION	70
8	BIBLIOGRAFÍA	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Criterios para la clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico	8
Tabla 2 Clasificación de la fibra según grado de solubilidad (Cho y Samuel, 2009)	15
Tabla 3 Contenido de fibra dietética total (FDT) en subproductos agroindustriales	19
Tabla 4 Formulaciones de la dieta para el crecimiento de las ratas	38
Tabla 5 Composición bromatológica de la harina de bagazo de manzana variedad Rayada (base seca)	41
Tabla 6 Calidad Microbiológica de la harina de bagazo de manzana variedad Rayada.....	43
Tabla 7 Composición de la fibra dietética en la harina de bagazo de manzana ...	44
Tabla 8 Tasa específica de crecimiento (k) y tiempo de duplicación (g) para <i>L. rhamnosus</i> GG y <i>P. pentosaceus</i> UAM22 con dos de fuente de carbono.	51
Tabla 9 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por <i>P. pentosaceus</i> UAM22 y <i>L. rhamnosus</i> GG con dos fuentes de carbono diferentes.....	54
Tabla 10 Supervivencia a pH ácido de <i>P. pentosaceus</i> con dos fuentes de carbono (bagazo de manzana e inulina de Agave)	57
Tabla 11 Supervivencia a condiciones gástricas de <i>P. pentosaceus</i> con dos fuentes energía (bagazo de manzana e inulina de Agave)	57
Tabla 12 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) ($\mu\text{mol/g}$) del ciego de ratas <i>Wistar</i> alimentadas con dos fuentes de fibra dietética y la proporción que representan.	63
Tabla 13 Composición microbiana intestinal presentes en el ciego de ratas <i>Wistar</i>	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de flujo de la caracterización bromatológica y microbiológica del bagazo de manzana.	25
Figura 2 Diagrama de flujo de la caracterización prebiótica del bagazo de manzana.....	26
Figura 3 Diagrama de flujo para la determinación de las características fisiológicas	27
Figura 4 Cinéticas de crecimiento para <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG con bagazo de manzana e inulina de Agave al 1% como fuente de carbono.....	47
Figura 5 Cinéticas de crecimiento para <i>Pediococcus pentosaceus</i> UAM22 con bagazo de manzana e inulina de Agave al 1% como fuente de carbono	48
Figura 6 Ganancia en peso semanal de ratas cepa Wistar con bagazo de manzana (BM) e inulina de Agave (IA) (Promedio de 8 ratas \pm DS)	60
Figura 7 Consumo semanal de alimento por tratamiento por las ratas cepa Wistar (promedio de 8 ratas \pm DS)	61

RESUMEN

La fibra juega un papel importante en la alimentación por los beneficios asociados a la mejora de la salud gastrointestinal y su efecto prebiótico. Los subproductos agroindustriales presentan concentraciones de 50 - 90% de fibra dietética, la cual es fermentada por la microflora del tracto gastrointestinal inferior. La principal fruta procesada en la industria es la manzana, de la que se obtiene el subproducto agroindustrial bagazo de manzana. El objetivo del presente, fue evaluar el efecto prebiótico tanto *in vivo* como *in vitro* del bagazo de manzana (*Malus domestica* var. *rayada*); subproducto resultante de la elaboración de sidra, obtenido de la sidrera las Delicias en Zacatlán de las Manzanas, Puebla.

El estudio constó de tres etapas, primero se caracterizó bromatológica y microbiológicamente la harina de bagazo de manzana, además se cuantificó la fibra dietética total; segundo se evaluó el efecto prebiótico del bagazo de manzana *in vitro* y finalmente se determinaron las características fisiológicas y microbiológicas de ratas (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar al incorporar harina de bagazo de manzana como fuente de fibra. El contenido de fibra dietética total en la harina de bagazo de manzana es comparable con el de fuentes tradicionales (cereales), por lo que podrían emplearse para enriquecer alimentos. En el estudio *in vitro* los resultados demostraron que es altamente fermentable por bacterias lácticas probióticas, además de que reúne los 3 requisitos que debe tener un prebiótico, en el estudio *in vivo* el bagazo de manzana demostró estimular selectivamente la microbiota en el ciego de las ratas, además de ejercer las mismas características fisiológicas asociadas al consumo de un prebiótico ya probado, como lo es la inulina. Por lo que la harina de bagazo de manzana podría ser empleada como un prebiótico, dándole un valor agregado a un residuo agroindustrial que está siendo subutilizado.

ABSTRACT

Fiber plays an important role because of the benefits associated with improving the gastrointestinal health and its prebiotic effect when is eaten. Agro-industrial by-products have concentrations of 50-90% of dietary fiber, which is fermented by the microflora in the lower gastrointestinal tract. The principal processed fruit in industry is the apple, where apple pomace by-product is produced. The aim of the study was to evaluate both *in vivo* and *in vitro* prebiotic effect of apple pomace (*Malus domestica* var. rayada), resulting from the cider production in Las Delicias, Zacatlan de las Manzanas, Puebla, Mexico.

The study consisted of three stages, first bromatological and microbiological apple pomace powder was characterized, besides total dietary fiber was quantified; second the prebiotic effect was evaluated *in vitro* and finally, apple pomace was incorporated in the diet of Wistar rats (*Rattus norvegicus*) in order to determine physiological and microbiological characteristics in cecum. Total dietary fiber content in this by-product is comparable to those traditional sources (cereals), what means that it could be used to enrich foods. *In vitro* study showed that apple pomace powder is highly fermentable by probiotic lactic acid bacteria, gathering all 3 requirements to become a prebiotic, *in vivo* study showed the selectively stimulation of microbiota in cecum of rats, it also exert the same physiological characteristics associated with the consumption of a prebiotic, like inulin. Because of all said apple pomace powder could be used as a prebiotic, giving added value to an agro-industrial waste which has been underutilized.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la planificación en función de las tendencias ambientales se ha vuelto una necesidad estratégica, desde el punto de vista ambiental, la eliminación de desechos es uno de los más grandes problemas que debe enfrentar la agroindustria, de allí que el uso de los subproductos vaya en aumento. La industria de frutos y vegetales resalta su importancia en el sector innovador de los alimentos funcionales, ya que el procesamiento de estos, deja como resultado miles de toneladas de cortezas y bagazo que son desechados, los cuales representan una gran fuente de compuestos funcionales como la fibra dietética, además de otros.

Actualmente, la adición de alimentos funcionales en productos procesados de la industria alimentaria, ha ido adquiriendo mayor demanda, por las tendencias de consumir alimentos que ayuden a mantener el organismo en buenas condiciones y/o ejerzan un efecto benéfico a la salud, disminuyendo o previniendo enfermedades cardiovasculares, asociadas a enfermedades gastrointestinales y/o padecimientos asociados al cáncer. Los alimentos funcionales que más destacan en el mercado son aquellos adicionados de prebióticos, probióticos, antioxidantes, ácidos grasos omega 3, vitaminas, minerales y fibra dietética.

La aplicación de subproductos agroindustriales en bioprocesos ofrece una amplia gama de sustratos alternativos, lo que ayuda a resolver los problemas de contaminación relacionados con su eliminación. Para ello los subproductos agroindustriales deben ser analizados, para lo que deben realizarse estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, para conocer la concentración de sustancias buscada y verificar si ejercen o no algún efecto benéfico, para su utilización. Los estudios en animales permiten realizar investigaciones que de otro modo serían imposibles, especialmente aquellas que pretenden explicar mecanismos, pues habitualmente van acompañadas de modificaciones de las condiciones fisiológicas.

1 ANTECEDENTES

1.1 Alimentos funcionales

La principal tarea de la alimentación es proporcionar los nutrientes suficientes como para cumplir los requerimientos metabólicos que mantengan la salud al mismo tiempo que se pueda proporcionar al consumidor una sensación de satisfacción y de bienestar. Las investigaciones realizadas en nutrición durante la segunda mitad del siglo XX empezaron a arrojar datos acerca de la posibilidad de modular ciertas funciones de la salud mediante el consumo de alimentos fortificados o enriquecidos con elementos activos (Diplock y col., 1999) considerados “alimentos funcionales”.

1.1.1 Definición y características

El término alimento funcional fue empleado por primera vez en Japón a finales de la década de los 80 y en 1991 establecen el concepto de alimentos para uso específico en la salud “FOSHU” (Foods for Specified Health Use), donde los alimentos que se incluyen dentro de la categoría FOSHU deben estar autorizados por el ministerio de salud, previa presentación de la evidencia científica de que su consumo dentro de una dieta normal, genera beneficios para la salud (Saito, 2007).

La definición de alimento funcional aún se encuentra en desarrollo pero de acuerdo con Dentali (2002) son considerados como una nueva gama de alimentos procesados que contienen compuestos biológicamente activos como minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra dietética y/o antioxidantes; que al ser incluidos en la dieta, ofrecen beneficios para la salud o efectos fisiológicos deseables, más allá de los proporcionados por la nutrición básica.

Un alimento puede ser considerado como “funcional” si se ha demostrado claramente que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejora de la salud, el bienestar y/o reducción del riesgo de enfermedad (Diplock y col., 1999).

Un alimento o componente alimenticio funcional puede ser un macronutriente con un efecto fisiológico específico o un micronutriente, pero también puede ser un componente alimenticio que, aunque no tenga un alto valor nutritivo o no sea esencial, su consumo logre la modulación de alguna función en el organismo que reduzca el riesgo de enfermedad. Como es el caso de los ácidos grasos omega 3, la fibra, algunos microorganismos viables y prebióticos (Roberfroid, 2000).

Se considera funcional un alimento en su estado natural, o un alimento al cual se han adicionado, eliminado o modificado uno o más de sus componentes. Un alimento puede acabar siendo funcional si durante su procesado se le ha realizado cualquiera de estas operaciones: eliminación de un componente alimenticio conocido como causante o determinante de una enfermedad (ej. eliminación de la lactosa de productos lácteos), incremento en la concentración de un componente alimenticio (operación de fortificación, hace que la dosis diaria del mismo se acerque a las recomendaciones de los organismos reguladores, lo que a la larga redundará en una disminución de riesgos de enfermedad), adición de un componente que no está presente en la mayoría de los alimentos y/o incrementando la biodisponibilidad o estabilidad de un componente conocido con el objeto de producir un efecto funcional o reducir la aparición de enfermedades. (Roberfroid, 2002).

Los efectos benéficos a la salud del consumidor bajo un consumo recurrente que han sido demostrados mediante una gran diversidad de estudios *in vivo* destacan la mejora de las funciones gastrointestinales, el aporte de sistemas antioxidantes (reducción en el riesgo de contraer algunos tipos de cáncer), modulación del sistema inmunológico y la modificación del metabolismo de macronutrientes, principalmente (Barrio Merino, 2006). Sin embargo, por ser de consumo humano,

los alimentos funcionales necesitan ser seguros de acuerdo a todos los criterios definidos en las actuales regulaciones de alimentos, por lo que no cualquier material es susceptible de ser utilizado como ingrediente o aditivo funcional requiriendo la identificación y entendimiento de los mecanismo mediante los cuales un potencial alimento funcional o un compuesto funcional actúa sobre el bienestar y el estado de salud del organismo (FDA, 2006).

Los alimentos funcionales más relevantes y sobre los que recae la más sólida evidencia científica son los *probióticos*, microorganismos vivos representados fundamentalmente en los derivados lácteos fermentados. Los *prebióticos*, como los fructanos tipo inulina, son el sustrato trófico de los probióticos y potenciales selectores de la flora colónica. La asociación de un prebiótico y un probiótico es denominado *simbiótico*. Así mismo, se considera un alimento funcional a: fibra soluble e insoluble, fitosteroles, fitoestrógenos, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, derivados fenólicos, vitaminas y otros fitoquímicos (Grajek y col., 2005).

1.2 Probióticos

El tracto gastrointestinal humano se coloniza tras el nacimiento por una compleja, diversa y dinámica colección de especies bacterianas. Aunque se han descrito más de 800 especies, el 95% de los microorganismos se encuentran en el colon con concentraciones arriba de 10^{12} células por gramo de heces y forman lo que se denomina la “flora microbiana intestinal normal” (Laparra y Sanz, 2010). “La flora microbiana normal” es un delicado equilibrio que varía en cada una de las porciones del tracto gastrointestinal, además, su composición cualitativa y cuantitativa puede variar entre grupos humanos, e incluso de forma individual, debido a diferencias específicas del hospedador y/o sus hábitos alimenticios. Los componentes de esta microflora ejercen gran influencia sobre muchas características bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas del hospedador (Parodi, 1999).

1.2.1 Definición y características

De acuerdo con Fuller (1989) los “suplementos alimenticios con bacterias vivas que contribuyen a mantener el equilibrio microbiano del tracto gastrointestinal”, se denominan probióticos. Éste término fue usado por primera vez en los años sesenta, y después de varias evoluciones se puede definir como: “un microorganismo vivo que cuando se administra en la cantidad adecuada, confiere un beneficio en la salud del huésped” (Reid y col., 2003).

Las especies más utilizadas pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas y a las bifidobacterias. Dichas bacterias parecen ser claves en el mantenimiento del equilibrio microbiano necesario para la salud, como ya propusiera Metchnikoff (1907) en sus famosos postulados. Son dominantes en el tracto gastrointestinal en los primeros meses de vida y contribuyen, sin duda, a la maduración fisiológica e inmunológica de este órgano. Además, forman parte, desde tiempo atrás, de la dieta del hombre a través de diversos productos fermentados, entre los que se incluyen productos lácteos.

Algunos investigadores consideran que existen ciertas características que necesariamente debe poseer una bacteria con potencial probiótico, como son: resistencia a la acidez gástrica y a la actividad enzimática de la bilis, capacidad de adherirse al epitelio intestinal y colonizarlo, producir sustancias antimicrobianas y la modulación del sistema inmune (Dunne y col., 2001), así como poseer la capacidad de competir con microorganismos patógenos por la colonización de la pared intestinal, modificar el balance bacteriano del colon y presentar actividad bactericida contra patógenos (Barrio Merino, 2006).

1.2.2 Géneros de microorganismos utilizados como probióticos

Las especies con potencial probiótico más utilizadas pertenecen al grupo de las bacterias lácticas, a las bifidobacterias y algunas levaduras; entre los cuales se

incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, siendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, y *Lactobacillus casei* las principales especies estudiadas (Tomasik y Tomasik, 2003).

El grupo de las bacterias lácticas está conformado por cocos, cocobacilos o bacilos Gram positivos, generalmente inmóviles y no esporulados, catalasa y oxidasa negativas, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal de su metabolismo (Axelsson, 2004). Todas estas bacterias son consideradas anaerobias aerotolerantes, y al contrario de las anaerobias estrictas, no son sensibles al oxígeno por lo que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de él (Madigan y col., 2004). La mayoría de las bacterias lácticas son mesófilas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5°C y otras a 45°C. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácido y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias (algunas pueden crecer a pH 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5 (Jay, 2000).

La mayoría de las bacterias lácticas obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares (glucosa, manosa, galactosa, fructosa) y compuestos relacionados susceptibles a ser fermentados (disacáridos, oligosacáridos), por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Madigan y col., 2004; Axelsson, 2004). A pesar de esto, sus hábitats son muy variados, pudiéndoseles encontrar en la flora normal de la superficie de materiales vegetales como frutas y verduras, alimentos fermentados ricos en azúcares, leche y derivados, productos cárnicos y la mucosa del cuerpo de mamíferos como boca, tracto naso-faríngeo, gastrointestinal y vagina (Barakat y col., 2000).

1.2.3 Mecanismos de acción

Básicamente son dos los mecanismos de acción empleados por los microorganismos probióticos para beneficio de la salud del hospedero (Guarner y Malagelada, 2003):

- 1) La adherencia a la superficie epitelial (efecto barrera/función protectora) y
- 2) La producción de metabolitos que modifican el medio de forma antagónica contra los microorganismos patógenos (función metabólica y trófica).

1.3 Prebióticos

Los prebióticos son una fuente alternativa de carbohidratos para bacterias presente en el colon, generalmente probióticos, y se definen como polisacáridos no digeribles o de baja digestibilidad (resistentes a la digestión ácida y enzimática en el intestino delgado), que tienen el potencial de mejorar la salud del huésped, por estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias (probióticas y/o microflora nativa) en el colón (Gibson y col., 2004).

1.3.1 Características de prebióticos

Existen tres criterios principales que se deben tomar en cuenta para poder considerar un ingrediente alimenticio como prebiótico, dichos requerimientos se encuentran en la Tabla 1 (Gibson y Roberfroid, 1995).

Tabla 1 Criterios para la clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico

-
- Resistencia a los procesos digestivos en la parte superior del tracto gastrointestinal
 - Fermentación por la microbiota intestinal
 - Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias promotoras de la salud en la microbiota
-

El papel de los prebióticos es desempeñado por hidratos de carbono fermentables, generalmente oligosacáridos no digeribles que contienen entre 3 y 10 monosacáridos en su estructura (compuestos de bajo peso molecular), capaces de resistir la digestión en la parte superior del tracto gastrointestinal debido a que el carbono anomérico de las unidades de monosacáridos tienen una conformación que genera enlaces B-glicosídicos, los cuales no son hidrolizables por las enzimas digestivas humanas (Swennen y col., 2006).

Los prebióticos estimulan preferentemente el crecimiento de las bifidobacterias y algunas bacterias Gram-positivas (bacterias lácticas) que pertenecen a las bacterias probióticas (Rastall y Maitin, 2002). Estos carbohidratos complejos (almidón resistente, fibra dietética, oligosacáridos) son provistos en la dieta del hospedero y se convierten en disponibles para algunas bacterias del colon, los cuales al ser metabolizados generan como productos finales del metabolismo ácidos grasos de cadena corta como acetato, butirato y propionato, los cuales son utilizados por el organismo del huésped como fuente de energía (Rastall y Maitin, 2002, Manning y col., 2004) y les confieren atributos benéficos para la salud.

El ácido acético es metabolizado en el hígado, donde es transformado a Acetyl-CoA, el cual actúa como precursor para la lipogénesis, al igual que estimula la gluconeogénesis mientras el ácido propiónico es metabolizado también en el hígado, que contrario al ácido acético, inhibe la gluconeogénesis y promueve la glicolisis, reduciendo el colesterol en sangre (Rémésy y col., 1992).

El ácido butírico se ha asociado con la prevención y tratamiento de enfermedades como colitis ulcerosa, enemas y cáncer de colon (Cummings, 1997), lo cual se puede asociar con que el metabolismo de este ácido graso lo llevan a cabo células presentes en el colon. Así mismo se han hecho estudios donde se ha encontrado que estimula el aumento de la mucosa del colon, así como participan en la apoptosis de células tumorales (Meijer y col., 2010).

La relación de los ácidos grasos resultantes de la fermentación en el intestino grueso está en función de la composición del prebiótico. Algunos compuestos que se consideran prebióticos son lactulosa, xilooligosacáridos, lactosacarosa, glucooligosacáridos, isomaltooligosacáridos inulina, fructooligosacáridos y oligosacáridos de soya (Cho, 2009).

1.3.2 Clasificación

La clasificación de los compuestos prebióticos, no se encuentra totalmente definida, esta puede basarse en criterios como el origen de las sustancias, el grado de polimerización (número de monómeros) grado de fermentación o sus características fisicoquímicas. En este caso únicamente se comentará la clasificación de acuerdo al origen de las sustancias, la cual clasifica a los prebióticos en dos: sintéticos y naturales.

1.3.2.1 Prebióticos sintéticos

Los prebióticos sintéticos son obtenidos a partir de la degradación enzimática de polisacáridos como xilanos, inulina y almidones, así como por la síntesis enzimática a partir de azúcares simples como lactosa y sacarosa mediante el uso de enzimas glicosiltransferasas y glicosidasas. Ejemplos de prebióticos sintéticos son la lactulosa, xilooligosacáridos, lactosacarosa, glucooligosacáridos e isomaltooligosacáridos (Cho y Finocchiaro, 2010)

1.3.2.1.1 Lactulosa

El disacárido lactulosa fue sintetizado por primera vez en 1930. La lactulosa es fabricada por la isomerización de lactosa para generar el disacárido galactosil β -(1 \rightarrow 4) fructosa (Tamura, 1993), éste disacárido no es digerido por las enzimas intestinales de los humanos, y por lo tanto, llega a la parte inferior del intestino haciéndolo disponible para el metabolismo bacteriano. En el colon, las bacterias lo metabolizan a hidrógeno, metano y dióxido de carbono, además de producir ácido láctico, ácido acético, propionato y butirato reduciendo el pH, principalmente en el ciego (Luz Sanz y col., 2005).

