

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD PREBIÓTICA DE INGREDIENTES Y EXTRACTOS VEGETALES DE APLICACIÓN INDUSTRIAL

presentado por

Beatriz Lacunza Etayo

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Junio, 2019

Agradecimientos

A Yoli, por tu gran implicación en este trabajo y enorme paciencia conmigo, por ser mi segunda madre estos meses y haberme motivado día tras día, por haberme dado múltiples salidas cuando yo no las veía. Por salvarme en más de una. Una vez más, gracias jefa.

A Gloria y Andrea, por haber aparecido en el momento oportuno y haber llenado de vida mi rutina. Quién iba a decirme que disfrutaría tanto de vuestra compañía el primer día que coincidimos en el laboratorio. No puedo estar más agradecida, no sé qué hubiera sido de mí sin vosotras estos meses. Y ya sabéis que esto que hemos creado no se queda aquí.

A Patri, por haber confiado en mí desde el primer momento y hacer que yo lo hiciera conmigo misma. Por compartir tus experiencias conmigo, por apoyarte en mí y enseñarme de mil y un maneras posibles tanto a nivel profesional como personal.

A María, por abrirte a mí poco a poco y mostrarme esa ternura que tienes. Que es brutal. Por tu enorme paciencia con mis torpezas y fallos, por el tiempo invertido en este trabajo y por estar cuando lo he necesitado. Gracias de verdad.

A Leti, por llenar de alegría las cuatro paredes del día a día. No la pierdas nunca. Por tus bromas y tu genio (que también es divertido), y por el viaje pendiente a Kioto.

A Dante, por enseñarme a en-placar como los zurdos siendo diestra y a hacer curvas de crecimiento (esenciales para este trabajo). Por tranquilizarme ante mi futuro incierto, por las tardes de los lunes y miércoles y compartir conmigo tus viajes y tu esencia latinoamericana.

A Lucía, por alegrarme las mañanas en el cuarto de medios y las tardes como compañera de desgranado de habas al sol. Por compartir tantas cosas conmigo a nivel personal. Descubrirte ha sido sin duda de lo mejor de estos cuatro meses. Eres maravillosa.

A Sergio y David, por haberme acogido de esa manera tan cercana y que yo tanto agradezco. Por vuestra buena disposición siempre, vuestra buena vibra, vuestra humildad y simpatía, por todas las risas y por haberme dejado entrar en la garita el último día.

A Millán, por tu calma y tranquilidad, por quitarnos el miedo en algunas ocasiones. Por tus buenas intenciones y tus salidas divertidas. Por ayudarme siempre que has podido.

*A Raquel, por tu energía y alegría cada mañana. Por querer que aprendiera todo lo que pudiera (lo has conseguido con creces). Por querer sacar lo mejor de mí, de este trabajo y la implicación que eso supone. Por hacerme ver que **“Es tan importante ser un buen técnico como preguntarse el por qué de las cosas”**. Gracias por todo.*

A todos los demás técnicos e investigadores de los que he aprendido tanto y que han aportado un granito de arena en mi camino. Mil gracias a todos.

Y por su puesto a mis padres y hermana. Sin vosotros este trabajo no habría sido posible. Gracias una vez más por darme la oportunidad de estudiar lo que yo he querido, muchas veces no somos conscientes de la suerte que tenemos con detalles tan comunes como ese. Por vuestro esfuerzo continuo, día tras día, año tras año. Por sustentar mi montaña rusa de emociones y creer en mí siempre sin dejar de hacerlo ni un segundo. Estoy eternamente agradecida con vosotros.

Resumen

Este trabajo se engloba dentro del proyecto BIOTAGUT (modulación del microbioma y del postbioma mediante el diseño inteligente de alimentos promotores de una microbiota saludable en relación con el síndrome metabólico) aprobado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través de CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial).

El objetivo del presente trabajo es poner a punto un método analítico que permita caracterizar de forma sencilla y rápida el potencial prebiótico *in vitro* de ingredientes y/o extractos vegetales, previamente seleccionados en el marco de este proyecto y, que han sido facilitados por tres empresas del sector agroalimentario, entendido dicho potencial como la capacidad para estimular el crecimiento de bacterias presentes habitualmente en la microbiota colónica humana tales como las pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (ej: *L. casei*, *B. breve*, etc.).

Para establecer la metodología adecuada (temperatura y tiempo de incubación, medio de cultivo, dosis de extracto, etc.), se ha empleado como control positivo la inulina Orafti-GR, que procede de achicoria y ha sido reconocida por la EFSA (European Food Safety Authority) como molécula con actividad prebiótica. Concretamente, las bacterias colónicas se han incubado en presencia de distintas concentraciones de inulina Orafti-GR y se ha monitorizado el crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo mediante el registro de la densidad óptica a 600nm (placa microtiter). Una vez establecidas las condiciones experimentales y siguiendo la metodología desarrollada, se evaluará la capacidad de los ingredientes y/o extractos vegetales para promover el crecimiento de las bacterias colónicas.

Palabras clave: Probióticos, Prebióticos, microbiota gastrointestinal, metodología “*in vitro*”

Abstract

This Final Degree Project (FDP) is closely related to the so called BIOTAGUT project (Modulation of the microbiome and postbiome by the intelligent design of food promoters of a healthy microbiota in relation to the metabolic syndrome). A competitive research project approved and supported by the Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain, through CDTI (Center for Industrial Technological Development).

The main objective of this FDP is to set up a fast and simple *in vitro* method that measure the prebiotic potential of these ingredients or extracts, previously characterized in BIOTAGUT project, which are kindly provided by three outstanding agri-food companies. This potential is understood as their ability to stimulate the growth of some bacteria that are present in human colonic microbiota (e.g. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera).

For the purpose of establishing this methodology (temperature, incubation time, dosage, etc.) we have used Orafti-GR inulin as a positive control. This molecule, derived from chicory, is recognized by EFSA (European Food Safety Authority) as an active prebiotic molecule. Specifically, colonic bacteria were incubated with different concentrations of Orafti-GR inulin, and the microbial growth was measured by registering the optical density at 600 nm (microtiter plate). Once the experimental conditions were established and the method was set up, we will evaluate the ability to promote the growth of some colonic bacteria by means of the selected ingredients or vegetal extracts.

Key words: Probiotics, Prebiotics, Gastrointestinal microbiota, “*in vitro*” methodology

Índice

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES	10
1.2. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL.....	10
1.3. PROBIÓTICOS	12
1.4. PREBIÓTICOS	13
1.4.1 Utilización de prebióticos por la microbiota intestinal.....	14
1.4.2 Oligosacáridos como prebióticos.....	15
1.4.3 Fibra dietética (FD)	15
1.4.4 Polifenoles	17
1.5. SIMBIÓTICOS.....	18
1.6. POSTBIÓTICOS	19
1.7. APTITUD PREBIÓTICA DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS. MÉTODOS PARA CUANTIFICARLA	19
1.7.1 Modelos <i>in vitro</i>	20
1.7.2 Modelos <i>in vivo</i>	21
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Microorganismos.....	23
3.2. Medios de cultivo	23
3.3. Suspensiones de trabajo.....	24
3.4. Curvas de crecimiento microbiano	25
3.3.1 Medida de la densidad óptica (DO).....	25
3.3.2 Medida del pH	25
3.3.3 Recuento de colonias bacterianas en placa.....	26
3.3.4 Modelo de Gompertz. Modelo matemático para ajustar las curvas de crecimiento y obtener parámetros cinéticos	26
3.5. Extractos vegetales	28
3.5.1 Caracterización nutricional de los extractos vegetales	28
3.5.2 Digestión <i>in vitro</i> de los extractos vegetales	28
3.6. Puesta a punto de la metodología de evaluación de aptitud prebiótica	30
3.6.1. Preparación de las suspensiones bacterianas	30
3.6.2. Rectas de calibrado.....	31
3.6.3. Preparación de las soluciones inulina GR Beneo	32
3.6.4. Evaluación de la actividad prebiótica (puesta a punto)	32
3.7. Análisis estadístico	33
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	34

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
5.1. Caracterización de la cinética de crecimiento de <i>Bifidobacterium breve</i> y <i>longum</i> y de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>reuteri</i> , <i>gasseri</i> y <i>casei</i>	36
5.2. Rectas patrón	39
5.3. Puesta a punto de la metodología para la cuantificación de aptitud prebiótica	41
5.4. Análisis estadístico	45
5.5. Digestión <i>in vitro</i> de los ingredientes y/o extractos vegetales.....	45
6. CONCLUSIONES	46
7. PRÓXIMOS PASOS	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	51
Anexo 1. Ficha técnica Inulina Orafti GR Beneo.....	51
Anexo 2. Composición nutricional de los medios de cultivo empleados en este trabajo.	53
Anexo 3. Gráficos correspondientes a las curvas de crecimiento microbiano con la medida de pH y DO	55
Anexo 4. Ejemplo práctico de cuantificación de aptitud prebiótica con extracto de Hibisco sobre el crecimiento de <i>L. casei</i> y <i>L. reuteri</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución y composición de diferentes especies bacterianas en el GIT. (Cardelle Cobas, s. f.).....	11
Figura 2 Clasificación de la flora bacteriana en función de sus efectos beneficiosos y perjudiciales sobre la salud. (Cardelle Cobas, 2009).....	12
Figura 3 Esquema para la evaluación del potencial prebiótico de nuevos sustratos	14
Figura 4 Clasificación de la fibra dietética según su peso molecular.....	16
Figura 5 Clasificación de la FD según su grado de solubilidad y capacidad de fermentación por acción de la microbiota colónica (Carbajal & UCM, 2018).....	17
Figura 6 Estructuras químicas de los principales polifenoles presentes en el té (Quality aspects of coffees and teas: Application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy to the elucidation of free radical and other processes)	18
Figura 7 Hoja de ruta para la cuantificación de la aptitud prebiótica de ingredientes alimentarios (Corzo et al, 2015).....	20
Figura 8 Metodología utilizada para la obtención de suspensiones en fase estacionaria	24
Figura 9 Metodología utilizada para el recuento en cámara Thoma	24
Figura 10 Metodología utilizada para la medida del pH	26
Figura 11 Metodología utilizada para el recuento en placas	26
Figura 12 Parámetros correspondientes a la curva de crecimiento en el Modelo de Gompertz. (Coll Cárdenas, Giannuzzi, Noia, & Zaritzky, 2001).....	27
Figura 13 Esquema del procedimiento de digestión <i>in vitro</i>	29
Figura 14 Metodología utilizada para preparar las suspensiones bacterianas utilizadas en el ensayo de cuantificación de aptitud prebiótica.....	31
Figura 15 Metodología utilizada para las rectas de calibración	32
Figura 16 Esquema de un ensayo de la evaluación de aptitud prebiótica de la Inulina GR Beneo en distintas concentraciones sobre el crecimiento de <i>L. casei</i> y <i>L. gasseri</i>	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Curva de crecimiento de <i>L. acidophilus</i> CECT 903(· R; - E)	36
Gráfico 2 Curva de crecimiento de <i>L. casei</i> CECT 475(· R; - E).....	36
Gráfico 3 Curva de crecimiento de <i>L. gasseri</i> CECT 4479(· R; - E).....	37
Gráfico 4 Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i> CECT 925 (· R; - E)	37
Gráfico 5 Curva de crecimiento de <i>B. breve</i> CECT 4839(· R; - E).....	37
Gráfico 6 Curva de crecimiento de <i>B. longum</i> LMG 13197(· R; - E).....	38
Gráfico 7 Recta patrón de <i>L. acidophilus</i> CECT 903	39
Gráfico 8 Recta patrón de <i>L. casei</i> CECT 475	40
Gráfico 9 Recta patrón de <i>L. reuteri</i> CECT 925.....	40
Gráfico 10 Recta patrón de <i>B. breve</i> CECT 4839.....	40
Gráfico 11 Recta patrón de <i>B. longum</i> LMG 13197.....	41
Gráfico 12 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de <i>L. acidophilus</i>	41
Gráfico 13 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de <i>L. casei</i>	42
Gráfico 14 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de <i>L. gasseri</i>	42
Gráfico 15 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo (14%) sobre el crecimiento de <i>L. gasseri</i> frente al control (0% inulina).....	43
Gráfico 16 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento <i>L. reuteri</i>	43
Gráfico 17 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo (14%) sobre el crecimiento de <i>L. reuteri</i> frente al control (0% inulina).....	44
Gráfico 18 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de <i>B. breve</i>	44
Gráfico 19 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de <i>L. longum</i>	44
Gráfico A2.1 Curva de crecimiento de <i>L. casei</i> CECT 475 en MRS	55
Gráfico A2.2 Curva de crecimiento de <i>L. gasseri</i> CECT 4479 en MRS.....	55
Gráfico A2.3 Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i> CECT 925 en MRS.....	56
Gráfico A2.4 Curva de crecimiento de <i>L. acidophilus</i> CECT 903 en MRS.....	56
Gráfico A2.5 Curva de crecimiento de <i>B. breve</i> CECT 4839 en LSM.....	57
Gráfico A2.6 Curva de crecimiento de <i>B. longum</i> LMG 13197 en LSM.....	57
Gráfico A4.1 Evaluación de actividad prebiótica de extracto de Hibisco sobre <i>L. casei</i> (ejemplo práctico)	58
Gráfico A4.2 Evaluación de actividad prebiótica de extracto de Hibisco sobre <i>L. reuteri</i> (ejemplo práctico)	58
Gráfico A4.3 Curva de crecimiento de <i>L. casei</i> en solución de extracto de Hibisco(ejemplo práctico)	58
Gráfico A4.4 Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i> en solución de extracto de Hibisco(ejemplo práctico)	58
Gráfico A4.5 Curvas de crecimiento de <i>L. casei</i> en MRS y extracto de Hibisco (ejemplo práctico)	59
Gráfico A4.6 Curvas de crecimiento de <i>L. reuteri</i> en MRS y extracto de Hibisco (ejemplo práctico)	59