1.3.2.1.2 Xilooligosacáridos

Los xilooligosacáridos son fabricados por hidrólisis enzimática del xilano proveniente de mazorcas de maíz. Los productos comerciales están compuestos predominantemente por el disacárido xilobiosa con pequeñas cantidades de oligosacáridos superiores (Yamada y col., 1993). La molécula parental, xilano, es reconocida como una fibra dietética que indica que se puede llegar al colon intacto. Okasaki y col. (1990) reportan que los xilooligosacáridos son metabolizados por la mayoría de las bifidobacterias y lactobacilos.

1.3.2.1.3 Lactosacarosa

Este carbohidrato es producido por una mezcla de lactosa y sacarosa usando la enzima β -fructofuranosidasa. El residuo fructosil es transferido desde la sacarosa al carbono de la posición uno de la glucosa, produciendo un oligosacárido no reducido (Playne y Crittenden, 1996). Kumemura (1992) encontró un incremento

significante de bifidobacterias y un decrecimiento significativo de *Clostridium*, en pacientes con estreñimiento crónico que recibieron lactosacarosa.

1.3.2.1.4 Glucooligosacáridos

Son sintetizados por acción de enzimas dextrano-sacarasa, que actúan sobre sacarosa en presencia de maltosa. Los oligosacáridos resultantes contienen enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$, además de acción enzimática, pueden ser producidos por fermentación en presencia de *Leuconostoc mesenteroides*. Djouzi y col. (1995) determinaron que los gluco-oligosacáridos son metabolizados por bifidobacterias excepto *B. bifidum*, lactobacilos y *Clostridium ssp.*

1.3.2.1.5 Isomaltooligosacáridos

La fabricación de isomaltooligosacáridos consta de la hidrólisis del almidón por la acción combinada de la α -amilasa y pululasa seguido de isomerización de los maltooligosacáridos resultantes por la α -glucosidasa que catalizan una reacción de transferencia convirtiendo los enlaces malto oligosacáridos $\alpha(1\rightarrow4)$ en enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$ (Kohmoto y col., 1991). Estudios realizados con cultivos puros de *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve* y *B. infantis* con isomaltooligosacáridos como fuente de carbono, mostraron la capacidad de metabolizarlos, con un incremento significativo en las poblaciones finales y aumento en la producción de butirato (Thammarutwasik y col., 2009).

1.3.2.2 Prebióticos naturales

Los prebióticos naturales se encuentran de forma cotidiana en las partes comestibles y estructurales de plantas, o incluso se pueden encontrar en

cantidades pequeñas en leche humana y calostro animal. Ejemplos de prebióticos naturales son los fructanos tipo inulina, galactooligosacáridos y oligosacáridos de soya (Cho y Finocchiaro, 2010).

1.3.2.2.1 Fructanos tipo Inulina

La inulina y fructanos tipo inulina han sido los prebióticos más estudiados, por su gran resistencia a ser digeridos por los ácidos gástricos y enzimas pancreáticas, llegando al colon para ser fermentados por las bacterias intestinales. Los fructooligosacáridos están caracterizados por una estructura del tipo glucosa α 1-2[β 1-2 Fructosa]_n donde $n=10^{14}$; la inulina es un polisacárido que pertenece a ésta formación donde $n=10$ (Playne y Crittenden, 1996; Roberfroid, 2008).

La inulina es uno de los principales carbohidratos encontrados en la naturaleza (después del almidón), principalmente en la familia de *Chicorium*, como la achicoria, plátano, cebolla, ajo, espárrago y alcachofa, entre otros (Thammarutwasik y col., 2009). La estructura relativa de la inulina (fructooligosacáridos de bajo peso molecular) es producida mediante una hidrólisis enzimática parcial usando una endoinulinasa o 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 Roberfroid, 1995).

La resistencia a procesos digestivos de la inulina ha sido estudiado extensivamente, siendo considerada como fibra dietética, así como demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, que estos prebióticos afectan significativamente la composición de la microbiota intestinal, reducen la incidencia de infecciones gastrointestinales, respiratorias y de la dermatitis atópica, tienen además un reconocido efecto bifidogénico (Aumento de la población de bifidobacterias en el colon) (Kolida y Gibson, 2007).

1.3.2.2.2 Galactooligosacáridos

Los galactooligosacáridos son oligosacáridos que contienen galactosa de la forma glucosa α 1-4[β 1-6 galactosa]_n, donde n= 2-5. Se pueden encontrar en leche humana, leche de vaca y yogurt además de poder ser sintetizados enzimáticamente, son obtenidos de la lactosa usando la actividad transgalactosidasa de la enzima β -galactocidasa y 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 (Gibson y col., 2004; Macfarlane y col., 2007).

También han mostrado tener influencia positiva sobre la composición y actividad de la microbiota del tracto gastrointestinal, inhibiendo microorganismos patógenos, aumenta la absorción de minerales, retarda el desarrollo de cáncer de colon y estimula del sistema inmune, esto por la hidrólisis que se lleva a cabo en el intestino grueso produciendo ácidos grasos de cadena corta, lactato y gases como H₂, CH₄ y CO₂ (Laparra y Sanz, 2010).

1.3.2.2.3 Oligosacáridos de soya

Los oligosacáridos de soya son derivados de α -galactosil-sacarosa (rafinosa, estaquiosa); son aislados de la soya y concentrados para formar el producto comercial (Crittenden, 1996). El principal oligosacárido que contiene la soya es la rafinosa. Minami (1983) estudio la fermentación de la rafinosa en cultivos puros y determinó que son metabolizados por bifidobacterias y algunas enterobacterias con excepción de *L. acidophilus*, *S. fecalis* y *E. coli*.

1.3.3 Fibra Dietética

La definición básica aceptada por los científicos de todo el mundo fue propuesta por Trowell y col. (1976) ellos afirmaron que la fibra dietética se compone de los restos de células de plantas que resisten la hidrólisis a enzimas alimentarias de humanos y que incluye todos los polisacáridos no digeribles (celulosa, hemicelulosa, oligosacáridos, pectinas, gomas, ceras) y lignina.

Actualmente la fibra dietética se define como: oligosacáridos no digeribles que se encuentran de forma intrínseca en plantas como componentes de la pared celular y/o carbohidratos de almacenamiento benéficos en el organismo al consumirlos (American Dietetic Association, 2008). Los beneficios relacionados con el consumo de fibra dietética son: el incremento en el bolo fecal lo que genera disminución del tiempo de tránsito en el tracto gastrointestinal, la estimulación de la fermentación en el colon, la disminución del índice glicémico y los niveles de colesterol en sangre, así como reduce el riesgo de padecer enfermedades coronarias, diabetes y obesidad. Además presenta propiedades fisicoquímicas con funcionalidad en sistemas alimenticios, relacionados con la capacidad de retención de agua y/o aceite, estabilidad a la emulsión y formación de geles, propiedades que pueden ser aprovechadas para modificar características sensoriales y optimizar los procesos de producción (Cho, 2009).

La fibra dietética se clasifica de una forma simplificada (Tabla 2) de acuerdo a su solubilidad, en soluble en agua (viscosa), que es fermentada en el colon por las bacterias (incluye pectinas, gomas, mucílagos, β -glucanos y algunas hemicelulosas) e insoluble en agua (no viscosa) que sólo es fermentada en una parte limitada del colon (incluye celulosa, ligninas y algunas hemicelulosas). Los alimentos más ricos en fibra, son los cereales enteros, seguidos de las legumbres y los frutos secos. Las legumbres, la avena y la cebada, poseen abundante fibra soluble. Los vegetales y granos de cereales especialmente el trigo y maíz son ricos en fibra insoluble (García Peris y col., 2000).

Tabla 2 Clasificación de la fibra según grado de solubilidad (Cho y Samuel, 2009)

Fibra	Lignina		Insolubles en agua ("fibra insoluble")
	Polisacáridos no almidónicos	Celulosa	
Hemicelulosa (tipo B)			
Hemicelulosa (tipo A)			
Pectinas			
Gomas			
Mucílagos			
Otros			

1.3.3.1 Fibra soluble

Las fibras solubles, rápidamente forman geles cuando se combinan con agua, formando un retículo, donde queda atrapada. Esto se cree que es el mecanismo por el cual las fibras solubles retardan el vaciado gástrico, aceleran el tránsito del intestino delgado y retrasan la absorción de nutrientes como glucosa desde el intestino delgado. Además, los efectos derivados de la viscosidad de la fibra son los responsables de sus acciones sobre el metabolismo lipídico, hidrocarbonado y en parte, su potencial anticarcinogénico (Kin, 2000). Este tipo de fibra la encontramos en el salvado (arroz, avena, cebada y maíz), productos de harina blanca y en algunas frutas y vegetales, especialmente leguminosas como chicharos y frijoles (Marlett, 1995).

Dos de los compuestos característicos de la fibra soluble son, la pectina y las gomas.

1.3.3.1.1 Pectina

La pectina es un polisacárido que consta de ácido galacturónico, el cual forma una cadena lineal por enlaces glicosídicos α -(1→4)-D; en la cadena de ácido poligalacturónico, se inserta α -(1→2)-L-ramnopiranososa, con lo que se forman pliegues que interrumpen la cadena lineal, dando como resultado una molécula en forma de zigzag. Se caracteriza por ser soluble en agua y no en solventes orgánicos, es estable a pH ácido de 2 a 4.5 debido a su grado de esterificación; esto permite su paso a través del tracto gastrointestinal sin ser absorbido hasta llegar al colon donde la microbiota (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacteroides*) es capaz de producir enzimas degradadoras de pectina (Endress y Mattes, 2009).

La pectina es consumida diariamente en la dieta, puesto que se encuentra en la pared celular de las frutas y vegetales, como en la manzana, o bien adicionada como ingrediente de alimentos procesados como quesos y yogurt donde son empleados para mejorar firmeza o como agentes gelificantes (Auerbach y col., 2006). Su consumo genera un aumento en la población microbiana benéfica del tracto gastrointestinal, incrementando los niveles de producción de ácidos grasos de cadena corta y gases como metano, dióxido de carbono e hidrógeno, afectando positivamente la salud del organismo del hospedero (Endress y Mattes, 2009).

1.3.3.1.2 Gomas

Las funciones clave de las gomas en alimentos funcionales son espesar, gelificar, emulsificar, suspender carbohidratos solubles en agua y estabilizar. La goma guar es extraída de semillas de leguminosas como *Cyamopsis* originaria de África, Australia y Estados Unidos. Su nombre químico es D-galacto-D-manano, compuesto por galactosa y manosa. Es soluble en agua y al mezclarse genera un gel, cuya viscosidad depende de la longitud de la cadena del galactomanano; se demostró que el galactomanano es fermentado por la microflora intestinal con

producción de ácidos grasos de cadena corta (Kapoor y Juneja, 2009). La goma arábica es la resina de tallos y ramas del árbol de Acacia, que crecen en zonas específicas de África. Químicamente se trata de un polisacárido con cantidades variables de D-galactosa, D-arabinosa, L-ramnosa y algunos ácidos derivados del ácido urónico. Es soluble en agua y es metabolizada en el intestino grueso por bacterias ácido lácticas con producción de ácidos grasos (Baray, 2009).

1.3.3.2 Fibra insoluble

Las fibras insolubles o poco solubles son capaces de retener el agua en su matriz estructural formando mezclas de baja viscosidad; esto produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal. Es la base para utilizar la fibra insoluble en el tratamiento y prevención de la constipación crónica. Por otra parte también contribuye a disminuir la concentración y el tiempo de contacto de potenciales carcinogénicos con la mucosa del colon (Kin, 2000). Alimentos con alto contenido de fibra insoluble se encuentran en el salvado de trigo, palomitas de maíz, arroz integral, cereales, pastas, leguminosas, frutas y vegetales como la cáscara de papa, brócoli, plátano y la manzana (Marlett, 1995). Uno de los compuestos característicos de la fibra insoluble es la celulosa.

1.3.3.2.1 Celulosa

La celulosa es un polímero lineal de unidades de β -1,4-D-glucopiranosas, forma parte de la estructura primaria de todas las plantas verdes, haciéndolo uno de los biopolímeros más abundantes de la tierra y uno de los componentes cotidianos de la dieta. La insolubilidad en agua de la celulosa es causada por la estructura cristalina. Llega a ser fermentada en el intestino grueso en humanos y herbívoros por bacterias como *Bacteroides succinogenes* y *Clostridium lochhradii*; como resultado genera el aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta,

su metabolismo en el intestino delgado refleja disminución de los lípidos y la estimulación de células epiteliales (Takahashi, 2009).

1.4 Subproductos Agroindustriales

Los subproductos agroindustriales son resultado de la transformación, comercio o bien consumo directo de frutas y hortalizas. Los desechos agroindustriales son aproximadamente entre el 40 y 55% del total de la producción, convirtiéndose en un gran inconveniente para las empresas, dando altos volúmenes que se deben de manejar (Henao y col., 2011).

Debido al aumento de la producción, su eliminación representa un problema cada vez mayor; ya que el material vegetal es generalmente propenso al deterioro microbiano. Los subproductos agroindustriales se utilizan a menudo como fertilizante o simplemente son desechados como desperdicio; actualmente la aplicación de dichos subproductos en bioprocesos ofrece una amplia gama de sustratos alternativos, lo que ayuda a resolver los problemas de contaminación relacionados con su eliminación (Mamma y col., 2009).

En la última década, las frutas y hortalizas han recibido mucha atención como fuentes de sustancias biológicamente activas. Alrededor del 99% del total de polisacáridos naturales se encuentran en frutas y vegetales, que por consiguiente representan una importante fuente renovable de estos biopolímeros (Henao y col., 2011).

Los concentrados de fibra dietética procedentes de frutas y hortalizas tienen buenas cualidades nutricionales, pudiendo ser utilizados en la industria de alimentos como ingredientes funcionales con excelentes resultados. Los cereales han sido la fuente tradicional, aunque últimamente se están usando las frutas y hortalizas como fuentes de fibra dietética para fortificar alimentos. La característica más relevante de estas fuentes es su gran disponibilidad y bajo costo, pues muchas de ellas son subproductos agroindustriales que representan un problema

de contaminación; sin embargo, existe un considerable interés por la industria de alimentos en el aprovechamiento de estos residuos, recuperando una valiosa biomasa y diversos nutrientes (Serena y Bach, 2007).

En la Tabla 3 se muestran algunos de los subproductos agroindustriales originados por el procesamiento de cereales, frutas y vegetales, en ella se aprecia la elevada concentración de fibra dietética disponible que no es aprovechada (Elleuch y col., 2011).

Tabla 3 Contenido de fibra dietética total (FDT) en subproductos agroindustriales

Fuente de fibra	FDT (%)
Salvado de arroz	44
Salvado de trigo	88
Salvado de maíz	62 – 77
Cáscara de lima	67 – 70
Bagazo de manzana	78 – 90
Cáscara de naranja	64
Cáscara de toronja	44 – 63
Cáscara de limón	60 – 68

1.4.1 Subproductos agroindustriales como fuente de fibra y posibles prebióticos *in vitro*

En los últimos años se han analizado varios subproductos agroindustriales, de los cuales se ha determinado su composición química y potencial prebiótico *in vitro*.

Como resultado del procesamiento de la naranja, queda como residuo la cáscara y el albedo. El albedo de cáscara de naranja, es una buena fuente de oligosacáridos de pectina, los cuales se ha demostrado que presentan un efecto prebiótico (Hotchkiss y col., 2003); así mismo el empleo de la cáscara de naranja completa mostró un efecto prebiótico al aumentar la concentración de bifidobacterias al trabajar con heces de humano *in vitro* (Manderson y col., 2005).

El contenido de fibra dietética y la composición bromatológica de diferentes subproductos como cáscara de plátano, jícama, tuna, mango, piña, manzana, zanahoria, albedo de toronja y hojas de maguey fueron estudiados por Chávez-Zepeda y col. (2009), los cuales reportaron contenidos de fibra dietética total superiores a los reportados por cereales (principal fuente de fibra); de los cuales destacan la piña, tuna y albedo de toronja con porcentajes superiores al 55% de fibra dietética total, seguidos por plátano, jícama y manzana, que presentan porcentajes entre 48-56% y finalmente zanahoria, mango y hoja de maguey con los porcentajes más bajos entre 33-47%.

Parra-Matadamas (2011) realizó estudios con los subproductos de cáscara y albedo de toronja, cáscara de piña y cáscara de tuna, como fuente de fibra, compuestos antioxidantes y sustratos potenciales para ser fermentados por las bacterias probióticas termotolerantes. Dichos subproductos agroindustriales mostraron concentraciones mayores al 50% de fibra dietética total. La harina de los cuatro subproductos fueron susceptibles de ser fermentados por las bacterias *P. pentosaceus* y *A. viridans*.

Gómez-Chávez y col. (2011) evaluaron el efecto prebiótico *in vitro* de la harina de cacao en el crecimiento de *P. pentosaceus* UAM 22 comparándolo con glucosa. Obtuvieron cuentas superiores con la harina de cacao, por lo que se adicionó a un batido cárnico, el cual además fue inoculado con bacterias lácticas. *Pediococcus pentosaceus* presentó buena adaptación al desarrollarse en presencia de la harina de cacao, incrementando su cuenta a lo largo del periodo de almacenamiento, situación que evidencia el potencial prebiótico de la harina de cacao, que además

confirió un aumento en la cohesividad del batido cárnico sin modificar la elasticidad, afectando la textura del producto final.

Tabernero y col. (2011) realizaron una fermentación *in vitro* de fibras dietéticas obtenidas tanto de cereales como de frutas, de las cuales observaron una mayor producción de butirato cuando la fibra dietética era obtenida de frutas.

Viuda-Martos y col. (2012) encontraron que el bagazo de la granada contiene 50.3% de fibra dietética, de la cual 20% es fibra dietética soluble, la cual sugieren puede ser fermentada por la microflora del tracto gastrointestinal, jugando un papel importante en la prevención del cáncer de colon.

Díaz-Vela y col. (2012) determinó el potencial prebiótico de albedo de naranja, inulina de chicoria e inulina de Agave para el crecimiento de dos bacterias lácticas termotolerantes: *Pediococcus pentosaceus* y *Aerococcus viridans*, donde el albedo de naranja favorece un crecimiento mayor de bacterias lácticas probióticas sobre fuentes de inulina y glucosa, obteniendo valores menores en el tiempo de duplicación.

Hernández-Alcántara (2013) realizó estudios de actividad prebiótica *in vitro* con los subproductos agroindustriales de manzana, papa, plátano, mango y zanahoria; los cuales incrementaron la población de la cepa probiótica *P. pentosaceus* (exceptuando cáscara de mango) pero, además la cáscara de manzana y el bagazo de zanahoria incrementaron la población de *Lactobacillus rhamnosus*. Así mismo se reportaron contenidos de fibra dietética total entre 43-55% para los subproductos de bagazo de zanahoria, cáscara de plátano, cáscara de mango, cáscara de zanahoria y valores inferiores para cáscara de manzana y cáscara de papa (35% y 17% respectivamente).

Trila y col. (2014) determinaron que la harina de tamarindo contiene 19.30% de fibra dietética total y una fracción de fibra soluble de 4.29%, sugiriendo que la harina de tamarindo presenta un alto contenido de celulosa, el cual puede ser empleado como aditivo por sus características funcionales y tecnológicas, cuya concentración de fibra insoluble, puede ejercer algún efecto prebiótico en el tracto gastrointestinal inferior.

1.4.2 Subproductos agroindustriales como prebiótico *in vivo*

La utilización de modelos animales de experimentación es una importante herramienta en la investigación y verificación de las propiedades benéficas derivadas del consumo de prebióticos.