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Digestión in vitro de té de guaraná (Fase Gástrica)	29
Ilustración 2 Preparación de la placa microtiter con las soluciones de inulina y las suspensiones bacterianas empleando la pipeta multicanal	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Efectos clínicos estudiados de los géneros bacterianos del GIT <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> sobre la salud humana (Figuroa González, 2007)	13
Tabla 2 Ejemplos de estudios realizados con prebióticos y su relación con los microorganismos probióticos (Corzo et al., 2015) (Figuroa González, 2007)	19
Tabla 3 Microorganismos utilizados en este estudio	23
Tabla 4 Extractos vegetales que serán empleados en el estudio de la aptitud prebiótica con sus correspondientes características y empresas a las que pertenecen	28
Tabla 5 Características principales de las fases de digestión oral, gástrica e intestinal.....	30
Tabla 6 Parámetros cinéticos (y coeficientes estadísticos) del modelo de Gompertz para cada una de las bacterias estudiadas	38
Tabla 7 Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de 14% de inulina frente a la control (0% de inulina).....	45
Tabla A1.1 Composición nutricional del medio de cultivo Iso-Sensiest Broth.....	53
Tabla A1.2 Composición nutricional del medio de cultivo MRS.....	54
Tabla A1.3 Composición nutricional del medio de cultivo Bifidobacterium Agar modified.....	54
Tabla A1.4 Composición nutricional de los medios de cultivo PYF sin fuente de carbono y PYF con fuente de carbono.....	54
Tabla A1.5 Receta solución de sales para el medio PYF	54

Abreviaturas y acrónimos empleados

En este apartado se detallan las abreviaturas y acrónimos utilizados en este trabajo, así como sus correspondientes significados:

AOAC: Asociación de comunidades analíticas

BAL: bacterias lácticas

CECT: colección española de cultivo

DO: densidad óptica

FAO: Food and Agriculture Organization

FD: fibra dietética

FOS: Fructooligosacáridos

GIT: tracto gastrointestinal

GOS: Galactooligosacáridos

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal

ISAPP: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

SCFA: ácidos grasos de cadena corta

SGF: fluido gástrico simulado

SIF: fluido intestinal simulado

SSF: fluido salival simulado

UFC: unidades formadoras de colonias

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

Un alimento funcional se define como aquel que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporciona beneficios para la salud o reduce el riesgo de padecer enfermedades (Olagnero et al., 2007). En la actualidad, los consumidores están cada vez más concienciados de la relación existente entre la dieta y la salud, lo que ha impulsado el desarrollo y la comercialización de una nueva generación de alimentos con alto valor añadido (alimentos funcionales).

La elaboración de los alimentos funcionales se rige por el Reglamento de la UE: (CE) nº 258/97. Dicho reglamento se refiere a nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, los cuales se definen como “alimentos e ingredientes alimentarios que no han sido usados para el consumo humano de forma significativa dentro de la Comunidad antes de la entrada en vigor de esta ley”. Además, el Consejo y el Parlamento Europeo establecieron una nueva normativa acerca del uso de alegaciones nutricionales y de salud. Dicho reglamento establece normas armonizadas para la utilización de alegaciones tales como “bajo contenido en grasa”, “alto contenido en fibra” y “ayuda a bajar el colesterol”, en base a los perfiles nutricionales de los correspondientes productos alimentarios.

Actualmente, existe una gran variedad de compuestos que tienen una determinada actividad funcional y que podrían utilizarse como ingredientes alimentarios o suplementos dietéticos. Sin embargo, son únicamente cinco las categorías en las que se clasifican:

- › Fitoquímicos
- › Probióticos
- › Prebióticos
- › Ácidos grasos poliinsaturados
- › Péptidos/proteínas bioactivas

El conocimiento de la composición y actividad de la microbiota intestinal es muy importante para poder conocer el efecto que estos ingredientes ejercen sobre el organismo. (Cardelle Cobas, 2009)

1.2. MICROBIOTA GASTROINTESTINAL

Las bacterias que habitan en el tracto gastrointestinal (GIT) humano constituyen un verdadero ecosistema que va variando en cada tramo del intestino, tanto en número como en composición de las especies que lo constituyen (Figura 1). En los tramos intestinales altos, el pH es bastante ácido por lo que la colonización es similar a la del estómago. Según se avanza en el intestino delgado, disminuye la acidez debido a la dilución de los ácidos y a la presencia de sales biliares, lo que facilita la colonización bacteriana que aumenta en el colon dando lugar a que más de la tercera parte del contenido en materia seca de las heces sean bacterias.

De todas las especies bacterianas, unas son beneficiosas y otras patógenas, por lo que la actividad metabólica de las mismas puede tener un efecto tanto positivo como negativo en nuestra salud. Por lo tanto, el mantenimiento de un balance adecuado en el ecosistema a favor de las bacterias beneficiosas es fundamental para nuestro organismo.

Las bacterias indeseables incluyen, entre otras, especies del género *Clostridium* y *Veillonella*. Estas especies originan sustancias potencialmente perjudiciales tales como productos

putrefactivos, toxinas y carcinógenos que pueden causar efectos como diarrea, infecciones, daños en el hígado, carcinogénesis y putrefacción intestinal. (Cardelle Cobas, 2009). También existen especies que contribuyen a varias enfermedades patológicas, trastornos, incluida la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, que son los dos tipos principales de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Estas enfermedades se caracterizan por una inflamación persistente de la mucosa a diferentes niveles del GIT.

Las bacterias beneficiosas incluyen principalmente especies del género *Lactobacillus*, bacterias englobadas dentro de las bacterias lácticas (BAL) y del género *Bifidobacterium*, ambas juegan papeles básicos en funciones nutricionales y en la prevención de enfermedades. La microbiota intestinal realiza muchas funciones diferentes, entre ellas cabe destacar: **nutrición** [fermentación de sustratos no digeribles que produce la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), absorción de iones, producción de aminoácidos y vitaminas, etc.]; **protección** (el efecto barrera evita la invasión por parte de microorganismos extraños/patógenos); y **efectos tróficos** sobre el epitelio intestinal y el sistema inmunológico (desarrollo y homeostasis de la inmunidad local y sistémica). (Cardelle Cobas, 2009)

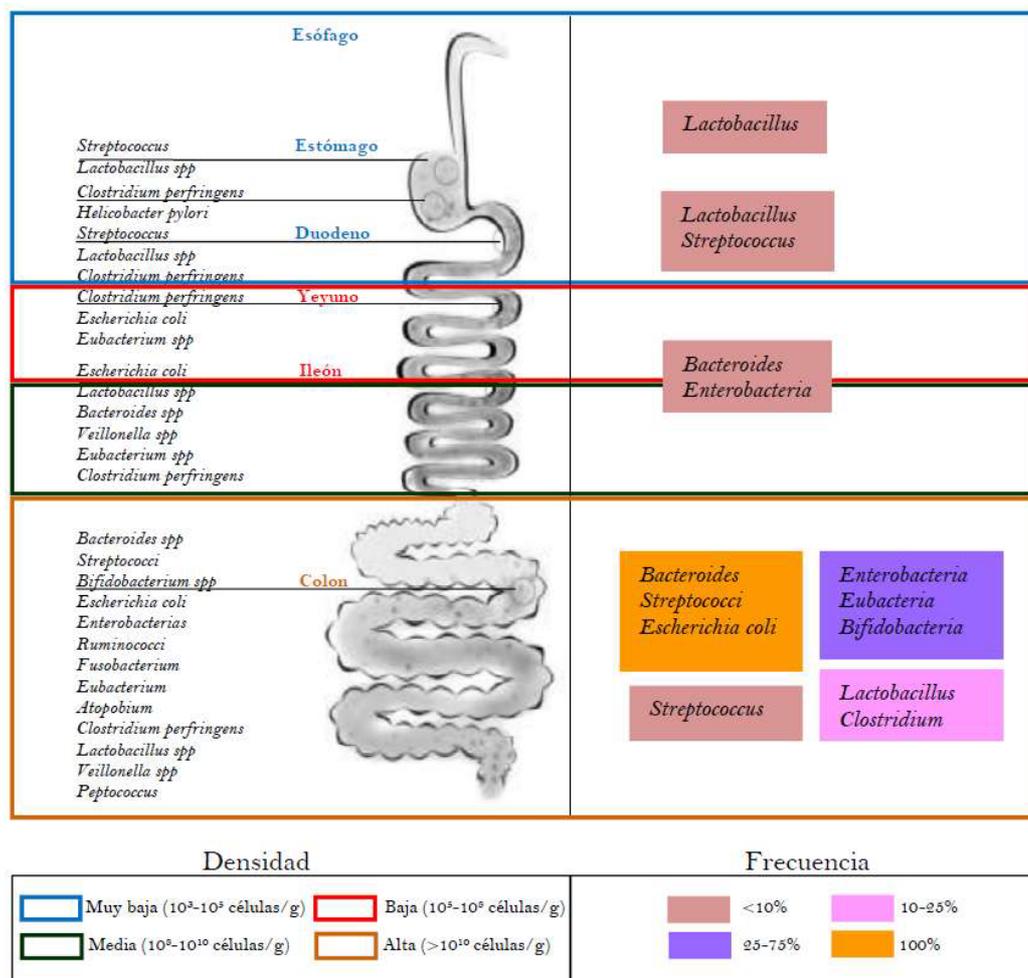


Figura 1 Distribución y composición de diferentes especies bacterianas en el GIT (Cardelle Cobas, s. f.)

Como ya se ha adelantado, además de la absorción y la digestión, el GIT también presenta la función de defensa del huésped más grande del cuerpo. En la Figura 2 se muestra la clasificación de las especies bacterianas presentes en el GIT en función del efecto que ejercen sobre la salud:

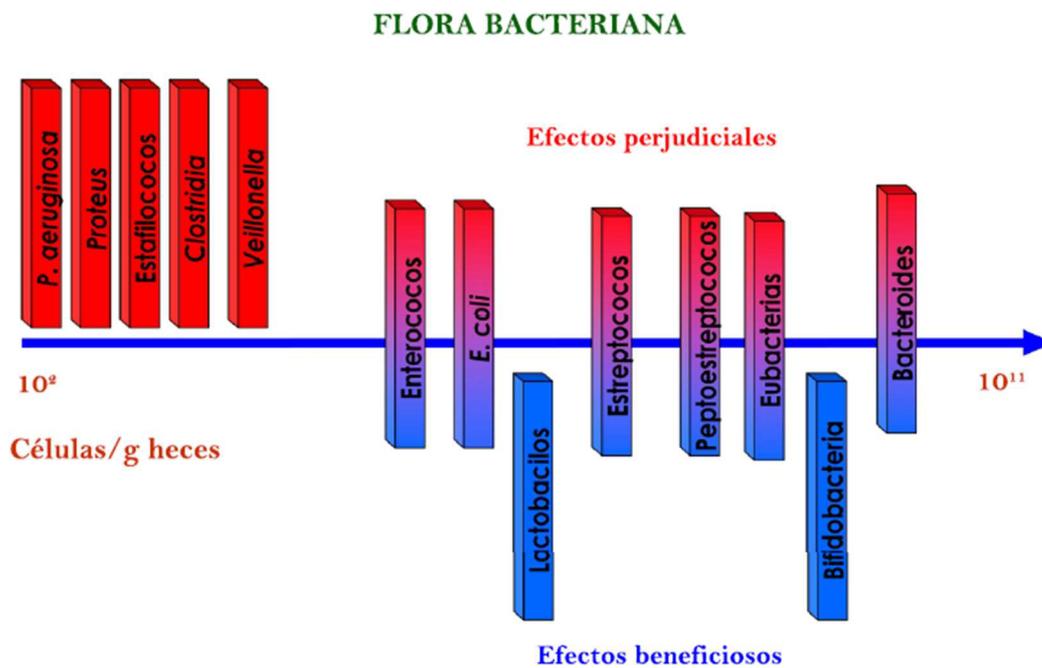


Figura 4 Clasificación de la flora bacteriana en función de sus efectos beneficiosos y perjudiciales sobre la salud (Cardelle Cobas, 2009)

1.3. PROBIÓTICOS

Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan de forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino. (Ronald Ross & R. Preedy, 2016). Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo y son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan, entre otros efectos, para prevenir infecciones entéricas y/o gastrointestinales. Para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico, debe cumplir los siguientes criterios (de las Cagigas Reig & Blanco Anesto, 2002):

- Ser aislado de la misma especie que su huésped previsto
- Tener un efecto beneficioso demostrable sobre el huésped
- No ser patógeno
- Ser capaz de sobrevivir a través del GIT
- Ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución

La lista de microorganismos probióticos continúa creciendo e incluye, según numerosos estudios realizados, cepas de BAL tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, *Streptococcus salivarius* y otras cepas no patógenas de microorganismos patógenos (ej: *E. coli* Nissle 1917) (Wu, Zhang, Ren, & Ruan, 2017) (Sonnenborn, 2016) (Ku, Park, Ji, & You, 2016).