Existen diferentes especies animales que son utilizadas en experimentación, sin embargo, la rata es un modelo animal con frecuencia empleado debido a características como tamaño pequeño, docilidad, costo y fácil de mantener. La rata es un mamífero y omnívoro, al igual que el hombre, lo que permite que sus dietas sean relativamente comparables, sin embargo existen diferencias en su aparato digestivo. La rata posee un saco voluminoso identificado como ciego que está localizado entre la parte distal del intestino delgado (el íleon) y la parte proximal del colon, allí se almacena el material no digerible y es fermentado por acción de las bacterias. En el colon de la rata, el tiempo de retención del contenido intestinal es corto con una rápida deshidratación y formación de las heces. En contraste, en el ser humano el intestino grueso es el mayor sitio de retención de las materias no digeribles y es allí donde sucede la mayor interacción de las sustancias fermentables con las bacterias intestinales. A pesar de esta diferencia, la rata es un modelo animal que permite una excelente investigación de los procesos que ocurren en el ambiente intestinal y es por ello que ha sido utilizada previamente en algunos estudios para la investigación asociada con alimentos funcionales (López y col., 2001; Montesi y col., 2005).

Sembries y col. (2003) determinaron que al adicionar bagazo de manzana a la dieta de ratas, este se convierte en un sustrato altamente fermentable por la microbiota del intestino, encontrando que el acetato y propionato, son los ácidos grasos de cadena corta que más se producen.

Monro y col. (2012) incorporaron fibra de cebada a dieta de ratas Sprague-Dawley, determinando que esta fibra podría promover la salud intestinal de mejor manera que la inulina, ya que al cuantificar la microflora del colon, no observaron diferencia significativa, sin embargo observaron que la fisiología del tejido del

colon de las ratas cuya dieta estaba adicionada con fibra de cebada aumento la profundidad de las criptas.

Paturi y col. (2012) encontraron que cuando ratas Sprague-Dawley son alimentadas con fibra de papa, no presentan diferencia significativa respecto a inulina en la producción de ácidos grasos de cadena corta, así mismo determinaron que la concentración de polisacáridos no digeridos para estas dos dietas fue semejante ($P < 0.05$), dichos parámetros se asocian con la fermentación de la fibra en el ciego, lo que indica que son susceptibles de ser fermentadas por la microflora del tracto gastrointestinal inferior.

1.4.3 Bagazo de manzana

La manzana (*Malus domestica*) es una de las frutas más cultivadas del mundo, tan solo en el año 2010 de acuerdo con la Asociación Mundial de Manzana y Pera (WAPA por sus siglas en inglés; the World Apple and Pear Association), se registró una producción de 60.5 millones de toneladas (WAPA, 2013). En México la producción nacional durante el 2011, registró un récord de 630,500 millones de toneladas (Ojeda, 2012).

Existen diferentes variedades de manzana; entre las cuales se encuentran Boskoop, Braeburn, Bramley, Cameo, Cortland, Cox Orange, Cripps Pink, Elstar, Empire, Fuji, Gala, Golden Delicious, Granny Smith, Idared, Jonagold, Jonathan, Lobo, McIntosh, Red Delicious, entre otras (WAPA, 2013). Las variedades más cosechadas en territorio mexicano son: Red Delicious, Golden Delicious, Rome Beauty, la Gala y criollas. Entre las criollas se encuentra la variedad rayada producida en el Estado de Puebla (Metropolitano, 2011).

Los usos de la manzana principalmente son: para la elaboración de jugos, sidra, mermeladas, vinagre, botanas (deshidratados) y su consumo directo. Como subproducto agroindustrial resultante de la industria de fabricación de sidra y jugo; principalmente, queda el bagazo de manzana. Este subproducto está formado por

la piel, el mesocarpio del fruto exprimido, las semillas y los rabos del fruto. Se calcula que se obtienen unos 20 kg de subproducto por cada 100 kg de manzana que entra en el proceso, aunque la cifra puede ser muy variable. El bagazo de manzana se caracteriza por presentar elevado contenido de azúcares solubles, bajo porcentaje de proteína y presencia de diversos compuestos orgánicos tales como ácidos orgánicos, pectinas, ceras y taninos (Manterola y col., 1999).

En el estado de Puebla, México, en la región de Zacatlán, considerado cuna de la sidra. Para esta actividad, se destina el 90 por ciento de las 10 mil toneladas de manzana variedad rayada que se producen anualmente en la región (Metropolitano, 2011), de lo cual queda el bagazo de manzana como subproducto agroindustrial, lo que representa aproximadamente 15 - 20% de las toneladas de manzana procesada, que posteriormente son desechadas.

En estudios anteriores se demostró que los constituyentes principales de fibra dietética encontrados en la manzana son la celulosa, hemicelulosa y pectina, de los que se ha demostrado que son buenos substratos de fermentación de las bacterias intestinales (Van Laere y col., 2000).

Así mismo se han hecho estudios en los que se ha incorporado a dietas de ratas subproductos agroindustriales resultantes del procesamiento de la manzana. Aprikian y col. (2001) encontraron que ratas alimentadas con manzana liofilizada, se produjo una caída significativa en el colesterol en plasma e hígado; con aumento de excreción de colesterol en las heces de las ratas, lo que sugiere una reducción en la absorción del colesterol, mientras que Wolfe y col. (2003) al adicionar cáscara de manzana, determinaron que tiene una potente actividad antioxidante y en gran medida puede inhibir el desarrollo de cáncer de hígado, así como células cancerosas en el colon.

Figuerola y col. (2005) encontraron que la cáscara de manzana presenta un contenido de fibra dietética entre 70 - 80% mientras que Sudha y col. (2007) determinaron que la pulpa de manzana procedente de la industria de jugo de fruta, presentó un contenido de 51.1% indicando un alto contenido de fibra dietética.

Los efectos fisiológicos de la fibra dietética provienen en gran medida de su fermentación colónica, es decir, debido a su efecto prebiótico. Este proceso es fundamental, ya que gracias a él se produce el mantenimiento y el desarrollo de la flora bacteriana, como también de la integridad y fisiología de las células epiteliales, lo que es relevante para la absorción y metabolismo de nutrientes. Como resultado de esta fermentación bacteriana, se produce hidrógeno, dióxido de carbono, gas metano y los ácidos grasos acético, propiónico y butírico (Valenzuela y Maíz, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto prebiótico tanto *in vivo* como *in vitro* del bagazo de manzana (*Malus domestica* var. *rayada*)

2.2 Objetivos Particulares

Caracterizar bromatológica y microbiológicamente el bagazo de manzana residuo de la elaboración de la sidra.

Evaluar el efecto prebiótico del bagazo de manzana *in vitro*.

Determinar las características fisiológicas y microbiológicas en ratas (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar por efecto de la incorporación del bagazo de manzana como fuente de fibra.

3 JUSTIFICACIÓN

La manzana (*Malus domestica*) es una de las frutas más cultivadas del mundo, tan solo en el año 2012 se produjeron 76.4 millones de toneladas, de las cuales el 20% fue destinado a consumo directo, mientras que el restante es empleado para la producción de bebidas (jugo, néctar, sidra). La producción nacional en México durante el año 2011 registró 630,500 toneladas, del cual 9,600 toneladas fueron producidas en el pueblo de Zacatlán de las Manzanas, Puebla. El 90% de la producción es destinado a la elaboración de sidra, que da como resultado 2,000 toneladas de bagazo de manzana, del cual su eliminación representa un problema cada vez mayor; ya que el material vegetal es generalmente propenso al deterioro microbiano.

Se ha encontrado que el bagazo de manzana presenta un valor aproximado de fibra dietética de 60-90%, el cual generalmente es desechado, y podría ser empleado como un ingrediente funcional en el procesamiento de nuevos productos alimenticios. Es por esto que se decidió realizar estudios con el bagazo de manzana, en los que se evaluó si los beneficios de la salud gastrointestinal están asociados a un posible efecto prebiótico, pues ya se ha demostrado que algunos oligosacáridos de fibras de subproductos agroindustriales son fermentables por la microbiota del tracto gastrointestinal y que metabolitos de dichas fermentaciones están asociados con la prevención de la aparición o apoptosis de células cancerígenas; obteniendo así de forma natural y a bajo costo un potencial ingrediente funcional.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en tres etapas: en la primera se realizó la caracterización del bagazo de manzana bromatológicamente y microbiológicamente, en la segunda etapa se evaluó la capacidad prebiótica *in vitro* mientras que en la tercera se realizó la incorporación del bagazo de manzana en la alimentación de ratas *Rattus norvegicus* cepa Wistar (estudio *in vivo*). Durante las etapas dos y tres se utilizó como control un prebiótico, inulina de Agave (inulinas comerciales: Nano Nutrition, S. de R. L. de C. V.; Naucalpan, Edo. de México), la cual está compuesto por 98% de fibra soluble y 3% de monosacáridos.

En las Figuras (1, 2 y 3) se muestra el diagrama de flujo de las etapas de la investigación.

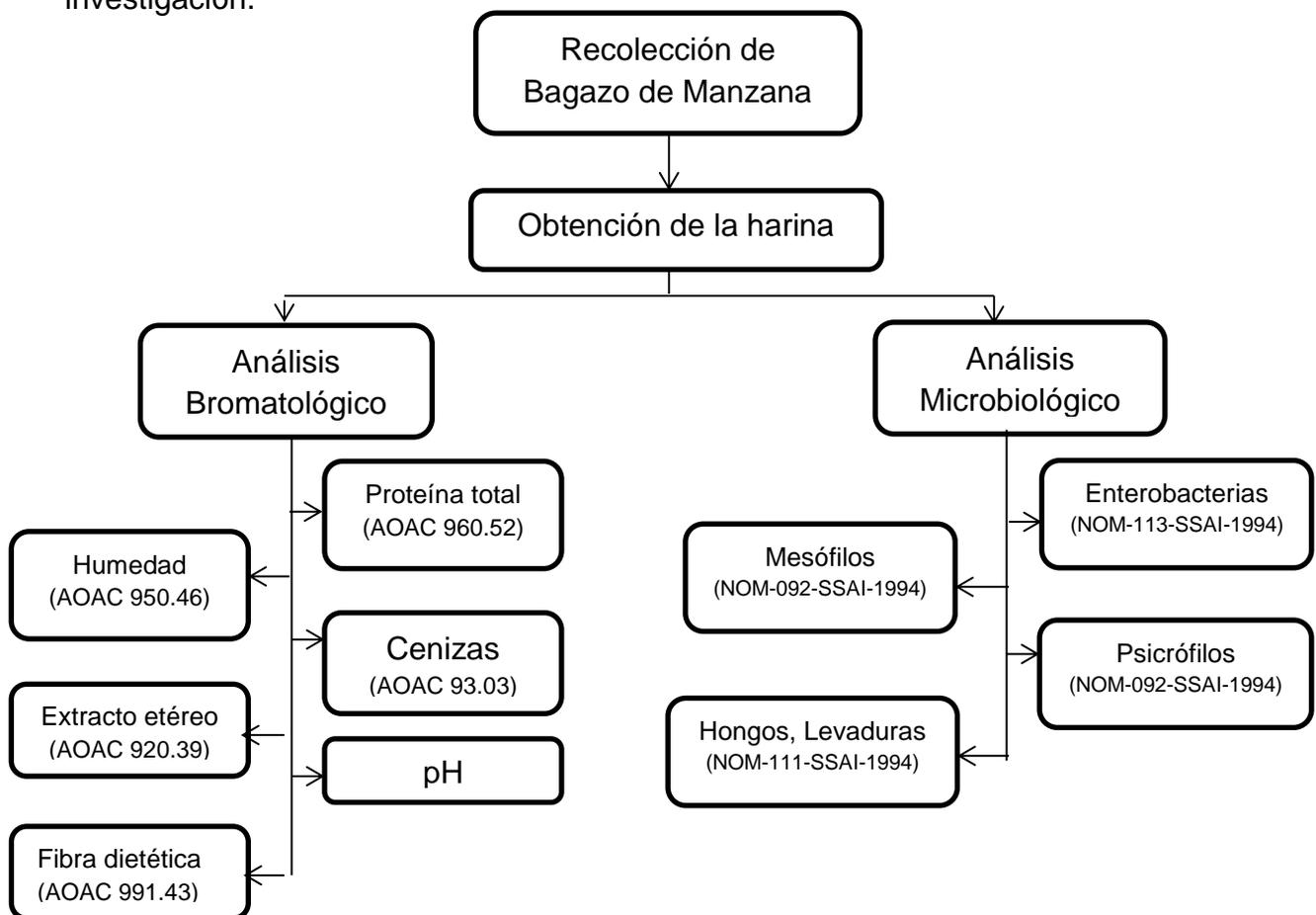


Figura 1 Diagrama de flujo de la caracterización bromatológica y microbiológica del bagazo de manzana.

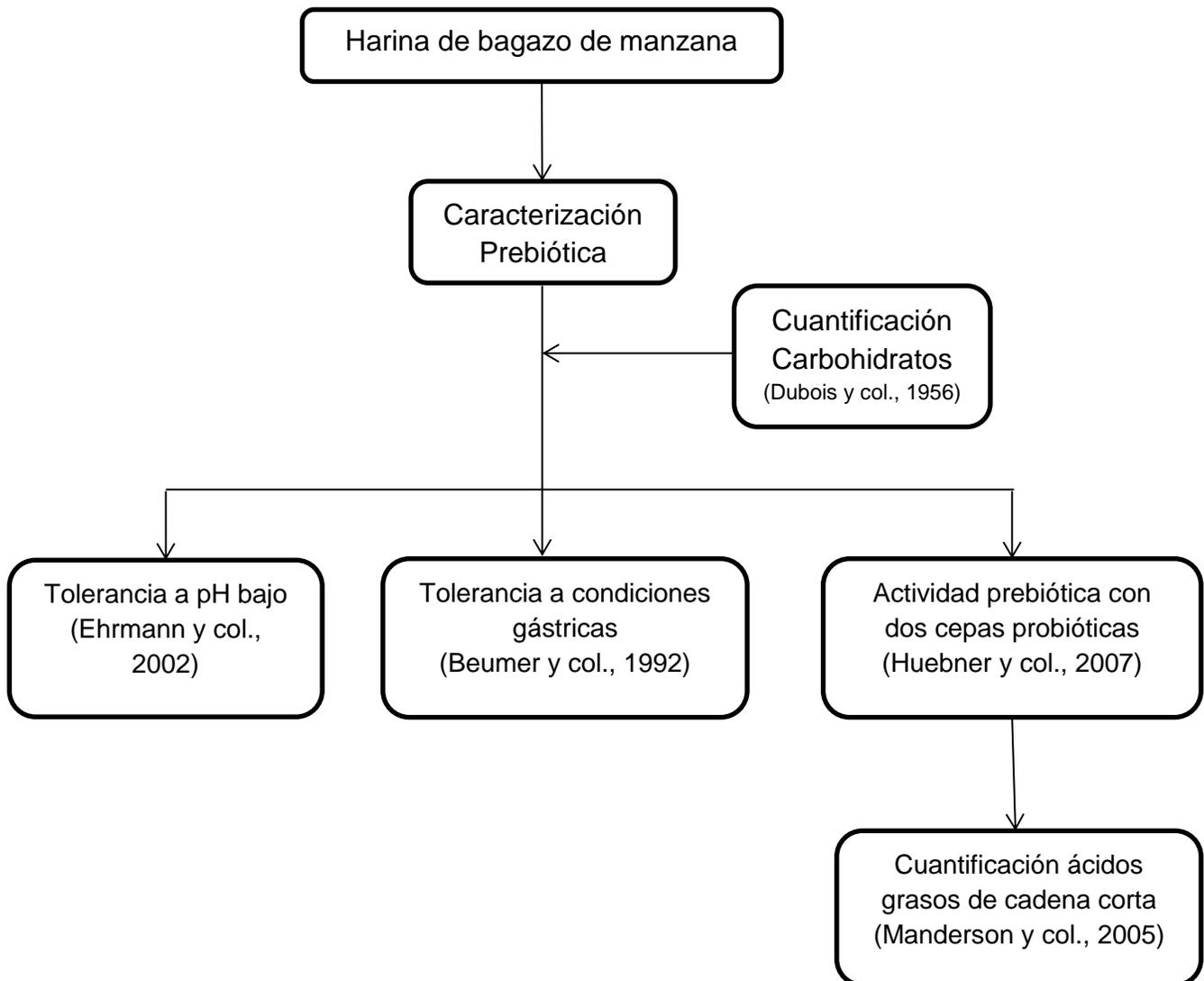


Figura 2 Diagrama de flujo de la caracterización prebiótica *in vitro* del bagazo de manzana.

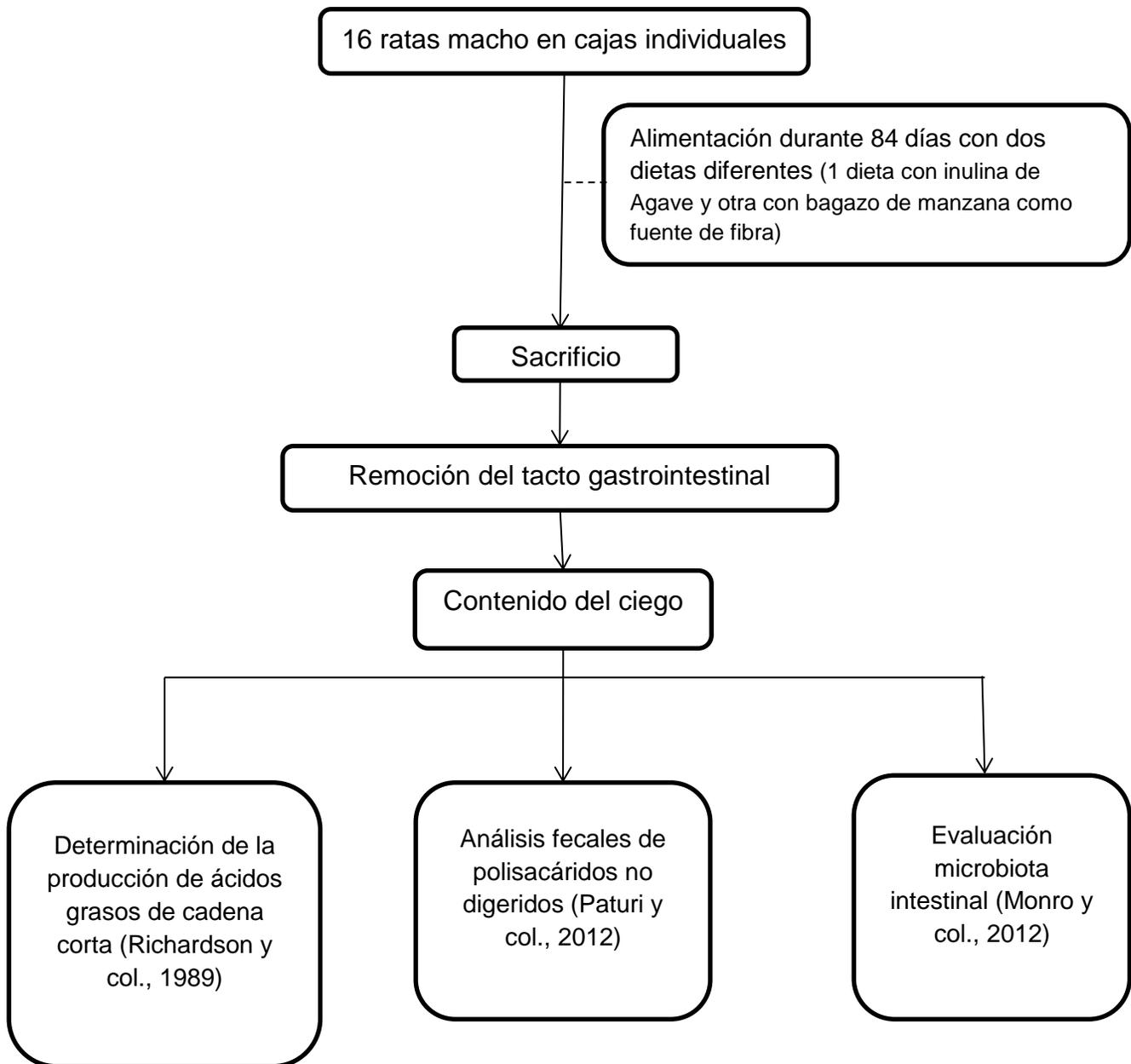


Figura 3 Diagrama de flujo para la determinación de las características fisiológicas y microbiológicas en ratas.