Las acciones de los probióticos son útiles para ayudar al GIT a descomponer azúcares y carbohidratos para promover la buena digestión, estimular el sistema inmunológico, mantener el pH intestinal adecuado y competir con éxito con los patógenos. Las bacterias probióticas presentan funciones diferentes entre ellas. Mientras que algunas modulan la microflora intestinal y previenen la diarrea, otras refuerzan la pared intestinal al desplazar a los microorganismos patógenos, lo que ayuda a prevenir su adhesión al intestino humano (Watson & Preedy, 2016). A continuación, se muestra una tabla de efectos Probióticos clínicos en humanos:

Tabla 1 Efectos clínicos estudiados de los géneros bacterianos del GIT *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* sobre la salud humana (Figuerola González, 2007)

Género	Especie	Efecto clínico
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Reducción en el tiempo de la duración de la diarrea por rotavirus. Colonización del GIT
	<i>acidophilus</i>	Inhibición de bacterias patógenas, adhesión a las células intestinales humanas
	<i>casei</i>	Modulación de la flora intestinal, efectos positivos en tratamientos contra el cáncer, disminución de la actividad enzimática en las heces fecales
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	Exclusión competitiva de <i>E.coli</i> , inhibición de <i>E.coli</i> de la superficie de la mucosa intestinal humana
	<i>bifidum</i>	Reducción de la duración de la diarrea y aumenta la respuesta inmunológica

1.4. PREBIÓTICOS

Los primeros estudios sobre prebióticos demostraron, en cultivos *in vitro* utilizando como inóculo heces humanas, que ciertos oligosacáridos no digeribles [fundamentalmente fructooligosacáridos (FOS)] eran fermentados selectivamente por bifidobacterias y que además, tenían la capacidad de estimular su crecimiento. Los resultados de estas investigaciones fueron confirmados por Gibson y Roberfroid, investigadores que propusieron la primera definición de prebiótico: “*Es un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies bacterianas en el colon, y que por lo tanto mejora la salud*” (Corzo et al., 2015).

Posteriormente, estos investigadores revisaron y ampliaron este concepto y definieron de nuevo los prebióticos como: “*ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador*” (Corzo et al., 2015).

Diferentes organismos internacionales tales como la Food and Agriculture Organization (FAO) de Naciones Unidas y la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) definieron, posteriormente, los prebióticos como: “*ingredientes alimentarios que al ser*

fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo” (Corzo et al., 2015).

Los prebióticos son indigestibles por las enzimas humanas y por ello sirven como alimento en el intestino para los microorganismos colonizantes beneficiosos. Al proporcionarles sustrato, se favorece el crecimiento de los miembros más beneficiosos de la microbiota para que crezcan y metabolicen los alimentos (Scott, s. f.).

1.4.1 Utilización de prebióticos por la microbiota intestinal

Dado que la microbiota del intestino grueso puede dar lugar a compuestos beneficiosos para la salud, actualmente existe un gran interés en implantar dietas que promuevan el crecimiento de estos grupos bacterianos. En la siguiente Figura (Figura 3) aparecen especificados los principales metabolitos generados por acción de los microorganismos en el intestino grueso a partir de algunos sustratos ingeridos en la dieta. Indicar que en **negrita y subrayados** se resaltan los metabolitos originados por acción microbiana tras la metabolización de carbohidratos prebióticos.

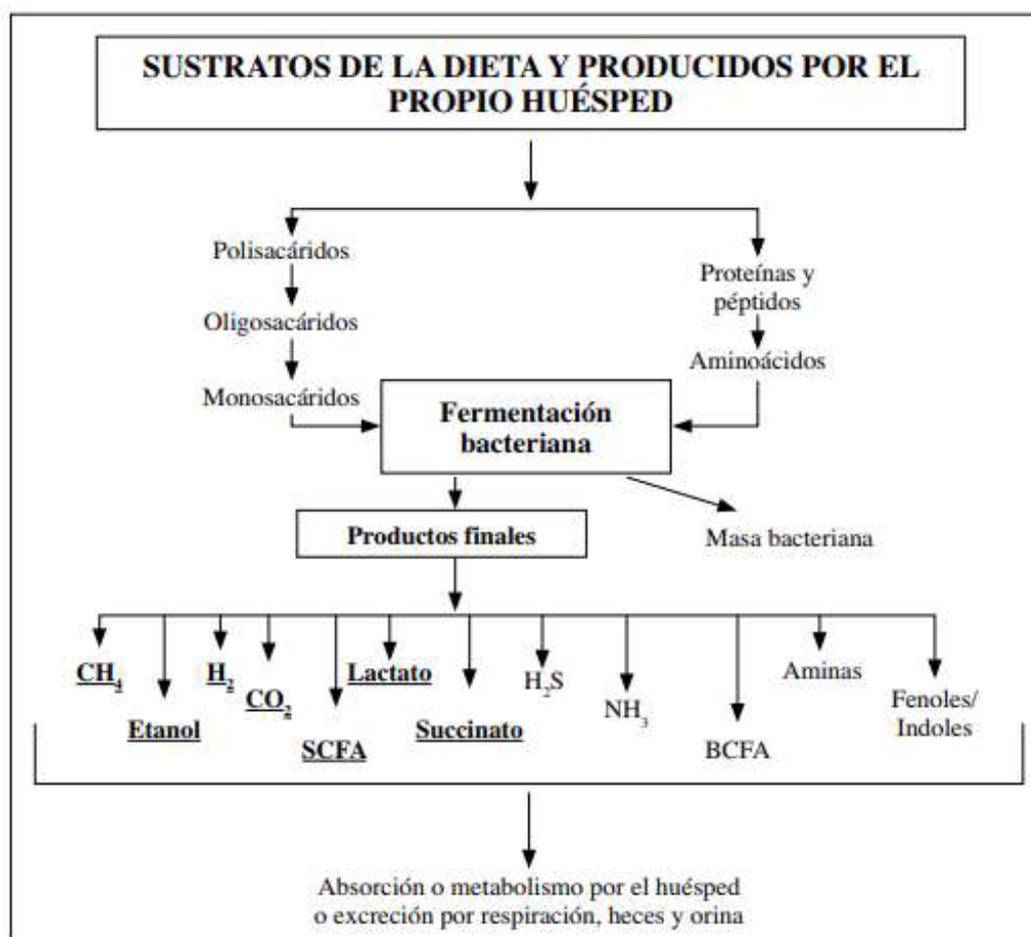


Figura 3 Esquema de los sustratos de la dieta y los metabolitos resultantes de la fermentación bacteriana (Harish & Varghese, 2006)