4.1 Primera etapa: Caracterización del bagazo de manzana

4.1.1 Obtención de harina de bagazo de manzana (*Malus domestica*)

El bagazo de manzana se recolectó de las Bodegas Delicias, en Zacatlán Puebla, inmediatamente después de que pasó por el proceso de prensado, se llevó al laboratorio y se procedió a secarlas en charolas de aluminio en un deshidratador a 65°C durante el tiempo necesario para eliminar la humedad (ocho horas aproximadamente) o hasta que presentó un peso constante. Posteriormente, se molió en un procesador de alimentos convencional y por último, el producto obtenido se tamizó con malla No. 100 y 80 para homogenizar el tamaño de partícula, la cual fue empacada al vacío y almacenada en un lugar seco y fresco a temperatura ambiente hasta su uso.

4.1.2 Caracterización bromatológica del bagazo de manzana

4.1.2.1 Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó de acuerdo con el método oficial de prueba No. 950.46 de la AOAC (1996). Se pesaron 2 g de muestra en cápsulas de aluminio a peso constante y se colocó 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.

4.1.2.2 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).

Principio: Determinación del nitrógeno presente en la muestra al digerirlo con una mezcla de ácido sulfúrico en presencia de catalizadores (sales de cobre, mercurio o selenio) y convertirlo en sulfato de amonio. La muestra digerida se neutralizó con una base (NaOH) en un proceso de destilación, recogiendo el destilado sobre ácido bórico y titulando el amoníaco (NH₄OH) recogido con un ácido estandarizado.

Se colocó 1 g de muestra en los tubos digestores, se adicionó 5 g de la mezcla digestora (Merck) y 20 mL de H₂SO₄ concentrado. Las muestras se digirieron hasta que se alcanzó un color verde claro y se dejó enfriar. A continuación se destiló en un equipo Labconco Rapidstill I (Labconco Corporation, Kansas City, Missouri), recibiendo el destilado en 50 mL de una solución de ácido bórico al 4% hasta recolectar aproximadamente 150 mL. Finalmente se tituló el destilado con una solución valorada de HCl 0.1 N. El porcentaje de proteína total se calculó con la siguiente ecuación, convirtiendo el valor obtenido a proteína al multiplicar el resultado por el factor 6.25.

$$\%Nitrógeno = \frac{(mL\ HCl\ gastados - mL\ blanco)(N\ del\ HCl)(0.014)}{g\ de\ muestra}$$

4.1.2.3 Determinación de pH

Se empleó la metodología de acuerdo al método oficial de prueba del AOAC (1996), para ello, 1 g de muestra se mezcló con 100 mL de agua destilada, posteriormente se midió el pH de la mezcla homogénea con un potenciómetro (Beckman, Palo Alto, California).

4.1.2.4 Determinación de cenizas

El porcentaje de cenizas se determinó de acuerdo al método oficial de prueba AOAC (1996). Los crisoles fueron colocados a peso constante, dejándose enfriar para registrar su peso en una balanza analítica. Se agregaron 2 g de muestra en los crisoles y pre-incineraron exponiéndolos a la flama de un mechero. Las muestras preincineradas, se colocaron en una mufla a una temperatura de 550 °C hasta obtener cenizas blancas o grisáceas. Los crisoles se colocaron en un desecador para que alcancen la temperatura ambiente, se registró su peso y se determinó el porcentaje de cenizas por diferencia de peso.

4.1.2.5 Determinación de grasa (extracto etéreo)

Se pesaron 2 g de muestra seca sobre un papel filtro para ser depositados dentro de un cartucho de celulosa el cual se tapó con algodón; todo este material se trabajó a peso constante (AOAC, 920.39).

Se empleó el equipo Soxhlet y éter de petróleo como solvente para extraer el contenido graso de las muestras. Después se corroboró que no hubieran residuos de grasa en las muestras tratadas, al dejar caer una gota del solvente sifonado sobre un trozo de papel filtro y esperar a que se evaporara el solvente, los cartuchos se colocaron en una estufa a 60° C para secarlos y posteriormente enfriarlos en un desecador. Finalmente, se determinó el contenido de extracto etéreo por diferencia de peso en el cartucho completo (muestra, papel filtro, cartucho y algodón).

4.1.3 Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico, 10 g de bagazo de manzana fueron disueltos en 90mL de agua destilada y se hicieron diluciones sucesivas hasta 10^{-4} . Una vez

preparadas las muestras se inocularon 100 μ L de muestra para determinar el crecimiento de enterobacterias (NOM-113-SSAI-1994), cuenta total (NOM-092-SSAI-1994), hongos y levaduras (NOM-111-SSAI-1994) en las muestras, por lo que los medios de cultivo utilizados en cada caso fueron: agar bilis y rojo brillante, agar nutritivo y agar papa dextrosa, respectivamente. Se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 h, para el caso de hongos y levaduras se incubaron durante 48 h. Posteriormente se realizó el conteo de colonias en un cuenta colonias (SOL-BAT Aparatos Científicos, México).

4.1.4 Determinación del contenido de fibra dietética total

Se llevó a cabo el procedimiento enzimático-gravimétrico oficial de la AOAC (991.43) para la determinación del contenido de fibra dietética. Para ello, la harina de bagazo de manzana, subproducto agroindustrial a ensayar, en primera instancia se gelatinizó por acción de la enzima α -amilasa termoestable (Sigma-Aldrich, USA). Después de la gelatinización, las muestras se digirieron mediante el empleo de las enzimas proteasa y amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich, USA) con la finalidad de eliminar la proteína y el almidón contenido en las muestras. A continuación a cada muestra se le adicionaron cuatro volúmenes de etanol al 95% para precipitar la fracción soluble de la fibra, se filtraron y se realizó el lavado de la misma con tres volúmenes de etanol al 78% y dos volúmenes de etanol al 95%, y finalmente con dos volúmenes de acetona. Los residuos obtenidos se sometieron a un secado a 60°C y posteriormente se determinó su peso.

4.2 Segunda etapa: El bagazo de manzana como prebiótico *in vitro*

4.2.1 Fermentación del bagazo de manzana por dos cepas probióticas

4.2.1.1 Cuantificación de carbohidratos totales

La determinación del contenido de carbohidratos totales se efectuó con el objetivo de establecer la cantidad de carbohidratos disponibles en la harina del subproducto agroindustrial, bagazo de manzana, misma que pudiera ser aprovechada para el crecimiento de las bacterias lácticas. De esta manera será posible ajustar la cantidad de harina que se incorporó en el medio de cultivo y llevar a cabo las cinéticas de crecimiento bajo el porcentajes de fuente de carbono a ensayar 1.0%.

La cuantificación de carbohidratos se efectuó de acuerdo a la metodología descrita por Dubois y col. (1956). Se trata de una técnica colorimétrica resultante de la reacción del fenol en presencia de ácido sulfúrico, que permite determinar de manera cuantitativa azúcares y sus derivados metilados, oligosacáridos y polisacáridos. Para determinar la cantidad de carbohidratos en las harinas de los diferentes subproductos analizados, se preparó una solución acuosa de 100 mL con 1 g de harina. La disolución se calentó a 60°C y se mantuvo en agitación constante durante 1 h. Se hizo reaccionar 1 mL de cada solución con 1mL de fenol al 5% y 5 mL de H₂SO₄ concentrado (los tubos se dejan enfriar previo a su lectura). Se determinó la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 490 nm. La cantidad de carbohidratos totales se cuantificó usando una curva de calibración de glucosa en el rango de 0 - 100 µg/mL. Los resultados se expresaron como mg de glucosa /g de muestra.

4.2.1.2 Activación de bacterias lácticas

La cepa de bacteria ácido láctica termotolerante probiótica empleada en este trabajo fue *Pediococcus pentosaceus* UAM 22 aislada e identificada previamente por Ramírez-Chavarín y col. (2010) a partir de productos cárnicos cocidos mexicanos; así mismo se empleó la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG (un prebiótico comercial) como control, ambas se encontraban conservadas en una mezcla de glicerol-caldo MRS (50:50) a -80°C . Se tomó una alícuota de 0.5 mL de cada uno de los viales de las cepas y se reactivaron en caldo MRS a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

4.2.1.3 Estandarización del inóculo

Como paso previo para iniciar las fermentaciones, se realizó la estandarización del inóculo de cada una de las cepas de bacterias lácticas estudiadas. Para ello, se tomó una alícuota del 1% del medio de activación que será adicionado al medio de estudio: peptona de caseína-extracto de levadura suplementado con glucosa a una concentración del 0.5% y 1% respectivamente, y en el medio usado como control, caldo MRS. Los diferentes medios se incubaron a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo necesario para alcanzar una densidad óptica a una longitud de onda a 600 nm tal que correspondiera a un conteo celular de 1×10^7 UFC/mL.

A partir del ensayo anterior, se determinó el tiempo necesario para obtener dicha cuenta celular; las cuales fueron empleadas en las cinéticas realizadas.

4.2.1.4 Fermentaciones

El potencial de las harinas del bagazo de manzana para permitir el crecimiento de las bacterias lácticas termotolerantes se evaluó mediante la realización de fermentaciones con base en la metodología descrita por Bustamante y col. (2006).

Las fermentaciones se llevaron a cabo en el medio Peptona Caseína-Extracto de Levadura suplementado con 1.0% de la harina de bagazo de manzana o inulina, empleada como control. Los medios fueron inoculados con 1 mL de la cepa activada y estandarizada, incubándolos en estático a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 10 - 24h.

4.2.1.5 Evaluación del crecimiento celular

El monitoreo se realizó cada hora en que se llevó a cabo la fermentación. Se tomó una alícuota de 0.1 mL y se efectuaron diluciones decimales seriadas, a partir de ésta, en solución salina isotónica (0.9% NaCl) para realizar la siembra de las diluciones apropiadas en placas de agar MRS. Las placas se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 - 48 horas en jarras de anaerobiosis para realizar el conteo celular.

Los resultados fueron expresados como Log UFC/mL. A partir de los datos obtenidos, se calcularon las tasas específicas de crecimiento (k) y los tiempos de duplicación (g) para la cinética, empleando las siguientes ecuaciones (Willey y col., 2008):

Ecuación 1

$$k = \frac{\text{Log } N_t - \text{Log } N_o}{0.301 * t}$$

Ecuación 2

$$g = \frac{1}{k}$$

Dónde:

k = tasa específica de crecimiento (h^{-1})

g = tiempo de duplicación (h)

t = tiempo correspondiente al intervalo analizado (h)

N_t = número de bacterias al final de la fase exponencial.

N_0 = número inicial de bacterias al inicio de la fase exponencial.

La fermentación será realizada por duplicado así como la toma de muestras.

4.2.1.6 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

Para la determinación de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico), se tomaron alícuotas de 2 mL a los tiempos 0, 5 y 10 h de fermentación. El análisis se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Manderson y col. (2005). Se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases empleando un equipo HP 5890 Series II (Perkin Elmer, Shelton) utilizando una columna AT- 1000 (10 m x 0.250 mm), detector de ionización de flama, con N_2 como gas de arrastre, a un flujo de 1 mL/min y una rampa de temperatura (90 - 120°C \pm 5°/min).

4.2.2 Estimulación selectiva de crecimiento de bacterias benéficas

4.2.2.1 Actividad Prebiótica

Los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento también fueron empleados para determinar la actividad prebiótica del bagazo de manzana, para

ello se empleó el modelo propuesto por Huebner y col. (2007), la cual se basa en la capacidad de un sustrato específico para favorecer el crecimiento de un organismo específico (probiótico) en relación a otros organismos, respecto al crecimiento con un sustrato no prebiótico como la glucosa, sin embargo, en este estudio se comparó contra un prebiótico ya probado (inulina) para evaluar la similitud del efecto prebiótico respecto a ésta.

Actividad Probiótica

$$= \left[\frac{\left(\log \frac{UFC \text{ probiótico}}{mL \text{ prebiótico}} t_{10h} - \log \frac{UFC \text{ probiótico}}{mL \text{ prebiótico}} t_{0h} \right)}{\left(\log \frac{UFC \text{ probiótico}}{mL \text{ inulina}} t_{10h} - \log \frac{UFC \text{ probiótico}}{mL \text{ inulina}} t_{0h} \right)} \right] - \left[\frac{\left(\log \frac{UFC \text{ entérica}}{mL \text{ prebiótico}} t_{10h} - \log \frac{UFC \text{ entérica}}{mL \text{ prebiótico}} t_{0h} \right)}{\left(\log \frac{UFC \text{ entérica}}{mL \text{ inulina}} t_{10h} - \log \frac{UFC \text{ entérica}}{mL \text{ inulina}} t_{0h} \right)} \right]$$

4.2.3 Resistencia a procesos digestivos

4.2.3.1 Tolerancia a pH ácido

Pediococcus pentosaceus UAM 22 fue reactivada, posteriormente incubada en caldo MRS a 37 ° C por 24 h, pasado el tiempo se centrifugo a 5000 g por 10 min a 4° C y la pastilla celular obtenida fue lavada dos veces con solución de buffer fosfatos (pH 7.2), y resuspendida en buffer de fosfatos. Esta solución fue inoculada 1/100 en buffer de fosfatos a pH 0.5, 1, 2,3, 4 o 5, como propuso Ehrmann y col. (2002) además de ser adicionados cada uno de bagazo de manzana e inulina a una concentración del 1%, respectivamente. Se tomaron muestras por duplicado a la 1, 2 y 4 h de incubación, las cuales fueron transferidas a agar MRS e incubadas a 37° C por 24 - 48 h.

4.2.3.2 Tolerancia a condiciones gástricas

Siguiendo la metodología propuesta por Beumer y col. (1992). *Pediococcus pentosaceus* UAM 22, fue reactivada y posteriormente incubada a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ en caldo MRS, hasta obtener una densidad óptica de 0.405 a $\lambda=600 \text{ nm}$ (concentración semejante a 10^8 UFC/mL). Después de la incubación, $10 \mu\text{L}$ fueron inoculados en 10 mL de jugo gástrico simulado (fuente de carbono (inulina y bagazo de manzana) 3.5 g/L, NaCl 2.05 g/L, KH_2PO_4 0.6 g/L, CaCl_2 0.11 g/L, KCl 0.37 g/L, bilis porcina 0.05 g/L, Pepsina 13.3 mg/L) a pH 2.0, los cuales fueron incubados a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 90 min. Las muestras fueron tomadas durante los tiempos de 0, 30, 60 y 90 minutos, fueron diluidas a 10^{-1} y 10^{-2} , de cada dilución se tomaron $100 \mu\text{L}$ y fueron inoculadas en cajas que contenían agar MRS e incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 48h.

4.3 Tercera etapa: El bagazo de manzana como prebiótico *in vivo*

4.3.1 Animales y Alojamiento

Se utilizaron ratas machos (*Rattus norvegicus*) cepa Wistar, estos animales fueron criados en el Departamento de Investigación Experimental y Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Los animales fueron utilizados de acuerdo al Reglamento para la obtención, mantenimiento y utilización de animales para investigación del INCMNSZ, basado en la Norma Oficial Mexicana para la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), además de la Ley General de la Salud y su reglamento (1985), así como en los lineamientos internacionales para la investigación biomédica con animales (Bankowski, 1985).

Se ordenaron aleatoriamente 16 ratas en dos grupos experimentales (n=8) en jaulas independientes. La alimentación se basó en dos tipos de dieta: dieta adicionada con inulina (control) y una dieta experimental, adicionada con harina de bagazo de manzana. A cada una de las ratas se les proporcionó diariamente *ad libitum* el alimento durante 84 días. La Tabla 4 muestra las diferentes formulaciones de la dieta, la cual se basó en la dieta AIN-93 G (Reeves y col., 1993).

Tabla 4 Formulaciones de la dieta para el crecimiento de las ratas

Ingredientes (g/Kg)	Dieta con inulina de Agave	Dieta con bagazo de manzana
Almidón de maíz	397.5	397.5
Caseína	200	200
Maltodextrina	132	132
Sacarosa	100	100
Aceite de soya	70	70
Inulina de Agave	50	-
Harina de Bagazo de Manzana	-	50
Mezcla de minerales	35	35
Mezcla de vitaminas	10	10
L-cistina	3	3
Bitartrato de colina	2.5	2.5

4.3.2 Características Fisiológicas

4.3.2.1 Ganancia en peso de las ratas

Las ratas se pesaron una vez por semana con ayuda de una balanza analítica y un contenedor individual; para registrar el crecimiento y establecer la fecha de término del experimento.

4.3.2.2 Eutanasia

Al término del experimento, los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de ketamina/xilacina (10 y 1 mg/100g peso, respectivamente). Una vez perdidos los reflejos ocular y patelar. Inmediatamente se asegurará la eutanasia por dislocación cervical y se procederá a la disección.

4.3.2.3 Determinación de la producción de ácidos orgánicos en el ciego

Para la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta se utilizó la metodología propuesta por Richardson y col. (1989) con algunas modificaciones. Se analizó el contenido del ciego el cual se colectó inmediatamente después del sacrificio del animal, se almacenó a -80°C hasta su análisis. El estudio se realizó mediante Cromatografía de Gases utilizando un Cromatógrafo HP 5890 Series II (Perkin Elmer, Shelton) con una columna AT-1000 (10 m x 0.250 mm), detector de ionización de flama, N₂ como gas de arrastre, un flujo de 1mL/min y una rampa de temperatura ($90-120^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}/\text{min}$). Las muestras fueron descongeladas y mezcladas con 8mL de una solución compuesta de NaCl (0.9%) p/v y Tween 20 (0.1%), además de 1 mL de estándar interno (ácido 2-etil butírico, 100 mM) por cada gramo de muestra. La extracción de ácidos orgánicos se realizó con ácido clorhídrico y éter dietílico. Las muestras fueron centrifugadas a 1600 g durante 15 minutos hasta separar la fase acuosa y orgánica. Las muestras se almacenaron por 48 horas antes de su análisis.

4.3.2.4 Análisis fecales de polisacáridos no digeridos

Para la determinación de polisacáridos no digeridos se utilizaron las heces fecales, las cuáles se secaron por congelación, se molieron finamente y se almacenaron a

temperatura ambiente. La fibra dietética total fecal fue determinada de acuerdo a la metodología propuesta por Paturi y col. (2012). En un tubo de ensaye se colocaron 100 mg de muestra, después se realizaron dos lavados con 5 mL de etanol al 80% y se centrifugaron para colectar el residuo. El residuo fue lavado con 2 mL de acetona y secado con aire a 60°C. Posteriormente, el residuo se hidrolizó usando 1 mL de ácido sulfúrico 12 M (35°C durante 1h), después se adicionaron 7 mL de agua destilada y se calentó a 100°C durante 1 h. Los polisacáridos totales en el hidrolizado fueron determinados como azúcares reductores usando el método de ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

4.3.3 Características microbiológicas

4.3.3.1 Evaluación de la microbiota intestinal

El análisis microbiológico se realizó siguiendo la metodología reportada por Monro y col. (2012). Inmediatamente después del sacrificio, el contenido del ciego se removió asépticamente y se preparó para el examen microbiológico. Un gramo del contenido del ciego se pesó y se puso en un tubo de plástico que contenía 9 ml de caldo glicerol para evitar modificaciones cualitativas y cuantitativas de la microbiota, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Posteriormente se descongeló y se realizaron las diluciones necesarias, utilizando PBS (buffer fosfato salino pH 7.2), 1 ml de cada dilución se puso en cajas de Petri por triplicado. Los microorganismos que se buscaron fueron bacterias Acido Lácticas, Bifidobacterias, Enterobacterias y Bacteroides spp. Para el conteo de bacterias ácido lácticas se utilizó el medio MRS (De Man y col., 1960). Para Bifidobacterias se usará Agar TPY (Tripona-Peptona-Extracto de levadura), para Enterobacterias se usará Agar Bilis y Rojo Violeta y para Bacteroides spp. el agar Infusión Cerebro-Corazón. Las condiciones de crecimiento se realizaron en jarras de anaerobiosis (Gaspak system) a 35 °C durante 48 h.

4.4 Diseño experimental

4.4.1 Primera etapa

Para la primera etapa del estudio, los resultados obtenidos de la caracterización bromatológica, microbiológica y cuantificación de fibra dietética se realizó una desviación estándar.