Tras la ingestión de un alimento se originan gases tales como H₂, CO₂ y CH₄ que no tienen efectos negativos, con la excepción de producir flatulencia e hinchazón; y SCFA, además de lactato, que son beneficiosos tanto para la microbiota intestinal (disminuyendo ligeramente el pH), como para las células intestinales (que necesita estos SCFA para obtener energía). El etanol producido es

metabolizado rápidamente por otras bacterias intestinales y no ejerce ningún efecto en el hospedador. También se generan SH₂, BCFA y NH₃ por el metabolismo de las proteínas, que tienen efectos negativos sobre el individuo. Por esta razón, una excesiva fermentación de las proteínas, especialmente en el colon, se ha relacionado con enfermedades tales como cáncer de colon o enfermedades inflamatorias del intestino. Por todo lo expuesto, es muy importante favorecer la utilización de los carbohidratos prebióticos en el intestino grueso (Harish & Varghese, 2006).

1.4.2 Oligosacáridos como prebióticos

Los oligosacáridos no digeribles son los únicos compuestos que pueden ser considerados como prebióticos según numerosos estudios realizados (Krumbeck, Maldonado-Gomez, Ramer-Tait, & Hutkins, 2016) (Wilson & Whelan, 2017) (Laurell & Sjöberg, 2017). Entre ellos se encuentran componentes como **Fructooligosacáridos (FOS)**, **Galactooligosacáridos (GOS)** y **fibra dietética (inulina)**. Para que una sustancia (o grupo de sustancias) pueda ser definida como prebiótica debe cumplir los requisitos siguientes:

- Ser de origen vegetal
- Formar parte de un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas
- No ser digerida por las enzimas digestivas
- Ser parcialmente fermentada por las bacterias colónicas
- Ser osmóticamente activa

Los prebióticos pueden usarse como suplementos alimenticios, proveyendo a los consumidores de una manera fácil de aumentar el consumo de fibra dietética. Los suplementos claramente etiquetados pueden espolvorearse directamente sobre los alimentos, disueltos en bebidas o tomando cápsulas, tabletas o productos masticables. Debido a que los prebióticos más comúnmente disponibles son solubles en agua y completamente transparentes en ella, se incorporan fácilmente a la mayoría de los alimentos y no pueden detectarse.

Los alimentos especiales, como las bebidas para deportistas, los polvos para perder peso, los sustitutos de comidas con proteínas listas para tomar y las barritas nutricionales, proporcionan una forma popular para que las personas obtengan fibra prebiótica. Estos alimentos a menudo contienen FOS, alguna forma de inulina o almidón resistente por su contenido en fibra y sus ventajas prebióticas (Watson & Preedy, 2016).

1.4.3 Fibra dietética (FD)

En general, se reconoce que la FD es una parte esencial de la alimentación humana. Toda la FD llega al intestino grueso sin haber sido transformada digestivamente. Las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas digestivas de gran actividad metabólica, la pueden digerir en mayor o menor medida dependiendo de su composición química y su estructura hasta azúcares más sencillos.

La FD se puede clasificar según diferentes criterios: origen botánico, naturaleza química de sus componentes, peso molecular (Figura 5), grado de viscosidad, etc.

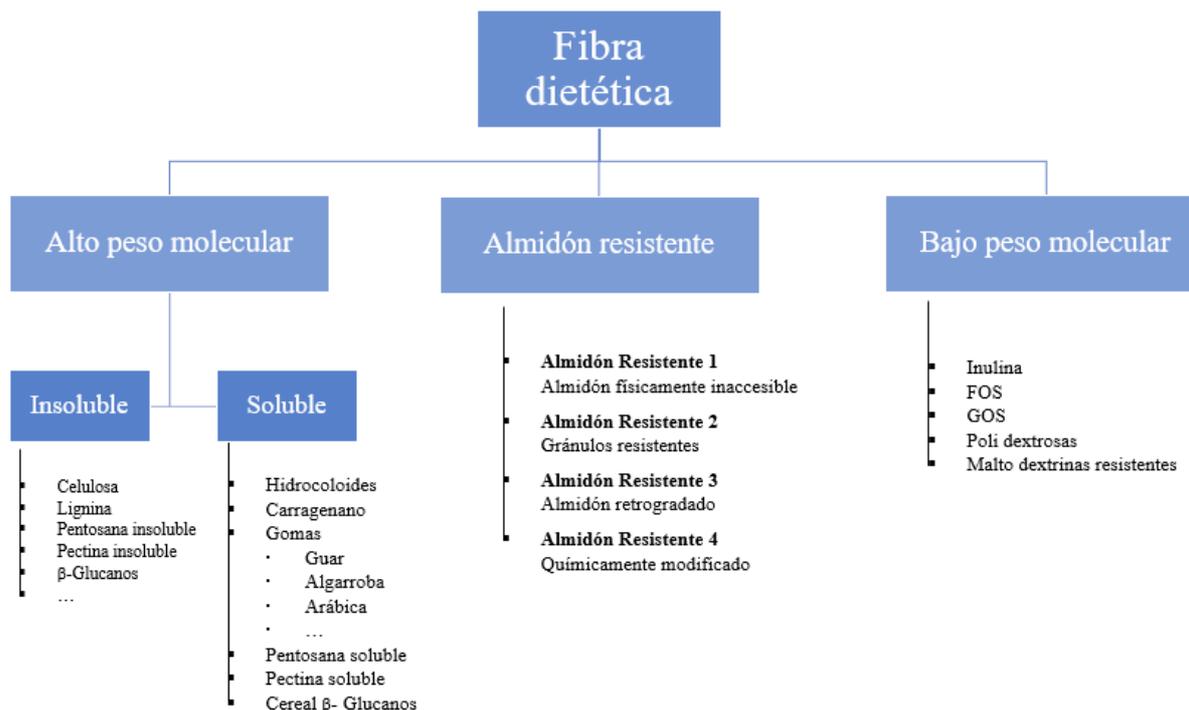


Figura 4. Clasificación de la fibra dietética según su peso molecular

Sin embargo, desde el punto de vista funcional y nutricional resulta más práctica la clasificación que relaciona las características que determinan sus efectos beneficiosos para la salud: la solubilidad en agua y la capacidad de ser fermentada por la microbiota del colon. Atendiendo a estas características hablamos de fibra insoluble y fibra soluble (Figura 5):