4.4.2 Segunda etapa

Los resultados para la caracterización prebiótica que implicaron las fermentaciones (T_i^*), la evaluación del crecimiento celular, la actividad prebiótica así como la resistencia a procesos digestivos (T_i^*) fueron analizados de manera independiente por ANOVA ($P < 0.05$) de dos factores de acuerdo al modelo presente en la Ecuación 3 propuesta por Montgomery (2006). De igual manera la cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta se analizó por medio de ANOVA ($P < 0.05$) de tres factores, el modelo que se empleó para el análisis se presenta en la Ecuación 4.

Ecuación 3

$$y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ij} = es el número de células viables al i-ésimo nivel del tipo de bacteria probiótica ó tiempo, para el j-ésimo nivel del tipo de prebiótico

μ = es la media global del modelo

T_i = es el efecto de la bacteria probiótica ($i = P. pentosaceus$ UAM22; $L. rhamnosus$ GG)

τ_i^* = es el efecto del tiempo (i= 0, 30, 60, 90 min)

β_j = es el efecto del tipo de prebiótico (j= bagazo de manzana; inulina de Agave)

ϵ_{ijk} = es el error experimental

Ecuación 4

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

y_{ij} = es la concentración ($\mu\text{mol/mL}$) de ácido graso de cadena corta al i-ésimo nivel del tipo de cepa, para el j-ésimo nivel de tipo de prebiótico, para el k-ésimo nivel del tiempo

μ = es la media global del modelo

τ_i = es el efecto de la bacteria probiótica (i= *P. pentosaceus* UAM22; *L. rhamnosus* GG)

β_j = es el efecto del tipo de prebiótico (j= bagazo de manzana; inulina de Agave)

γ_k = es el efecto del tiempo (k = 0, 5 y 10 h)

$\tau\beta\gamma_{ijk}$ = es el efecto de la interacción de la cepa probiótica y el prebiótico a través del tiempo.

ϵ_{ijkl} = es el error experimental

4.4.3 Tercera etapa

Los resultados asociados al estudio *in vivo* de ganancia en peso y consumo de alimento fueron analizados por ANOVA ($P < 0.05$) de dos factores, de acuerdo al modelo descrito en la Ecuación 5, así mismo el análisis de los resultados de la cuantificación de ácidos grasos de cadena corta se realizó por medio de un

ANOVA ($P < 0.05$) de un factor (Ecuación 6) y finalmente los resultados del análisis microbiológico del contenido del ciego fueron analizado por ANOVA ($P < 0.05$) de dos factores, de acuerdo al modelo que se describe en la Ecuación 7. Los animales por grupo fueron considerados como repeticiones. Los resultados de las mediciones paralelas por muestra solo se promediaron antes del análisis estadístico; los valores promedios se analizaron a través de la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Ecuación 5

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ij} = es el peso en gramos al i-ésimo nivel del tipo de bacteria probiótica ó tiempo, para el j-ésimo nivel del tipo de prebiótico

μ = es la media global del modelo

τ_i = es el efecto del tiempo ($i = 1, 2, 3, 4, \dots, 13$ semanas)

β_j = es el efecto del tipo de prebiótico ($j =$ bagazo de manzana; inulina de Agave)

ε_{ijk} = es el error experimental

Ecuación 6

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ij} = es la concentración ($\mu\text{mol/mL}$) de ácido graso de cadena corta al i-ésimo nivel del tipo de prebiótico

μ = es la media global del modelo

τ_i = es el efecto del tipo de prebiótico (j= bagazo de manzana; inulina de Agave)

ϵ_{ijk} = es el error experimental

Ecuación 7

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ij} = es el número de células viables al i-ésimo nivel del tipo de microorganismo, para el j-ésimo nivel de tipo de prebiótico

μ = es la media global del modelo

τ_i = es el efecto del tipo de microorganismo (i= bacterias lácticas, bifidobacterias, bacteroides y enterobacterias)

β_j = es el efecto del tipo de prebiótico (j= bagazo de manzana; inulina de Agave)

$\tau\beta_{ij}$ = es el efecto de la interacción del tipo de microorganismo y el tipo de prebiótico.

ϵ_{ijk} = es el error experimental

Todos los datos, tanto para la primer etapa como la segunda y tercera fueron analizados utilizando el programa estadístico NCSS, 2007.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Primera etapa

La primera etapa comprende la evaluación bromatológica, microbiológica así como la determinación de fibra de la harina de bagazo de manzana.

6.1.1 Caracterización bromatológica del bagazo de manzana

Para poder emplear un ingrediente alimenticio es necesario conocer su composición química, es por esto que se realizó un análisis bromatológico al bagazo de manzana. En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de humedad, proteína, cenizas y grasa (extracto etéreo) contenidos en la harina de bagazo de manzana (*Malus domestica*) variedad Rayada, así como el pH.

Tabla 5 Composición bromatológica de la harina de bagazo de manzana variedad Rayada (base seca)

Propiedad Química	g/100g
Humedad	10.32 ± 0.18
Proteína	3.93 ± 0.12
Cenizas	3.49 ± 0.03
Extracto etéreo	2.55 ± 0.36
pH	3.49 ± 0.03

Figuerola y col. (2005) analizaron bromatológicamente tres variedades diferentes de bagazo de manzana (Royal Gala, Granny Smith y Liberty), ellos encontraron valores para proteína de 3.1, 3.6 y 3.7%, para cenizas de 1.9, 1.2 y 0.5% y para

grasa de 1.6, 4.5 y 2.4%, estos valores se asemejan tanto en contenido proteico como en el contenido de grasa, la variedad Liberty, es la única donde los valores son más bajos en cuanto al contenido de cenizas, valores semejantes también fueron encontrados por Ktenioudaki y col. (2013) donde ellos lo atribuyeron a las diferencias en los requerimientos nutricionales aportados por el suelo del lugar, el clima en el que se desarrollan, y el estado fisiológico de madurez en el que fueron podados.

Por otro lado, la concentración obtenida de humedad fue de 10.32% la cual se encuentra dentro de los límites permisibles para las harinas (NOM-147-SSA1-1996) la cual es de 15.5%. Sin embargo, Hernández-Alcántara (2013) obtuvo una concentración de humedad de 22.17% esta diferencia se atribuyó a que en este estudio se trabajó con bagazo de manzana, el cual sufre un proceso de molienda del fruto completo y en el estudio de Hernández-Alcántara se utilizaron solo cáscaras.

El pH obtenido fue de 3.49, el cual es un pH ácido que se debe por la presencia en mayor proporción de ácido málico. Valores reportados de pH de bagazo de manzana son 3.71 (Eisele y Drake, 2005).

6.1.2 Caracterización microbiológica del bagazo de manzana

En la Tabla 6 se muestra la calidad microbiológica evaluada a la harina de bagazo de manzana, la cantidad de microorganismos mesófilos encontrada fue de 20 UFC, de hongos y levaduras 310 UFC y no se encontró la presencia de enterobacterias ni psicrófilos.

El bagazo de manzana que se obtiene como residuo en la elaboración de la sidra, es un producto que normalmente se desecha, constituyendo por lo tanto un desperdicio agroindustrial y solo una pequeña cantidad es utilizada en la alimentación de animales, por lo que no existe ninguna Norma que lo legisle, es por esto que se decidió comparar los resultados con la NOM-147-SSA1-1996, la

cual reporta el número de microorganismos presentes en productos como harina de trigo, maíz, centeno, cebada, avena, arroz y harinas integrales, que si bien no son el mismo producto evaluado en esta tesis (harina de bagazo de manzana), son productos que sufren un procesamiento semejante y además son empleados como aditivos en la formulación de varios productos alimenticios.

Tabla 6 Calidad Microbiológica de la harina de bagazo de manzana variedad Rayada

Microorganismo	UFC/g
Mesófilos	20
Hongos y levaduras	310
Enterobacterias	-
Psicrófilos	-

La harina de bagazo de manzana se encuentra dentro de los límites permisibles por esta Norma, ya que contiene 20 UFC/g de mesófilos mientras que la Norma maneja un intervalo de 50,000 a 100,000 UFC/g.

Respecto a hongos y levaduras, la Norma marca un límite de 100 a 1000 UFC/g y en este estudio se encontraron 310 UFC/g, esto podría indicar que, el secado del bagazo de manzana es suficiente para asegurar la calidad microbiológica de la harina elaborada.

La cantidad de microorganismos encontrada se ve asociada al pH de 3.49 que presenta, ya que aunque los microorganismos pueden crecer en amplios intervalos de pH, cada especie tiene un cierto rango de pH para su crecimiento, como es el caso de los acidófilos que como su nombre lo indica, presentan afinidad por un pH ácido; cuyo intervalo de crecimiento va de 0 a 5.5 (Willey y col., 2008), rango en el que está el pH de la harina de bagazo de manzana variedad Rayada analizada, pero, son pocas las bacterias acidófilas que se podrían

encontrar en la manzana, sin embargo, los hongos son microorganismos que prefieren entornos más ácidos, por lo que su crecimiento fue mayor.

6.1.3 Cuantificación de fibra dietética en bagazo de manzana

La fibra dietética nos indica la presencia de polisacáridos que no pueden ser digeridos por las enzimas alimentarias de humanos, estos polisacáridos forman parte de la pared celular de plantas (Trowell y col., 1976; American Dietetic Association, 2008). La fibra dietética, al ser consumida, confiere beneficios a la salud gastrointestinal. De acuerdo a la solubilidad de la fibra, se divide en soluble e insoluble. La fracción soluble rápidamente forma geles al combinarse con agua retardando el vaciado gástrico y acelerando el tránsito del intestino delgado, sin embargo la fracción insoluble, produce un aumento de la masa fecal que acelera el tránsito intestinal (Kin, 2000).

En la Tabla 7 se muestran los valores encontrados para la harina de bagazo de manzana, la cual presentó valores de fibra dietética total de 71%, de la cual el 59.81% corresponde a la fibra insoluble y el 11.10% de fibra soluble.

Tabla 7 Composición de la fibra dietética en la harina de bagazo de manzana

Fibra Dietética	g/100g
Soluble	11.10 ± 0.90
Insoluble	59.81 ± 4.87
Total	70.91 ± 1.30

Figuerola y col. (2005) reportaron la concentración de fibra dietética en tres variedades distintas de bagazo de manzana la cual va desde 61 hasta 90% lo cual se puede atribuir a que la variedad influye respecto a la cantidad de fibra

presente en el fruto exprimido, además de que la mayor concentración de fibra dietética se encuentra en la cáscara (Goristein y col., 2001).

La relación de fibra insoluble y soluble, es importante porque ambas fracciones, son complementarias para las propiedades funcionales como la capacidad de retención de agua o aceite y capacidad emulsificante (Moraes-Crizel y col., 2013), en donde se ha observado que cuando la relación de la fibra dietética insoluble > soluble, se presenta una buena aceptación como ingrediente funcional para productos cárnicos (Fernández-López y col., 2008), panificación o helados (Ramírez y Pacheco, 2009), como se encontró en el bagazo de manzana una proporción de 5:1, por lo que puede ser considerada para emplearse en la elaboración de alimentos como agente espesante o emulsificante. Sudha y col. (2007) encontraron concentraciones de fibra insoluble en una proporción 3:1 en bagazo de manzana, y lo emplearon para la elaboración de pasteles. El ingerir concentraciones altas de fibra insoluble genera efectos pronunciados sobre la regulación intestinal y volumen de las heces, además de dar una sensación de saciedad (Schneeman, 1987).

Se han estudiado diferentes subproductos agroindustriales como fuente de fibra, González-Centeno (2010) estudió el bagazo de uva reportando un porcentaje de fibra de hasta 40 % dependiendo de la variedad. Moraes-Crizel y col. (2013) reportaron concentraciones de fibra en el bagazo y cáscara de la naranja de 64%, las semillas de maracuyá 65% y el bagazo de granada 50.3% (Viuda-Martos y col., 2012) y la cáscara de plátano 49.9% (Emaga y col., 2007), comparados con estos resultados, el bagazo de manzana endémico del estado de Puebla contiene una concentración mayor de éste compuesto.

La principal fuente de fibra dietética son los cereales, los cuales contienen aproximadamente entre 60 y 80%, en este estudio se encontró que la harina de bagazo de manzana variedad Rayada endémica de Puebla contiene un 71% por lo cual se convierte en una buena fuente de fibra dietética para ser utilizada en alimentos, además de que, se ha demostrado que la fibra dietética presente en

vegetales y frutas es más aprovechada por la microbiota del colon respecto a la proveniente de cereales (Cummins, 2001).

5.2 Segunda etapa

La segunda etapa comprende la evaluación del bagazo de manzana *in vitro*, cumpliendo los tres requisitos principales que son: susceptibilidad a la fermentación por bacterias probióticas, estimulación selectiva del crecimiento de bacterias benéficas y no de patógenas y la resistencia a procesos digestivos. Los resultados obtenidos se compararon con la inulina, debido a que este es un prebiótico comercial.

5.2.1 Fermentación del bagazo de manzana utilizando dos cepas probióticas

5.2.1.1 Fermentaciones

Para llevar a cabo las fermentaciones se emplearon dos cepas de bacterias, una probiótica comercial (*Lactobacillus rhamnosus* GG) y una aislada de productos cárnicos (*Pediococcus pentosaceus* UAM22) identificada como probiótica termotolerante (Ramírez-Chavarín y col., 2010; 2013).

Para emplear la harina de bagazo de manzana fue necesario conocer la concentración de azúcares totales presentes en la harina de bagazo de manzana, para ajustar la concentración de carbohidratos que se incluirían en el medio de cultivo Tripona-Peptona-Extracto de levadura. La harina de bagazo de manzana presentó una concentración de azúcares totales de 77.46 ± 0.06 %, por lo que se determinó que era necesario adicionar 1.29 ± 0.02 g al medio de cultivo Tripona-Peptona-Extracto de levadura, para con ello alcanzar una concentración de 1% de carbohidratos (resultados previos en el laboratorio mostraron un mayor

crecimiento con esta concentración). La concentración adicionada de inulina de Agave al medio de cultivo fue de 1 g, ya que se consideró que la concentración de azúcares totales de dicho producto, al ser refinado, era del 100%.

En la Figura 4 se muestran las cinéticas de crecimiento de *L. rhamnosus* GG, utilizando inulina de Agave y bagazo de manzana como fuente de carbono, ambas fuentes de carbono son susceptibles a ser fermentadas por este microorganismo, siendo el bagazo de manzana donde la bacteria presenta una mayor cuenta celular.

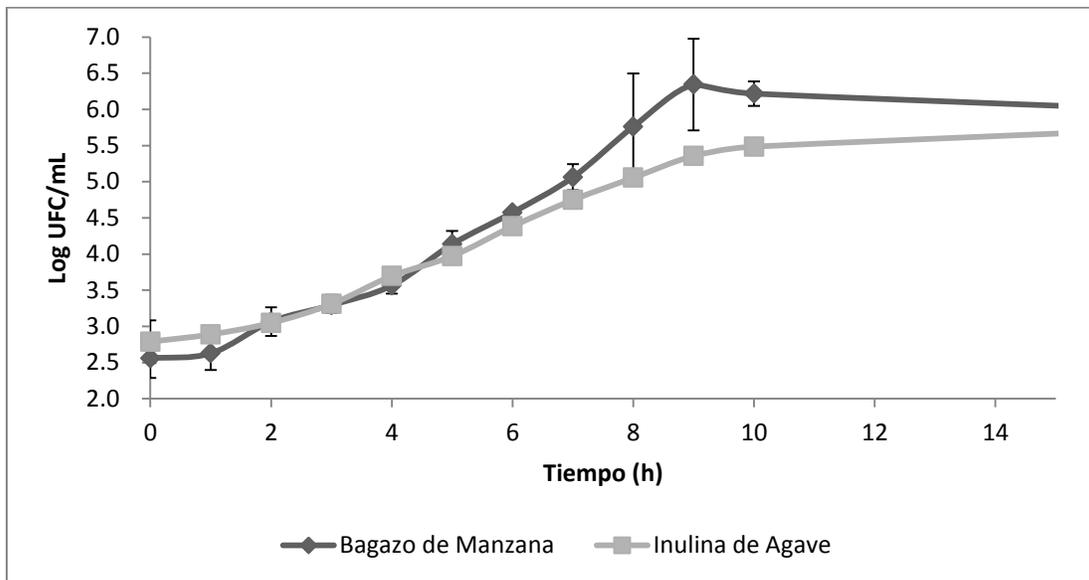


Figura 4 Cinéticas de crecimiento para *Lactobacillus rhamnosus* GG con bagazo de manzana e inulina de Agave al 1% como fuente de carbono

Así mismo, se puede observar que desde el inicio del experimento (tiempo 0), hasta el tiempo 7, con ambas fuentes de carbono presenta la misma tendencia de crecimiento ($P > 0.05$), sin embargo, a partir de la octava hora comienza a despuntar el crecimiento de *L. rhamnosus* cuya fuente de carbono fue la harina de bagazo de manzana ($P < 0.05$), esto mismo se observa durante las siguientes dos horas, donde el crecimiento de *L. rhamnosus* se ve favorecido con el bagazo de manzana respecto a inulina de Agave ($P < 0.05$). No obstante, al llegar al tiempo

final de la cinética de crecimiento (24h) con ambas fuentes de carbono, la cuenta de microorganismos no presentó diferencia significativa ($P>0.05$).

La fase exponencial para ambas fuentes de carbono inicia a la primera hora y en la novena se alcanzó el máximo de crecimiento con una cuenta de 6.34 ± 0.63 y 5.36 ± 0.04 log UFC/mL ($P<0.05$), para la fuente de carbono de bagazo de manzana e inulina de Agave, respectivamente.

En la Figura 5, se muestran las cinéticas de crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* UAM22 utilizando harina de bagazo de manzana e inulina como fuente de carbono, se observa que tanto inulina de Agave como bagazo de manzana son susceptibles a ser fermentadas por *P. pentosaceus* UAM22 presentando el mismo comportamiento a lo largo del ensayo ($P>0.05$). La fase exponencial durante la fermentación de ambas fuentes de carbono comenzó a la primera hora del ensayo y el crecimiento máximo se obtuvo en la octava hora.

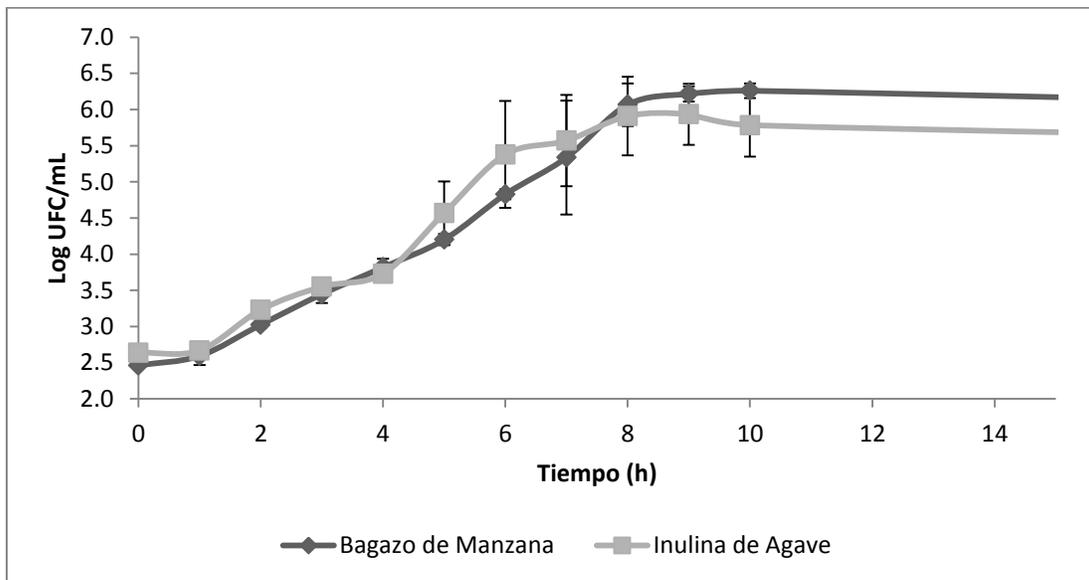


Figura 5 Cinéticas de crecimiento para *Pediococcus pentosaceus* UAM22 con bagazo de manzana e inulina de Agave al 1% como fuente de carbono

Ambas cepas probióticas al ser integradas en un sistema con fuentes de carbohidratos complejas, resultó favorable, observándose que ambas bacterias probióticas fueron capaces de adaptarse y por consiguiente metabolizar fructooligosacáridos, principal compuesto de la inulina de Agave (Thammarutwasik y col., 2009) y distintos compuestos oligoméricos presentes en el bagazo de manzana, que se encuentran en mayor proporción respecto a la cantidad de monómeros de glucosa (Suni y col., 2000). En estudios anteriores se ha determinado que los factores principales para emplear los carbohidratos durante la fermentación son su estructura química, grado de polimerización, composición de unidades monoméricas, así como el grado de solubilidad (Biedrzycka y Bielecka, 2004).

La inulina está formada por fructooligosacáridos, los cuales se componen de unidades de fructosa unidas por enlaces glucosídicos β (1-2). Para que este sustrato sea metabolizado, el microorganismo debe poseer la enzima β -fructofuranosidasa capaz de hidrolizar este tipo de enlaces, y formar monómeros lo que permite que este microorganismo lo metabolice (Rossi y col., 2005), por lo que se puede inferir que ambas cepas probióticas empleadas en el estudio poseen este tipo de enzima, debido a su capacidad para desarrollarse en un medio cuya única fuente de carbono fue la inulina de Agave.

Por otro lado, el bagazo de manzana presenta sustancias pectínicas, solubles en agua lo que favorece su susceptibilidad a ser fermentadas (Schneeman, 1987) por lo que podría suponerse que las bacterias utilizan este carbohidrato complejo, al observarse un óptimo crecimiento con esta fuente de carbono. Existen reportes donde se sometió a fermentación pectina aislada de distintas frutas el cual resulto ser fermentable por la microbiota de heces de humanos sanos en estudios *in vitro* (Casterline y col., 1997; Manderson y col., 2005). Es por esto que se puede suponer que las bacterias probióticas empleadas en el estudio presentan la enzima 2-ceto-3-dioxi-6-fosfogluconato aldolasa, una enzima que cataliza el metabolismo del ácido galacturónico (Slováková y col., 2002), siendo este compuesto el principal componente de la pectina.

Las bacterias lácticas pueden ser homofermentativas o heterofermentativas, cuya principal fuente de carbono es la glucosa, así mismo son capaces de metabolizar azúcares como fructosa, manosa y galactosa, siendo la fructosa uno de los principales azúcares presentes en el bagazo de manzana (Suni y col., 2000). Sin embargo, las bacterias lácticas probióticas tienen el potencial de emplear carbohidratos complejos, obteniendo de ellos la fuente de carbono, puesto que poseen enzimas degradadoras de pectina, α -galactosidasas, β -fructofuranosidasas, β -glucosidasa o β -glucuronidasa (Amaretti y col., 2006; Dabek y col., 2008). La fracción soluble del bagazo de manzana está constituida principalmente por pectina, en este trabajo se reporta una concentración de 11% de fibra soluble que suponemos es pectina, Cho (2009) reportó una concentración de 20%, por otro lado la fracción insoluble está compuesta de celulosa, la cual es poco fermentable (Scheneeman, 1987), sin embargo con una menor fracción de fibra soluble presente en el bagazo de manzana se puede obtener el mismo comportamiento que al suministrar una fuente de fibra 100% soluble (inulina de Agave).

5.2.1.2 Evaluación del crecimiento celular

La capacidad de adaptación al medio de cultivo por parte de una bacteria se ve reflejada obteniendo algunos parámetros como la tasa específica de crecimiento (k) y el tiempo de duplicación (g), donde k es la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial de un cultivo, mientras g es el tiempo que tarda una población en duplicar su tamaño durante la fase exponencial en donde el número de nuevas bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población presente (Willey y col., 2008).

Los parámetros antes mencionados fueron determinados para las dos cepas probióticas empleadas con cada una de las dos fuentes de carbono fermentadas, los valores obtenidos se pueden apreciar en la Tabla 8, donde se observa que *L. rhamnosus* GG en el medio de cultivo cuya fuente de carbono es bagazo de

manzana, presenta una tasa específica de crecimiento mayor (1.56 h^{-1}) ($P < 0.05$) a la que incluía inulina de Agave, lo que significa a su vez que es la fuente de carbono que permite un menor tiempo de duplicación (0.64h) de dicha bacteria láctica. Por otro lado *P. pentosaceus*, no presentó diferencia significativa ($P > 0.05$) respecto a la fuente de carbono en la tasa específica de crecimiento, ni en el tiempo de duplicación.

El metabolismo de carbohidratos está en función de la presencia o ausencia de enzimas capaces de hidrolizarlos y es conocido que durante la fase de adaptación de los microorganismos se produce la síntesis de enzimas, entre otras moléculas.

Tabla 8 Tasa específica de crecimiento (k) y tiempo de duplicación (g) para *L. rhamnosus* GG y *P. pentosaceus* UAM22 con dos de fuente de carbono.

	<i>L. rhamnosus</i> GG		<i>P. pentosaceus</i> UAM22	
	BM	IA	BM	IA
k (h^{-1})	1.56 ^a	1.07 ^b	1.26 ^b	1.12 ^b
g (h)	0.64 ^a	0.93 ^b	0.79 ^b	0.89 ^b
Actividad Probiótica	0.49±0.03 ^a		0.40±0.02 ^b	

^{abc} Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia significativa ($P < 0.05$)

BM=Bagazo de manzana; IA= Inulina de Agave

Dado que el tiempo de adaptación (Figura 4 y 5) para ambos microorganismos con ambas fuentes de carbono, no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$), se puede decir que en el caso de emplear *L. rhamnosus* GG o *P. pentosaceus* UAM22 en medios con fuentes alternativas de carbono fueron capaces de sintetizar en las primeras horas de adaptación las enzimas necesarias para hidrolizar carbohidratos más complejos teniendo como consecuencia una buena adaptación al medio de cultivo. Sin embargo es preciso mencionar que *L. rhamnosus* GG (0.49) al emplear el bagazo de manzana como fuente de carbono presenta una

fase exponencial mayor ($P < 0.05$) (Figura 4) respecto a la inulina de Agave, e incluso superior respecto a las cinéticas realizadas con *P. pentosaceus* UAM22 con ambas fuentes de carbono. A partir de ello se puede explicar las diferencias presentes tanto en la tasa específica de crecimiento como el tiempo de duplicación. Díaz-Vela y col. (2012) determinó ambos parámetros al fermentar inulina de Agave e inulina de chicoria con *P. pentosaceus*, obteniendo valores semejantes a los obtenidos en este estudio.

5.2.1.3. Actividad prebiótica

La estimulación selectiva de bacterias benéficas para la salud, está asociada con la actividad prebiótica, la cual refleja la habilidad de un sustrato para ayudar al crecimiento de un organismo en comparación con otro, generalmente bacterias benéficas para la salud (probióticas) respecto a enterobacterias; es por eso que se determinó este parámetro (Tabla 8). El parámetro fue evaluado en ambas cepas probióticas a ensayar, donde se comparó un prebiótico ya probado (inulina de Agave) contra un posible probiótico (bagazo de manzana). Para el caso de *L. rhamnosus* GG, la actividad probiótica fue de 0.49 ± 0.03 , dando un resultado positivo, lo que indica que el bagazo de manzana es metabolizado tan bien como la inulina de Agave, y que favorece el desarrollo de ésta bacteria probiótica más no la enterobacteria (Huebner y col., 2007). Esto mismo sucede con *P. pentosaceus*, al obtener una actividad prebiótica con un valor mayor a cero (0.40), sin embargo, la actividad prebiótica cuando la cepa probiótica es *L. rhamnosus* GG es significativamente mayor respecto de *P. pentosaceus* UAM22 ($P < 0.05$). Resultados similares son obtenidos por Díaz-Vela y col. (2013) al emplear dos subproductos agroindustriales (cáscara de tuna y piña) obtuvo una actividad prebiótica con *P. pentosaceus* de 0.33, Hernández-Alcántara (2013) evaluó la actividad prebiótica de la cáscara de manzana observando también mayor actividad con *P. pentosaceus* (0.38) respecto a *L. rhamnosus* GG (0.23).

La actividad prebiótica de un sustrato se verá afectada dependiendo de la naturaleza del mismo así como la composición microbiana presente en el tracto gastrointestinal, o bien, el microorganismo prueba su capacidad por hidrolizar tal sustrato; ya que un mismo prebiótico puede ser susceptible a ser fermentado por bacterias probióticas y favorecer su crecimiento selectivo, pero por lo contrario estar en presencia de un microorganismo que compita por los monómeros generados de la hidrólisis y favorecer antagónicamente su crecimiento, Huebner y col. (2007) comparó 5 cepas de *Lactobacillus* y 5 cepas de Bifidobacterias con 5 prebióticos diferentes, en donde obtuvo una actividad prebiótica en la mayoría de las pruebas semejante a 0.5, sin embargo una cepa de *Lactobacillus* alcanzó un valor superior a 1 (Huebner y col., 2007).

5.2.1.4 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta

La producción de ácidos grasos de cadena corta, está asociado a la fermentación de la fibra dietética (polisacáridos) (Paturi y col., 2012), dando como resultado la producción de ácido acético, propiónico y butírico, principalmente. Es por esto que en el estudio se cuantificó la concentración de éstos metabolitos producidos durante los tiempos 0, 5 y 10 h de la fermentación, los resultados se muestran en la Tabla 9; cuando las dos fuentes de fibra (bagazo de manzana e inulina de Agave) fueron sometidas a fermentación por dos bacterias ácido lácticas probióticas (*L. rhamnosus* GG y *P. pentosaceus* UAM 22), respectivamente.

Durante la fermentación tanto del bagazo de manzana como la inulina de Agave, la producción de ácido acético se ve favorecida cuando la fuente de carbono fue el bagazo de manzana, tanto para la cepa de *P. pentosaceus* UAM22 como para *L. rhamnosus* GG, sin embargo la máxima concentración de ácido acético (8.32 $\mu\text{mol/mL}$) ($P < 0.05$) fue producida durante la fermentación con la cepa probiótica *P. pentosaceus* UAM 22 a la quinta hora.

Tabla 9 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por *P. pentosaceus* UAM22 y *L. rhamnosus* GG con dos fuentes de carbono diferentes.

AGCC ($\mu\text{mol/mL}$)	Tiempo (h)	<i>P. pentosaceus</i> UAM 22		<i>L. rhamnosus</i> GG	
		BM	IA	BM	IA
Acético	0	1.81 ^{cC}	1.25 ^{dC}	4.37 ^{aC}	2.08 ^{bA}
	5	8.32 ^{aA}	2.06 ^{cB}	4.95 ^{bB}	1.65 ^{dC}
	10	7.67 ^{aB}	5.03 ^{cA}	6.61 ^{bA}	1.97 ^{dB}
Propiónico	0	0.50 ^{aA}	0.48 ^{aA}	0.49 ^{aA}	0.48 ^{aA}
	5	0.50 ^{aA}	0.55 ^{aA}	0.49 ^{aA}	0.49 ^{aA}
	10	0.52 ^{aA}	0.53 ^{aA}	0.50 ^{aA}	0.49 ^{aA}
Butírico	0	0.40 ^{aA}	0.37 ^{aA}	0.41 ^{aA}	0.39 ^{aA}
	5	0.41 ^{aA}	0.43 ^{aA}	0.39 ^{aA}	0.40 ^{aA}
	10	0.41 ^{aA}	0.42 ^{aA}	0.40 ^{aA}	0.40 ^{aA}

^{abc} Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia significativa para cada cepa y fuente de carbono ($P < 0.05$)

^{ABC} Letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa para cada AGCC ($P < 0.05$)

BM=Bagazo de manzana; IA=Inulina de Agave

Tanto la concentración de ácido propiónico como el ácido butírico no presentaron ninguna diferencia significativa respecto al tiempo, la cepa probiótica empleada ni la fuente de carbono suministrada ($P > 0.05$) obteniendo que la concentración promedio de ácido propiónico fue de $0.51 \mu\text{mol/mL}$, mientras que el ácido butírico se produjo en una concentración promedio de $0.39 \mu\text{mol/mL}$.

Independientemente de la cepa, el tiempo de monitoreo y la fuente de carbono empleada, la relación de los ácidos grasos producidos (Tabla 10) siempre presentó la siguiente proporción molar: acético > propiónico \geq butírico, lo cual concuerda con el reporte de Cummings (1981), al trabajar con heces del colon de humano de distintas edades (16-89 años) y valorar la producción de ácidos grasos de cadena corta sin ningún tratamiento, planteando que la proporción molar aproximada es de 60:20:20.

Tabla 10 Proporción de ácidos grasos de cadena corta producidos por *P. pentosaceus* UAM22 y *L. rhamnosus* GG con dos fuentes de carbono diferentes.

Tiempo (h)	Cepa	Fuente de Carbono	Ácidos Grasos de Cadena Corta		
			Acético	Propiónico	Butírico
0	<i>L. rhamnosus</i>	Inulina de Agave	67	18	15
		Bagazo de Manzana	60	23	17
	<i>P. pentosaceus</i>	Inulina de Agave	83	9	8
		Bagazo de Manzana	70	16	14
5	<i>L. rhamnosus</i>	Inulina de Agave	90	6	4
		Bagazo de Manzana	68	18	14
	<i>P. pentosaceus</i>	Inulina de Agave	85	8	7
		Bagazo de Manzana	65	19	16
10	<i>L. rhamnosus</i>	Inulina de Agave	89	6	5
		Bagazo de Manzana	84	9	7
	<i>P. pentosaceus</i>	Inulina de Agave	88	7	5
		Bagazo de Manzana	69	17	14

Karppinen y col. (2000) cuantificaron la producción de ácidos grasos de cadena corta producidos durante la fermentación con bacterias presentes en heces de humanos de inulina durante 24 h, sus resultados presentaron una proporción molar de 51:14:35, siendo el comportamiento (acético > butírico > propiónico) distinto a lo obtenido en el estudio y lo propuesto por Cummings (1981). Díaz-Vela y col. (2012) obtuvieron resultados similares al fermentar inulina de Agave e inulina de chicoria con una cepa probiótica termotolerante *P. pentosaceus* durante 12 h obteniendo una proporción molar de acético > propiónico > butírico. La importancia de medir estos metabolitos obtenidos de la fermentación es por los beneficios asociados a su presencia en el tracto gastrointestinal, al contribuir al mantenimiento de las funciones del intestino grueso, a prevenir patologías a través de sus actuaciones en la luz intestinal, sobre la musculatura y vasos del colon a través de su metabolismo por los colonocitos, en donde al parecer el butirato en particular juega un papel importante en el mantenimiento de la población de colonocitos sanos (Berruezo y col., 2011), mientras que el acetato promueve la lipogénesis, el propionato inhibe la gluconeogénesis y promueve la glicólisis, reduciendo el colesterol en sangre (Rémésy y col., 1992)

Existen varios estudios sobre el comportamiento de la pectina en la fermentación de bacterias lácticas, Casterline y col. (1997) estudiaron la pectina extraída de bagazo de manzana donde se presenta la tendencia de producción acético> propiónico> butírico con fracciones de 80:11:9, esto también sucede cuando son sometidos a fermentación oligosacáridos de pectina provenientes de bagazo de manzana (Chen y col., 2013).

Dependiendo de la naturaleza de los polisacáridos, así como las propias características de los microorganismos, influyen en la producción de ácidos grasos de cadena corta, ya que en función de esto, será la ruta metabólica que seguirá durante la fermentación y por ende los metabolitos secundarios que se producirán.

5.2.1.5 Resistencia a procesos digestivos

Una de las condiciones principales de los prebióticos es que deben de resistir el pH ácido característico del jugo gástrico (pH 2), al igual que en los estudios anteriores, se comparó el comportamiento de la fermentación de la harina de bagazo de manzana con la inulina de Agave.

En la Tabla 10 muestra la sobrevivencia de *P. pentosaceus* con dos fuentes de carbono, a diferente pH, durante el tiempo 1, 2 y 4 h, la cual denota que cuando la cepa fue sometida a pH de 0.5 no hubo crecimiento, sin embargo a partir del pH igual a 1 se observa sobrevivencia, y conforme este va incrementando se observa una mejor adaptación al sistema.

Al emplear esta bacteria probiótica, cuya única fuente de energía durante la fermentación era el bagazo de manzana o la inulina de Agave, se puede inferir que el bagazo de manzana presentó características semejantes a las de inulina (prebiótico comercial), al favorecer el crecimiento de la bacteria láctica a partir de un pH de 1 por cuatro horas, lo cual indica que es capaz de resistir las condiciones de acidez del jugo gástrico, el cual tiene un pH de 2 hasta por 4 horas, tiempo máximo de permanencia del alimento en el estómago (Jenkins y col., 2009), permitiendo que una bacteria probiótica pase al tracto gastrointestinal inferior.

Tabla 10 Supervivencia a pH ácido de *P. pentosaceus* con dos fuentes de carbono (bagazo de manzana e inulina de Agave)

pH	BM	IA	BM	IA	BM	IA
	1 h		2 h		4 h	
0.5	-	-	-	-	-	-
1	++	+	+	++	+	-
2	++	+++	++	++	++	+
3	+++	+++	+++	+++	+++	++
4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+>30; ++>150 ;+++>300 UFC/mL

A continuación se presenta el estudio de la tolerancia a condiciones gástricas, en donde nuevamente se emplea a *P. pentosaceus* UAM 22 para evaluar de manera indirecta por medio de su supervivencia la tolerancia a condiciones gástricas. Los resultados se muestran en la Tabla 11, en la que se observa que *P. pentosaceus* después de 90 min presentó una cuenta menor a la inicial ($P<0.05$) con ambas fuentes de energía, pero aun presenta crecimiento, a diferencia de lo obtenido por Ramírez-Chavarín y col. (2013), donde a los 90 min no presentaron crecimiento del probiótico, lo que indica que ambas fuente de energía suministrada favorecen la adaptación al sistema de *P. pentosaceus*.

Tabla 11 Supervivencia a condiciones gástricas de *P. pentosaceus* con dos fuentes energía (bagazo de manzana e inulina de Agave)

Tiempo (min)	Bagazo de manzana	Inulina de Agave
	Log UFC / mL	
0	4.26 ± 0.05^{aA}	3.85 ± 0.04^{bA}
30	2.32 ± 0.13^{aB}	2.40 ± 0.05^{aB}
60	2.49 ± 0.13^{aB}	2.51 ± 0.18^{aB}
90	2.23 ± 0.01^{aB}	2.49 ± 0.01^{aB}

^{abc} Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia significativa ($P<0.05$)

^{ABC} Letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa ($P<0.05$)

Se ha observado que después de una hora de incubación hay un decaimiento en el crecimiento de bacterias probióticas (6 géneros de *Lactobacillus ssp*), al

encontrarse en presencia de sales biliares y galactooligosacáridos (potenciales prebióticos) como fuente de energía (Hernandez-Hernández y col., 2012), al igual que sucede en este estudio, y de acuerdo con Charteris y col. (1998) con tan solo un 30% de sobrevivencia se pueden considerar tolerantes a condiciones gástricas, en este estudio se observó que después de 1.5 h más del 50% de las bacterias sobrevivieron tanto con harina de bagazo de manzana como inulina de Agave.

El bagazo de manzana no solo bajo condiciones de pH ácido sino bajo condiciones gástricas, presenta el mismo comportamiento que inulina de Agave, al favorecer el crecimiento de *P. pentosaceus* en forma semejante ($P > 0.05$) que con el prebiótico (inulina de Agave), puesto que existen estudios que demuestran que los ingredientes prebióticos, como la inulina de Agave, mejoran la sobrevivencia y la actividad probiótica durante el paso a través del tracto gastrointestinal superior (Buriti y col., 2010), permitiendo que una alta concentración ($10^7 - 10^8$ UFC/mL) de bacterias probióticas lleguen al intestino y puedan colonizarlo (Lee y Salminen, 1995), las cuales son deseadas en el tracto gastrointestinal inferior ya que contribuyen a mantener un equilibrio microbiano y/o conferir un beneficio en la salud del huésped (Fuller, 1991; Reid y col., 2003).