- **Fibra insoluble:** son compuestos que debido a su composición química presentan una escasa capacidad para retener agua y crear así soluciones viscosas tanto en el estómago como en el intestino delgado. Este tipo de fibra actúa principalmente en el intestino grueso aumentando el peso y el volumen de las heces, lo que provoca una aceleración del tránsito intestinal y, por consiguiente, un efecto laxante. En comparación con las fibras solubles, son como norma general, menos susceptibles a ser fermentadas por acción de la microbiota. Forman parte de este grupo: la celulosa, algunas hemicelulosas, la lignina y el almidón resistente (Carbajal & UCM, 2018).
- **Fibra soluble:** son compuestos que forman soluciones muy viscosas en agua tanto en el estómago como en el intestino delgado debido a su capacidad para retener agua. Son capaces de ralentizar el vaciamiento gástrico y una vez que abandonan el estómago y llegan al colon son, en general, altamente fermentables por la microbiota colónica desencadenando numerosos efectos beneficiosos (ver apartado 1.5). Forman parte de este grupo: las gomas, mucílagos, pectinas, determinadas hemicelulosas, la inulina, los FOS y los GOS (Carbajal & UCM, 2018).

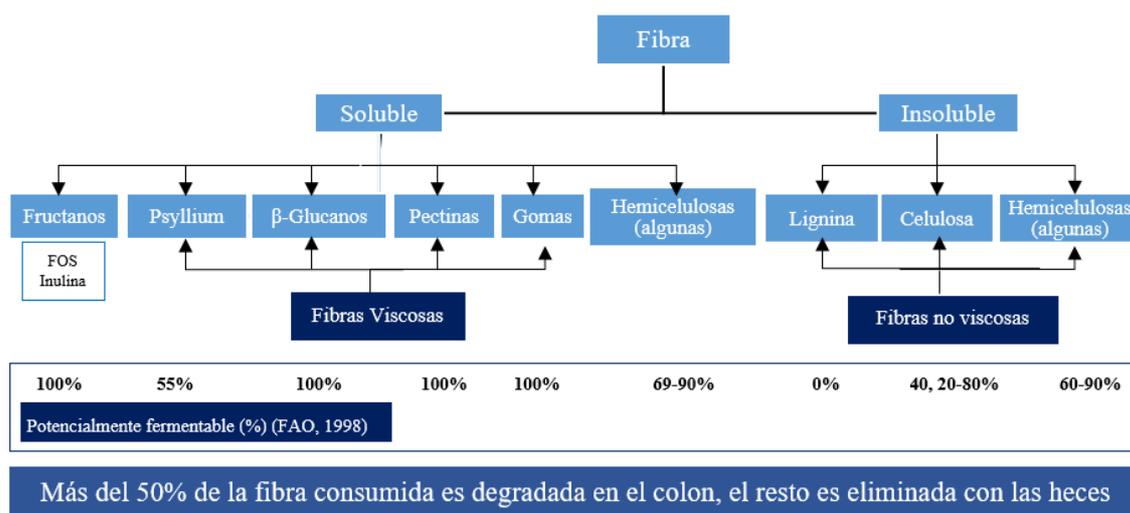


Figura 5 Clasificación de la FD según su grado de solubilidad y capacidad de fermentación por acción de la microbiota colónica (Carbajal & UCM, 2018).

Hay que destacar que todos los tipos de FD (excepto lignina) pueden ser fermentados por las bacterias colónicas, siendo las solubles fermentables en mayor proporción que las insolubles.

Como ya se ha comentado anteriormente, la inulina es un ejemplo de compuesto prebiótico. Constituye un ingrediente alimenticio natural, extraído de las raíces de la achicoria y se encuentra presente en otras plantas como la cebolla, el ajo o el espárrago. Este compuesto modula positivamente la fisiología del sistema gastrointestinal, fundamentalmente en cuanto al aumento del peso de las heces y la frecuencia de evacuación intestinal. Actualmente se estudian otros efectos como el aumento de la absorción de calcio, la estimulación del sistema inmunológico y la reducción del riesgo de cáncer de colon.

La fibra inulina Orafiti Beneo, procedente de las raíces de la achicoria, es la única fibra dietética reconocida por la EFSA (European Food Safety Authority) como prebiótica (Véase ficha técnica en Anexo 1). Según el estudio realizado por esta entidad, esta inulina totalmente fermentable tiene la capacidad de aumentar la frecuencia de los movimientos intestinales y, por lo tanto, mejorar la función intestinal. La inulina resiste la hidrólisis y la absorción en el intestino delgado humano, pero alcanza el intestino grueso esencialmente completo, donde se fermenta a SCFA, lactato y gases por acción de las bacterias colónicas. Esto se acompaña de un aumento en la masa celular bacteriana y un mayor contenido en agua en la digesta. De esta manera, la inulina Orafiti-GR conduce a heces más blandas y facilita la excreción, así como a un aumento en la frecuencia de los movimientos intestinales. Según el estudio realizado, para obtener el efecto reivindicado, se deben consumir diariamente 12 gramos de “Inulina nativa de achicoria” (EFSA, 2015).

1.4.4 Polifenoles

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles y se originan principalmente en las plantas. Numerosos estudios han avalado las propiedades biológicas de los polifenoles (Schroeter et al., 2006) (Pérez-Vizcaino, Duarte, Jimenez, Santos-Buelga, & Osuna, 2009) (Bravo, 1998). Estos efectos son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras. Los polifenoles son, en realidad, los

principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides. Algunos alimentos destacan por su alto contenido en polifenoles, como los tés (Figura 6). Los polifenoles del té (flavonoides epigallocatequina galato muestran una fuerte capacidad antioxidante *in vitro*, y su efecto es hasta 5 veces más efectivo que el de la vitamina C o E (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