Por lo tanto, hasta ahora en estudios *in vitro* se puede decir que el bagazo de manzana presenta un potencial prebiótico, al estimular el crecimiento de bacterias lácticas y resistir condiciones gástricas superiores, condiciones que deben presentar tanto los prebióticos como las bacterias lácticas consideradas probióticas.

5.3 Tercera etapa

La tercera etapa comprende la evaluación del bagazo de manzana como fuente de fibra *in vivo*, utilizando a la rata *Rattus norvegicus* cepa Wistar como modelo de estudio, los animales fueron alimentados durante 84 días y al final se evaluaron características fisiológicas y microbiológicas.

5.3.1 Características Fisiológicas

Durante el transcurso del experimento en el que las ratas fueron alimentadas con dos fuentes de fibra diferentes (inulina de Agave y bagazo de manzana) se registró el peso corporal de las ratas por semana, así como el consumo de alimento. Los resultados se compararon con inulina, debido a que es un prebiótico ya reportado. Pasados los 84 días de experimento, las ratas fueron sacrificadas y el ciego fue removido, en la rata este es el órgano donde se lleva a cabo la mayor fermentación de los carbohidratos que no fueron metabolizados (prebióticos), del contenido del ciego se cuantificó la concentración de polisacáridos no digeridos así como los ácidos grasos de cadena corta, generados de la fermentación.

5.3.1.1 Ganancia en peso

El peso promedio registrado de las ratas al inicio del experimento para el tratamiento con bagazo de manzana fue de 59.9 ± 5.3 g mientras que para inulina de Agave de 54.9 ± 5.5 g; al término del experimento los pesos registrados fueron 515 ± 45.58 y 520 ± 46.77 g, respectivamente, los cuales no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$), lo cual es bueno ya que ambos sustratos son aprovechados de la misma manera a lo largo del experimento, permitiendo así que la velocidad de crecimiento en ambos grupos sea semejante.

En la Figura 6 se observa el peso que se registró de las ratas desde el inicio del tratamiento (destete de las ratas) hasta el final del mismo (84 días = 13 semanas) en la cual se puede apreciar que tanto las ratas alimentadas con inulina de Agave como las que consumieron harina de bagazo de manzana (como fuente de fibra durante la dieta) presentaron semejante comportamiento en ganancia de peso ($P > 0.05$) a lo largo del estudio, esto mismo sucede en el estudio hecho por Campbell y col. (1997), los cuales suministraron 3 fuentes de fibra (oligofructosa, fructooligosacáridos y xilooligosacáridos) distintas en la alimentación de ratas Sprague-Dawley por 14 días. Sin embargo, aunque se observó que el peso de las

ratas no es significativamente diferente ($P>0.05$), el contenido de tejido adiposo puede ser diferente (Alberdi y col., 2011) debido a la presencia de antioxidantes en los subproductos agroindustriales (los cuales disminuyen los niveles de triacilglicéridos, reduce la grasa corporal y reduce la lipogénesis) o bien por el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta generados de la fermentación de compuestos no digeridos, donde el ácido acético favorece la lipogénesis.

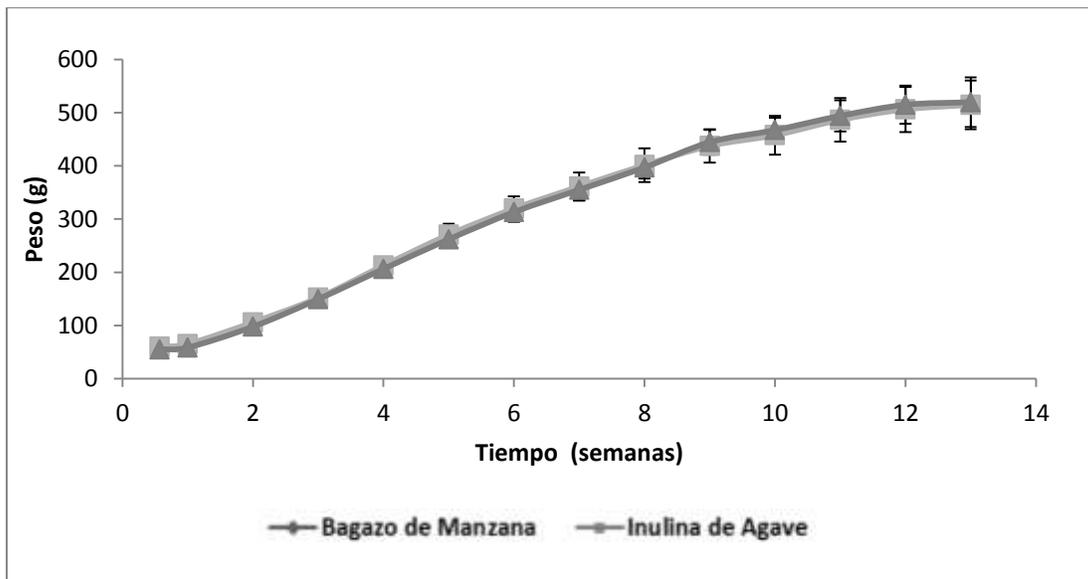


Figura 6 Ganancia en peso semanal de ratas cepa Wistar con bagazo de manzana (BM) e inulina de Agave (IA) (Promedio de 8 ratas \pm DS)

De forma paralela se registró el consumo de alimento por semana de cada tratamiento, el cual se observa en la Figura 7, en la que ambos grupos presentan un incremento en el consumo conforme avanza el experimento y la rata aumenta en peso. Dicho incremento en el consumo del alimento por tratamiento no presenta diferencia significativa ($P>0.05$). En un estudio realizado por Paturi y col. (2012) registraron un mayor consumo de alimento en ratas Sprague-Dawley, cuando se suministró celulosa (fibra insoluble), comparado con la ingesta de inulina (fibra soluble), lo cual se ve reflejado por la solubilidad de la fibra, puesto que la fibra soluble retarda el vaciado gástrico generando una menor ingesta de

alimento (Kin, 2000), y pese que el principal componente de fibra dietética en el bagazo de manzana es insoluble, no se observó ninguna diferencia significativa respecto a la ingesta semanal de alimento respecto al tratamiento con inulina.

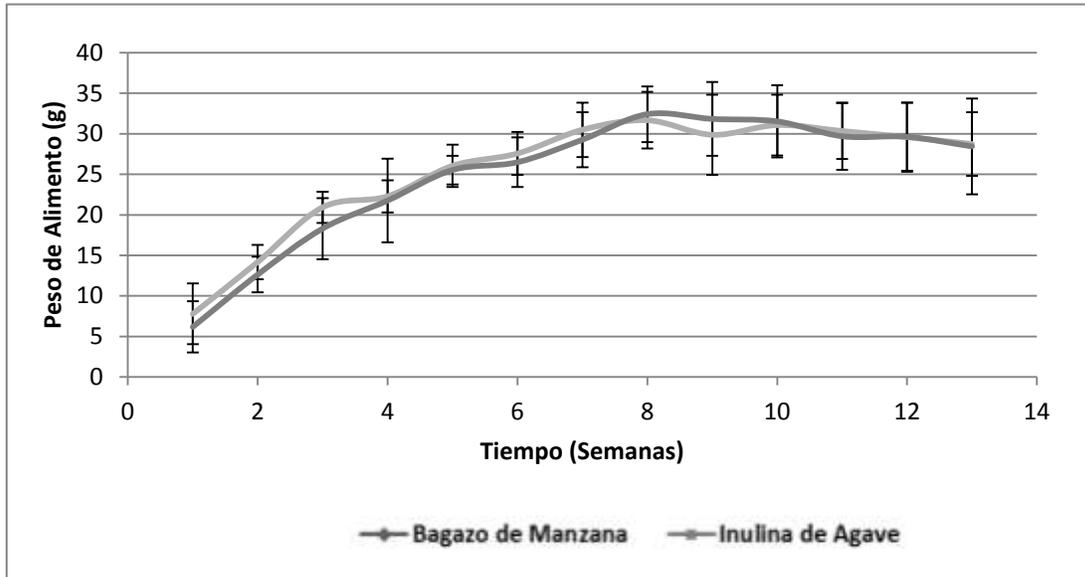


Figura 7 Consumo semanal de alimento por tratamiento por las ratas cepa Wistar (promedio de 8 ratas \pm DS)

5.3.1.2 Polisacáridos no digeridos y producción de ácidos orgánicos en el ciego

A la materia fecal contenida en el ciego se le cuantificó la concentración de polisacáridos no digeridos (g/L). La concentración obtenida en ratas alimentadas con inulina de Agave como fuente de fibra, presentan un total de 2.89 ± 0.84 gramos de azúcares reductores por litro, menor al contenido evaluado en heces de ratas con alimento adicionado de bagazo de manzana (7.13 ± 2.09 g/L) como fibra dietética en la dieta durante el tratamiento ($P < 0,05$), de lo cual se puede decir que durante la fermentación de los azúcares en el ciego, hubo un menor consumo de ésta por la microbiota presente en él.

La fermentación de compuestos en el ciego por la microflora presente, está asociado con el tiempo de contacto con los polisacáridos, así como la estructura química que presentan (Biedrzycka y Bielecka, 2004). El tiempo que tarde en vaciarse el colón está influenciado por la solubilidad de la fibra, puesto que la fibra insoluble o poco soluble forman una mezcla de baja viscosidad produciendo un aumento de la masa fecal acelerando el tránsito intestinal (Kin, 2000), de ahí que probablemente la cuenta de polisacáridos no digeridos sea mayor en el bagazo de manzana, al poseer una concentración de 59.8% de fibra insoluble, mientras que la inulina de Agave es completamente fibra soluble, y este tipo de fibra permanece en mayor contacto con la microbiota del colon, además, se sabe que la fracción susceptible a ser fermentada por la microbiota en el colon es la fibra soluble (Scheneeman, 1987), por lo que al obtener una mayor cuantificación de polisacáridos no digeridos también cuando se adiciono bagazo de manzana en la dieta de ratas, está influenciado por la concentración de fibra insoluble presente en el bagazo de manzana, la cual no es susceptible a ser fermentada.

La fermentación de los polisacáridos en el ciego, está asociada con la producción de ácidos grasos de cadena corta (Paturi y col., 2012), por ende se esperaría que al observar una menor concentración de polisacáridos no digeridos cuando se suministró inulina de Agave en la dieta de ratas, la concentración de ácidos grasos cuantificada fuera mayor, sin embargo con tan solo 11% de fibra soluble en la harina de bagazo de manzana, se cuantificó una mayor cantidad de ácidos grasos.

Los ácidos grasos de cadena corta predominantes de la fermentación de los carbohidratos fueron el acético, butírico y propiónico. La cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta producidos en el ciego se presentan en la Tabla 12, la cual muestra que con la dieta cuya fuente de fibra fue bagazo de manzana se produjeron en mayor concentración, y la proporción en la que fueron producidos fue la siguiente: acético > butírico > propiónico con valores de 21.89 > 6.6 > 4.48 $\mu\text{mol/g}$.

Tabla 12 Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) ($\mu\text{mol/g}$) del ciego de ratas *Wistar* alimentadas con dos fuentes de fibra dietética y la proporción que representan.

AGCC	IA	BM	IA	BM
	$\mu\text{mol/g}$		%	
Acético	5.94±2.42 ^{abA}	21.89±10.3 ^{baA}	45	66
Propiónico	1.67±0.41 ^{abA}	4.58±1.40 ^{baB}	13	14
Butírico	5.47±2.36 ^{abA}	6.67±4.15 ^{abB}	42	20
TOTAL	13.21	34.33	100	100

^{abc} Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia significativa ($P < 0.05$)

^{ABC} Letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa ($P < 0.05$)

BM=Bagazo de manzana; IA=Inulina de Agave

Éste comportamiento también se observa en las ratas cuya fuente de fibra dietética fue inulina de Agave; contrastando con la producción de los ácidos grasos que es mayor en las ratas con una alimentación con harina de bagazo de manzana ($P < 0.0001$); exceptuando la producción de ácido butírico, la cual en ambos casos se cuantificó una concentración semejante ($P > 0.05$).

En un estudio *in vivo* donde la fuente de fibra fue inulina, la producción de los ácidos grasos de cadena corta fue mayor comparada con la obtenida, principalmente en el ácido acético ($61 \mu\text{mol/g}$) (Richardson y col., 1989). Así mismo se reporta que tanto la inulina, como la pectina (principal compuesto de fibra dietética soluble en el bagazo de manzana) en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* favorecen la producción de ácido acético, y con la pectina se ve favorecido aún más que con la inulina (Henningsson y col., 2001).

Sembries y col. (2003) adicionaron en la dieta de ratas 10% de bagazo de manzana extraído de coloides de jugo de manzana, de lo cual al cuantificar la concentración de ácidos grasos de cadena corta se obtuvo una relación de ácidos acético : propiónico : butírico de 75 : 21 : 4, donde nuevamente el ácido acético es el que se encuentra en mayor proporción, mientras Licht y col. (2010) obtuvieron una relación de 67 : 16 : 17 después de alimentar ratas *Wistar* con una concentración de 3.5% de bagazo de manzana igual a la obtenida al alimentar paralelamente otro grupo con 3.3% (70:16:14) y 0.33% de pectina (70:18:12)

extraído de manzana, las cuales presentan una semejante relación molar a la obtenida durante este estudio (acético > propiónico > butírico), lo que permite inferir que la pectina del bagazo de manzana es fermentada por la microbiota presente y favorece la producción de ácido acético producida por la fermentación en el ciego de las ratas, sin embargo también afecta la concentración de ácido butírico, ya que se ha demostrado que mientras mayor sea la concentración de pectina que se suministra, la producción de ácido butírico se encontrará en una mayor proporción (Endress y Mattes, 2012), y tan solo con 0.5% de fibra soluble en la dieta de las ratas se alcanzaron concentraciones de ácido butírico semejantes ($P>0.05$) a la obtenida al suministrar 5% de inulina de Agave.

Como se presentó en todos los estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, donde se adiciono inulina, pectina o bagazo de manzana, el ácido acético es el que se presenta en mayor proporción. El ácido graso de cadena corta de mayor concentración seguido del ácido acético fue el butírico (Henningsson y col., 2001; Laparra y Sanz, 2010) deseado por los efectos benéficos asociados a trastornos gastrointestinales, pues se ha observado que el ácido butírico es la principal fuente de energía de las células del colon, y favorecen la apoptosis de células tumorales, previene y es empleado para el tratamiento de colitis, úlceras y enemas (Cummings, 1997; Meijer y col., 2010).

La producción de ácidos grasos de cadena corta, así como la proporción molar en la que se encuentran, al igual que en el estudio *in vitro* se ve afectada por la naturaleza de los polisacáridos adicionados en la dieta de las ratas, como la microflora presente en el ciego, y con ello la forma en que serán metabolizados.

5.3.2 Características Microbiológicas

El mantenimiento de un entorno intestinal saludable está asociado con el tipo de microorganismo presentes en él, con lo que se asocia una alta concentración de

Bifidobacterias y Lactobacilos, cuya proliferación está asociada al consumo de prebióticos (Gibson y col., 2004).

La cuantificación de bacterias lácticas, bifidobacterias, bacteroides y enterobacterias se muestra en la Tabla 13, en la cual se observa tanto para el tratamiento con fuente de fibra inulina de Agave como la harina de bagazo de manzana. Los microorganismos que se encontraban en menor cantidad fueron las enterobacterias (3.91 ± 0.83 y 3.57 ± 0.31 Log UFC/mL, respectivamente) ($P < 0.05$), lo cual indica que pudieron ser inhibidos por los metabolitos secundarios producidos por los demás microorganismos, los cuales alteran el medio y disminuyen su capacidad de adaptación (Richardson y col., 1989; Gibson y Roberfroid, 1995), además de que son un género indeseable por ser conocidos por causar infecciones gastrointestinales (Willey y col., 2008).

Tabla 13 Composición microbiana intestinal presentes en el ciego de ratas *Wistar*

Microorganismo	IA	BM
	Log UFC / mL	
Bacterias Lácticas	6.04 ± 0.39^{aA}	5.96 ± 0.41^{aA}
Bifidobacterias	6.26 ± 0.79^{aA}	5.95 ± 0.39^{aA}
Bacteroides	5.76 ± 0.54^{aA}	5.98 ± 0.36^{aA}
Enterobacterias	3.91 ± 0.83^{aB}	3.57 ± 0.31^{aB}

^{abc} Letras diferentes en la misma fila presentan diferencia significativa ($P < 0.05$)

^{ABC} Letras diferentes en la misma columna presentan diferencia significativa ($P < 0.05$)

BM=Bagazo de manzana; IA=Inulina de Agave

Mientras tanto las bacterias lácticas, bifidobacterias y bacteroides, se encontraron en mayor concentración en el contenido del ciego donde ninguna de estas bacterias presentan alguna diferencia significativa ($P < 0.05$) respecto a la fuente de fibra suministrada a lo largo del estudio con ratas, indicando así que a diferencia de las enterobacterias son capaces de fermentar los polisacáridos no digeridos por la rata en el ciego promoviendo el crecimiento selectivo de éstas bacterias, lo cual es bueno ya que las bifidobacterias estimulan el sistema inmunológico e inhiben el crecimiento de microorganismo patógenos (Gibson y Roberfroid, 1995), mientras

que los lactobacilos reducen el estreñimiento, ayudan a resistir las infecciones producidas por *Salmonella* y ayudan a aliviar el síndrome del intestino irritable (Manning y col., 2004).

Licht y col. (2010), encontraron que la manzana así como la pectina aislada de manzana suministrada en la dieta de ratas, favorecen el crecimiento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, al igual que sucede en este estudio. Los bacteroides, también se encuentra en mayor proporción ($P < 0.05$), estos están asociados conformando la microbiota gastrointestinal en los mamíferos (Dorland y Newman, 2003), jugando un papel importante en el procesamiento de moléculas complejas, siendo los polisacáridos de origen vegetal su principal fuente de energía. Hay estudios en los que relacionan que son capaces de metabolizar la pectina (Dongowski y col., 2000), principal fuente de fibra soluble en el bagazo de manzana, la cual promoverá selectivamente el crecimiento de bacterias deseables en el tracto gastrointestinal.

7 CONCLUSION

La harina de bagazo de manzana proveniente de sidreras en el Estado de Puebla, constituye un residuo agroindustrial subutilizado que genera importantes pérdidas económicas así como una gran cantidad de contaminantes.

En este estudio se demostró el potencial prebiótico de esta harina *in vitro*, así como su utilización como fuente de fibra en animales vivos, obteniendo resultados similares a los obtenidos utilizando inulina de agave, el cual es un prebiótico comercial ya probado.

Por lo anterior, se concluye que la harina de bagazo de manzana puede ser utilizada como fuente de ingredientes funcionales: fibra y prebióticos, dándole con esto un valor agregado a este subproducto y reduciendo la contaminación que se genera en la producción de este residuo.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Alberdi, G., Rodríguez, V.M., Miranda, J., Macarulla, M.T., Arias, N., Andrés-Lacueva, C. y Portillo, M.P. (2011) Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. *Nutrition and Metabolism* 8:29-35
- American Association of Cereal Chemist (AACC) (2001) The definition of dietary fiber *Cereal Foods World* 46:849-861
- 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.
- American Dietetic Association (2008) Position of the American Dietetic Association: Health implications of dietary fiber *Journal of the American Dietetic association* 108: 1716-1731
- AOAC, Official Methods of Analysis (1996) *Association of Official Analytical Chemists* 16th Ed Washington, DC
- Aprikian, O., Levrat-Verny, M., Besson, C., Busserolles, J., Remesy, C. y Demigne, C. (2001). Apple favorably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol fed rats. *Food Chemistry*. 75:445-452
- Auerbach, M., Craig, S. y Mitchell, H. (2006) Bulking agents: multi-functional ingredients. En: *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology* Mitchell, H. (Ed.) Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp 367-397.
- Axelsson, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: *Lactic acid bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. 3rd Ed. SalmiNen, S. y Wriugh, A. von, (Eds.) Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. pp 1-66
- Bankowski, Z. (1985) International guiding principles for biomedical research involving animals. *A publication of the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS)* 1985:1-9
- Barakat, R.K, Griffiths, M.W., Harris, L.J. (2000) Isolation and characterization of Carnobacterium, Lactococcus and Enterococcus sp. From cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat *International Journal of Food Microbiology* 62: 83-94
- Baray, S. (2009) Acacia Gum En: *Food Applications and Health Benefits* Cho, S.S. y Samuel, P. (Eds). CRC Press Florida pp79-120

- Barrio Merino, A. (2006) Probióticos, prebióticos y simbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica en pediatría. *Revista Pediátrica de Atención Primaria*. 8: 99-118
- Berruezo, G.R., Martínez-García, C. y Valencia-Arques, J.A. (2011) Biodisponibilidad de los ácidos grasos de cadena corta: mecanismos de absorción *Anales* 24:125-134
- Beumer, R.R., de Vries, J. and Rombouts, F.M. (1992) *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells *International Journal of Food Microbiology* 15: 153-163.
- Biedrzycka, E. y Bielecka (2004) Prebiotic effectiveness of fructanos of different degrees of polymerization *Trends in Food Science and Technology* 15: 170-175
- Buriti, F.C.A., Castro, I.A. y Saad, S.M.I. (2010) Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions *International Journal of Food Microbiology* 137, 121-129.
- Bustamante, P., Mayorga, L., Ramírez, H., Martínez, P., Barranco, E. y Azaola, A. (2006) Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37:5-9
- Campbell, J.M., Fahey, G.C.Jr. and Wolf, B. W. (1997) Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition* 127:130-136
- Casterline, J.L.Jr., Oles, C.J. y Ku, Y. (1997) In vitro fermentation of various food fiber fractions *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:2463-2467
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K (1998) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract *Journal of Applied Microbiology* 84:759-768.
- Chávez-Zepeda, L. P., Cruz-Méndez, G., Gracia de Caza, L., Díaz-Vela, J. y Pérez-Chabela, M. L. (2009) Utilización de sub-productos agroindustriales como fuente de fibra para productos cárnicos *NACAMEH* 3(2): 71-82.
- Chen, J., Liang, R., Liu, W., Lui, C., Wu, S. y Wang, Z. (2013) Pectic-oligosaccharides prepares by dynamic high-pressure microfluidization and their *in vitro* fermentation properties *Carbohydrates Polymers* 91:175-182.

- Cho, S.S. (2009) Functional and dietary fibers: an introduction En: *Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits* Cho, S.S. y Samuel, P. (Eds.) Ed CRC Press Florida pp 1-6
- Cho, S.S. y Samuel, P. (2009) Fiber Ingredients: En: *Food Applications and Health Benefits* Ed CRC Press Florida pp 499
- Cho, S.S. y Finocchiaro, E. (2010) Prebiotics and Probiotics En: *Ingredients: Health Benefits and Food Applications*. Cho, S.S. y Samuel, P. (Eds.) Ed CRC Press Florida, USA pp 13-159
- Cummings, J.H. (1981) Dietary fibre and large bowel cancer *Proceedings of the Nutrition Society* 40:7-14.
- Cummings, J.H. (1997) Short chain fatty acid enemas in the treatment of distal ulcerative colitis *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 9:149-53
- Cummings, J.H. (2001) The effect of dietary fiber in fecal weight and composition En: *Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition* 3rd Ed Spiller, G.A. (Ed.) CRC Press California, USA, pp 183-252
- Crittenden, R.G. (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharide *Trends in Food Science and Technology* 7: 353-361
- Dabek, M., McCrae, S.I., Stevens, V.J., Duncan, S.H. y Louis, P. (2008) Distribution of β -glucosidase and β -glucuronidase activity and of β -glucuronidase gene gus in human colonic bacteria *Microbiology Ecology* 66:487-495
- De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E (1960) A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology* 23(1): 130-135.
- Dentali S. (2002) Regulation of functional foods and dietary supplements. *Food Technology* 56:6, 59-94.
- Díaz-Vela, J. (2010) Evaluación de la actividad prebiótica de inulina de Agave, inulina de achicoria y albedo de naranja sobre bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas *Tesis de maestría en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Díaz-Vela, J., Mayorga-Reyes, L., Totosaus S.A., y Pérez-Chabela, M.L. (2012). Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. *Vitae*, 19(3) 253-260.
- Díaz-Vela, J., L., Totosaus S.A., Cruz-Guerrero, A.E. y Pérez-Chabela, M.L. (2013) *In vitro* evaluation of the fermentation of added-value agroindustrial by-products: cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) peel and pineapple (*Ananas comosus*)

- peel as functional ingredients *International Journal of Food Science and Technology* 48:1460-1467
- Diplock, A.T., Aggott, P.J., Ashwell, M., (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document *British Journal of Nutrition* 81:S1–27.
- Djouzi, Z., Andrieux, C., Pelenc, V., Somarriba, S., Popot, F., Paul, F., Monsan, P. and Szylit, O. (1995) Degradation and fermentation of alpha-gluco-oligosaccharides by bacterial strains from human colon: In vitro and in vivo studies in gnotobiotic rats *Journal of Applied Bacteriology* 79: 117-127
- Dongowski, G., Lorenz, A. y Anger, H. (2000) Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotamicron* isolated from human gut flora *Applied and Environmental Microbiology* 66(4):1321.
- Dorland, I. y Newman, W.A. (2003) Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 30th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Analytical Chemistry*, 28(3):350-356
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C, Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shannahan, F., Collins, J.K. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 386S-92S.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J. y Vogel, R.F. (2002) Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry *Journal of Applied Microbiology* 92:966-975.
- Eisele, T. y Drake, S.R. (2005) The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 213–221.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. y Attia, H. (2011) Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review *Food Chemistry* 124: 411-421
- Emaga, T.H., Andrianaivo, R.H., Wathelet, B., Tchango, J.T., Paquot, M. (2007) Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry* 103, 590–600.

- Endress, H.U y Mattes, F. (2009) Pectin En: *Fiber Ingredients, Food Applications and Health Benefits* Cho, S.S. y Samuel, P. (Eds.) Ed CRC Press Florida pp 135 - 171
- Endress, H.U. y Mattes, F. (2012) Dietary Fiber and Health: Pectin *Ed CRC Press, Taylor and Francis Group*. New York, United States. pp 385-408
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C. y Pérez-Álvarez, J. (2008) Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science* 80: 410-417
- Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estévez, A.M., Chiffelle, I., Asenjo, F. (2005) Fibre concentrates from Apple pomace and Citrus peel as potencial fibre sources for food enrichment *Food Chemistry* 91:395-401
- Food and Drug Administration (2006) Dietary Supplements (<http://www.fda.gov/downloads/Food/DietarySupplements/UCM240978.pdf>) 30/06/2014
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378
- Fuller, R. (1991) Probiotics in human medicine. *Gut* 32: 439-442.
- García Peris, P., Álvarez de Frutos, V. (2000) Fibra y salud. *Nutrición y obesidad* 3:127-135
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., Robertfroid, M.B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics *Nutrition Research Review* 17:259-275.
- Gibson, G.R. y Robertfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics *Journal of Nutrition* 125: 1401-1412
- Grajek, W., Olejnik, A. y Sip, A. (2005) Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods *Acta Biochimica Polonica* 52:665-671.
- Gómez-Chávez, G., Pérez-Chabela, M.L., Guerrero, I. y Totosaus, A. (2011) Propiedades de batidos cárnicos inoculados con bacterias ácido lácticas termotolerantes probióticas y harina de cacao como prebiótico: Alimento simbiótico *Revista de Ingeniería Agrícola y Biosistemas* 3(1):5-10
- González-Centeno, M.R., Rosselló, C., Garau, M.C., López, F. y Femenia, A. (2010) Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and steams. *Food Science and Technology* 43:1580-1586.

- Goristein, S., Zachwieja, Z., Folta, M., Barton, H., Piotrowicz, J., Zember, M., Weisz, M., Trakhtenberg, S. y Martin-Belloso, O. (2001) Comparative content of dietary fiber, total phenolics and minerals in persimmons and apple *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 952-957
- Guarner, F., y Malagelada, J.R. (2003) Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361: 512-519.
- Henao, P.A., Tapasco, O.A y Serna, M.A (2011) Validación de tres suplementos alimenticios elaborados a partir de subproductos agroindustriales de poscosecha en función del incremento en sólidos totales de la leche *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 9:105-114
- Henningsson, A., Björk, I. y Nyman, M. (2001) Short-chain fatty acids formation at fermentation of indigestible carbohydrates *Journal of Nutrition* 45:165-168
- Hernández-Alcántara, A.M. (2013) Utilización de cinco subproductos agroindustriales como fuente de carbono y fibra para el crecimiento de bacteria ácido lácticas termotolerantes *Tesis de maestría en Bioteología*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Hernández-Hernández, O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A. , Sanz M. L. y Ricke, S. C. (2012) Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus* *Food Microbiology* 30:355-361.
- Hotchkiss A.T., Olano-Martin E., Grace W.E., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. (2003) Pectic oligosaccharides as prebiotics. En: *Oligosaccharides in Food and Agriculture, ACS Symposium series 849* Eggleston G, Côté GL (Eds) Oxford University Press, USA pp 54-62
- Huebner, J., Wehling, R.L. y Hutkins, R.W. (2007) Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17: 770-775
- Jay, J.M. (2000) Microbiología moderna de los alimentos 4ª ed. Ed Acribia, Zaragoza, España pp. 19-27, 106-108, 441-475
- Jenkins, G., Kemnitz, C. y Tortora, G.J. (2009) Anatomy and Physiology: From Science to Life. *John Willey & Sons* 2nd Edition, New York, USA, pp 885-925
- Kapoor, M.P y Juneja L.R. (2009) Partially Hydrolyzed Guar Gum En: *Dietary Fiber Food Applications and Health Benefits* Cho, S.S. y Samuel, P. (Eds.) Ed CRC Press Florida pp79-120
- Karppinen, S., Liukkonen, K., Aura, A-M., Forssell, P. y Poutanen, K. (2000) In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human fecal bacteria *Journal of Science and Food Technology* 80:1469-1476
- Kin, Y-I (2000) A technical review: Impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 118:1235-1257.

- Kohmoto, T., Fukui, F., Takaku, H. y Mitsuoka, T. (1991) Dose-response test of isomaltooligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria *Agricultural Biological Chemistry* 55: 61-69
- Kolida, S. y Gibson, G.R. (2007) Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *Journal of Nutrition* 137: 2503S-2506.
- Ktenioudaki, A., O'Shea, N. y Gallagher, E. (2013) Rheological properties of wheat dough supplemented with functional by-products of processing: Brewer's spent grain and apple pomace *Journal of Food Engineering* 116:362-268.
- Kumemura, M. (1992) Effects of administration of 4G-Beta-D-galactosylsucrose on fecal microflora putrefactive products, short chain fatty acids, weight, moisture, and subjective sensation of defecation in the elderly constipation *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 13: 199-210
- Laparra, J.M. y Sanz, Y. (2010) Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*, 61: 219-225.
- Lee, Y. K. y Salminen, S. (1995) The coming age of probiotics *Trends in Food Science and Technology* 6: 241-245.
- Ley General de Salud y su reglamento (1985) Ley general de la salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos. (12Enero2014)
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmcsdotcsh.html>
- Licht, T.R., Hansen, M., Bergström, A., Poulsen, M., Krath, B.N., Markowski, J., Dragsted, L.O. y Wilcks, A. (2010) Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: role of apple pectin *BMC Microbiology* 10:13
- López, H.W., Levrat-Verny, M.A., Coudray, C., Besson, C., Krespine, V. y Messenger, A. (2001) Class 2 resistant starches lower plasma and liver lipids and improve mineral retention in rats. *Journal of Nutrition* 131: 1283-1289.
- Luz Sanz, M., Gibson, G.R., and Rastall, R.A. (2005) Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5192
- 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. y Parker, J. (2004) *Biología de los microorganismos* 10ª ed. Ed Prentice Hall. Madrid, España pp. 122, 352, 400-402, 991.
- Mamma, D., Topankas, E., Vafiadi, C. y Christakopoulos, P. (2009) Biotechnological potential of fruit processing industry residues. En: *Biotechnology for agro-industrial residues*. Singhnee Nigam P. y Pandey A. (Eds.). Springer: UK.
- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A.T., Widmer, W., Yadhav, 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* 71:8383–8389
- Meijer, K., Vos, P. y Priebe., M.G. (2010) Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13:715–721
- Manning, S., Rastall, R. y Gibson, G. (2004) Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc. New York pp 407-452
- Manterola, H., Cerda, D. y Mira, J. (1999) Los residuos agrícolas y su uso en la alimentación de rumiantes. *Ministerio de Agricultura y Fundación para la Innovación Agraria*. Santiago, Chile pp 222
- Marlett, J.A (1995) Content and composition of dietary fiber *Journal of the American Dietetic Association* 92:175-186
- Metchnikoff, E. (1907) In the Prolongation of Life. En: *Optimistic Studies*, Chalmers, M. (Ed.). William Heinemann, London.
- Metropolitano (2011) Zacatlán produce un millón de sidras al año (<http://www.metropolitanopuebla.com/sidra.html>) 22Octubre2012
- Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar *Analytical Chemistry* 31(3):426-428
- Minami, Y (1983) Selectivity of utilization of galactosyl-oligosaccharides by bifidobacteria *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 31: 1688-1691
- Monro, J.A., Paturi, G., Butts, C.A., Young, W., De Guzmán, C.E., McLachlan, A., Roy, N.C. y Ansell, J. (2012) Prebiotic effects of fermentable carbohydrate polymers may be modulated by faecal bulking of non- fermentable polysaccharides in the large bowel of rats. *International Journal of Food Science and Technology*. 47: 968-976.
- Moraes-Crizel, T., Jablonski, A., Oliveira-Rios, A., Rech, R., y Hickmann-Flôres, S. (2013) Dietary fiber from orange byproducts as a potencial fat replacer *Food Science and Technology* 53:9-14
- Montesi, A., Garcia-Albiach, R., Pozuelo, M.J., Pintado, C., Goni, I., y Rotger, R. (2005) Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed

- with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 98:281-289
- Montgomery, D. (2006) Diseño y análisis de experimentos. 2ª Edición, México, D.F. pp 685
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-147-SSA1-1996, Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, sémolas o semolinas. alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.
- Ojeda, R. (2012) Producción de Manzana en México *El Economista* 22Octubre2012 <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2012/10/22/produccion-manzana-mexico>
- Okasaki, M., Fujikawa, S. y Matsumoto, N (1990) *Effects of xylooligosaccharide on growth of bifidobacterias* *Journal of Japanese Society Nutrition and Food Science* 43: 395-401
- Parodi, P.W. (1999) The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics *Australian Journal of Dairy Technology* 54: 103-121
- Parra-Matadamas, D.A. (2011) Actividad prebiótica y antioxidante de subproductos agroindustriales *Tesis de Maestría en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Paturi, G., Butts, C. A., Monro, J. A., Hedderley, D., Stoklosinski, H., Roy, N. C. y Ansell, J. (2012) Evaluation of gastrointestinal transit in rats fed dietary fibres differing i their susceptibility to large intestine fermentation *Journal of Functional Foods* 4:107-115.

- Playne, M.J. y Crittenden, R. (1996) Commercially available oligosaccharides. *Bulletin of International Dairy Found* 313: 10-22
- Ramírez, A. y Pacheco, E. (2009) Propiedades funcionales de harinas de piña, guayaba y guanábana en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 34:293-298
- Ramírez-Chavarín, N.L., Wachter-Rodarte, C. y Pérez-Chabela, M.L. (2010) Characterization and identification of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked sausages as bioprotective cultures *Journal of Muscle Foods*, 21(4): 585-596
- Ramírez-Chavarín, N.L., Wachter-Rodarte, C., Eslava-Campos, C.A. y Pérez-Chabela, M.L. (2013) Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products *International Food Research Journal* 20(2): 991-1000
- Rastall, R.A. y Maitin, V. (2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation *Current Opinion in Biotechnology* 13: 490-496
- Reeves, P., Nielsen, F. y Fahey, G. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition* 123:1939-1951
- Reid, G., Jass, J., Sebuly, M.T., y McCormick, J.K. (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Review* 16: 658-672.
- Rémésy, C., Behr, S. R., Levrat, M.A. y Demigné, C. (1992) Fiber fermentability in the rat cecum and its physiological consequences *Nutrition Research* 12:1235-1244
- Richardson, A.J., Calder, A.G., Stewart, C.S. y Smith, A. (1989) Simultaneous determination of volatile and non-volatile acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas chromatography. *Letters in Applied Microbiology* 9:5-8.
- Roberfroid, M.B. (2000) Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1660S-1664.
- Roberfroid, M.B. (2002) Global view on functional foods: European perspectives. *British Journal of Nutrition* 88:S133-S138.
- Roberfroid, M.B. (2008) Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies, and products. En: Handbook of Prebiotics. Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (Eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 39-69.

- 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.
- Saito, M. (2007) Role of FOSHU (food for specified health uses) for healthier life. *Yakugaku Zasshi* 127: 407-416.
- Schneeman, B.O. (1987) Soluble and insoluble fibre-different physiological response. *Food Technology* 2: 81–82
- Sembries, S., Dongowski, G., Jacobasch, G., Mehrländer, K., Will, F. y Dietrich, H. (2003) Effects of dietary fibre-rich juice colloids from apple pomace extraction juices on intestinal fermentation products and microbiota in rats *British Journal of Nutrition* 90:607-615
- Serena, A. y Bach, K. (2007) Chemical and physicochemical characterization of co-products from vegetable food and agroindustries. *Animal Feed Science and Technology* 139(1-2): 109–124.
- 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.
- Sudha, M.L., Baskaran, V. y Leelavathi, K. (2007) Apple pomace as a source of dietary fiber and polyphenols and its effect on the rheological characteristics and cake making *Food Chemistry* 104: 686-692
- Suni, M., Nyman, M., Eriksson, N-A, Björk, L. y Björk, I. (2000) Carbohydrate composition and content of organic acids in fresh and stored apples *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:1538-1544
- Swennen, K., Courtin, C.M., y Delcour, J.A. (2006) Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46: 459-471.
- Takahashi, T (2009) Cellulose En: *Food Applications and Health Benefits* Ed CRC Press Florida pp263-283
- Taberner, M., Venema, K., Maathuis, A.J.H. y Saura-Calixto, F.D. (2011) Metabolite production during in vitro colonic fermentation of dietary fiber: analysis and comparison of two European diets *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:8968-8975
- Tamura, Z. (1993) Nutriology of bifidobacteria *Bifid Microflora* 2: 3-16

- Thammarutwasik, P., Hongpattarake, T., Chantachum, S., Kijroongroyana, K., Itharat, A., Reanmongkol, W., Tewtrakul, S. y Ooraikul, B. (2009) Prebiotics – A review *Songklanakarín Journal of Science and Technology* 31: 401-408
- The World Apple and Pear Association (WAPA) Apple and pear by country and year (1999-2010) 17Marzo2013 http://www.wapa-association.org/asp/page_1.asp?doc_id=446
- Tomasik, P.J. y Tomasik, P. (2003) Probiotics and prebiotics. *Cereal Chemistry*. 80: 113-117
- Trila, U., Fernández-López, F., Pérez-Álvarez, J.A. y Viuda-Martos, M. (2014) Chemical, physicochemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of rich-fibre powder extract obtained from tamarind (*Tamarindus indica* L.) *Industrial Crops and Products* 55:155-162.
- Trowell, H, Southgate, D.A., Wolever, T.M., Leeds, A.R., Gasull, M.A., y Jenkins, D.J. (1976) Dietary fibre redefined. *The Lancet* 1: 967.
- Valenzuela, A. y Maiz, A. (2006) El rol de la fibra dietética en la nutrición enteral *Revista Chilena de Nutrición* 33:342-351
- Van Laere, K.M.J., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H.A. y Voragen, A.G.J. (2000) Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1644–1652
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajaz, Y., Martín-Sánchez, A., Sánchez-Zapata, E., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C. y Pérez-Álvarez, J.A. (2012) Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses powder co-product *Journal of Food Engineering* 110:220-224
- Willey, J.M., Sherwood, L.M. y Woolvertor, C.J. (2008) *Microbiología de Prescott, Harley y Klein* ed. McGraw Hill 7° edición pp 134-135
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H. (2003) Antioxidant activity of apple peels *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:609-614
- Yamada, H., Itoh, K., Morishita, Y. y Taniguchi, H. (1993) Structure and properties of oligosaccharides from wheat bran *Cereal Foods World* 38: 490-492