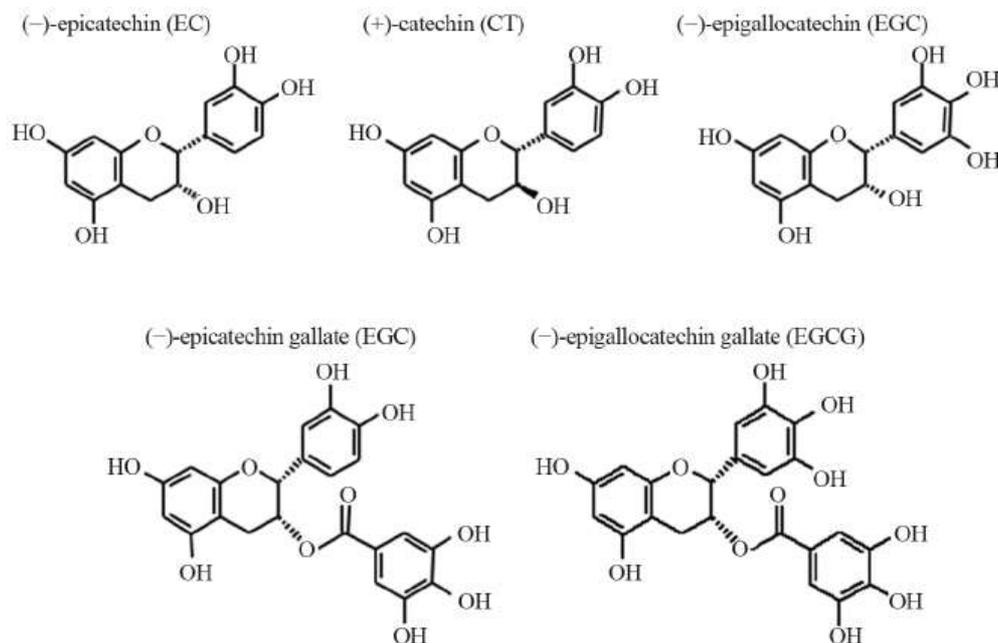


Figura 6 Estructuras químicas de los principales polifenoles presentes en el té (Quality aspects of coffees and teas: Application of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy to the elucidation of free radical and other processes).

1.5. SIMBIÓTICOS

La combinación de prebióticos con probióticos se ha definido como simbiótico. (de las Cagigas Reig & Blanco Anesto, 2002). Los prebióticos constituyen el sustrato fundamental de las bacterias probióticas, y las sinergias potenciales entre los probióticos y los prebióticos se han considerado eficientes debido a la mejora de la supervivencia y a la implantación de suplementos dietéticos microbianos vivos en el tracto gastrointestinal. Los prebióticos pueden estimular el crecimiento de cepas específicas y por tanto contribuir a la instalación de una microflora bacteriana específica con efectos beneficiosos para la salud (Watson & Preedy, 2016).

Un ejemplo de este sinergismo lo constituye la relación de la cantidad de fibra dietética en la dieta con respecto a los cambios en determinadas poblaciones de la microflora intestinal: una dieta pobre en fibra puede producir cambios en la ecología de la microflora intestinal y una disminución en la población de *Lactobacillus*. Es un compromiso el desarrollo de alimentos funcionales que aporten carbohidratos no digeribles que puedan proporcionar cantidades óptimas de sustrato para la nutrición y desarrollo de las bacterias del colon, activando la producción de SCFA, ácido láctico y energía (de las Cagigas Reig & Blanco Anesto, 2002). La siguiente Tabla (Tabla 2) resume los resultados obtenidos en algunos estudios en los que se ha analizado el efecto sinérgico (simbióticos) mencionado anteriormente.

Tabla 2 Ejemplos de estudios realizados con prebióticos y su relación con los microorganismos probióticos (Corzo et al., 2015) (Figuroa González, 2007)

Estudio	Desarrollo y resultados
Fermentación <i>in vitro</i> de inulina por bacterias que crecen en el intestino grueso humano	Se comparó la fermentación <i>in vitro</i> de la inulina con carbohidratos de referencia mediante la medición de los productos finales formados en el cultivo. Los datos sobre crecimiento bacteriano mostraron que la inulina ejerció un efecto estimulante sobre los géneros de Bifidobacterias, mientras que mantiene las poblaciones de patógenos potenciales (<i>E.coli</i> y <i>Clostridium</i>) en niveles bajos.
Selección de <i>Bifidobacterias</i> y <i>Lactobacillus</i> en un cultivo continuo utilizando FOS como sustrato	En este experimento se siguieron los cambios en las poblaciones de BAL durante un período de 21 días. El recuento microbiano mostró que la población de Bifidobacterias y Lactobacilos se incrementó del 1,9% en el día 1 a 98,1% en el día 21. Las Bifidobacterias mantuvieron niveles de entre 10-20% respecto a la población total en los primeros 6 días mientras que los niveles de lactobacilos estuvieron bajos; tras 9 días de ingesta de FOS, la población de lactobacilos alcanzó niveles altos (20-42%) permaneciendo así hasta el día 21.

1.6. POSTBIÓTICOS

El término postbiótico hace referencia a la idea de incluir todas las moléculas funcionales bioactivas que pueden ser utilizadas o producidas por la comunidad bacteriana para promover la salud. Los postbióticos producidos por la microbiota intestinal pueden ser metabolitos tales como:

- SCFA. Está bien establecido que estos ácidos desempeñan un papel crítico en la salud del colon, particularmente en el mantenimiento del revestimiento epitelial. Su presencia abundante es crítica para la renovación y diferenciación de las células epiteliales colónicas. También se han realizado estudios acerca de sus efectos antitumorales en líneas celulares de cáncer de colon. (Patil, Sawant, Hauff, & Hampp, 2018).
- Indol procedente del aminoácido triptófano (Huć, Nowinski, Drapala, Konopelski, & Ufnal, 2018).
- Ácido gamma-aminobutírico (neurotransmisor) del ácido glutámico (Li & Cao, 2010).
- Compuestos polifenólicos (Kim et al., 2018).
- Otros compuestos funcionales

1.7. APTITUD PREBIÓTICA DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS. MÉTODOS PARA CUANTIFICARLA

La aptitud prebiótica de ingredientes alimentarios es la capacidad que tienen los mismos para poseer un efecto prebiótico sobre el individuo que los ingiere. Se han desarrollado un gran número de modelos para evaluar la fermentación intestinal de los prebióticos previamente caracterizados (origen, fuente, pureza, composición química y estructura). En la Figura 7 resume las diferentes fases a seguir para evaluar y validar el carácter prebiótico de un compuesto (escrutinio, validación y demostración). En primer lugar, se realizan estudios *in vitro* con el objetivo de seleccionar el/los sustrato/s con mayor potencial prebiótico. A continuación, los sustratos previamente seleccionados serán validados en modelos animales. Finalmente, el sustrato seleccionado será el candidato para llevar a cabo los estudios de intervención en humanos que permitan evaluar su eficacia en el lugar de acción y demostrar científicamente su capacidad prebiótica. La FAO indica

que debe de realizarse una caracterización funcional del prebiótico mediante la utilización de diferentes modelos (Corzo et al., 2015).

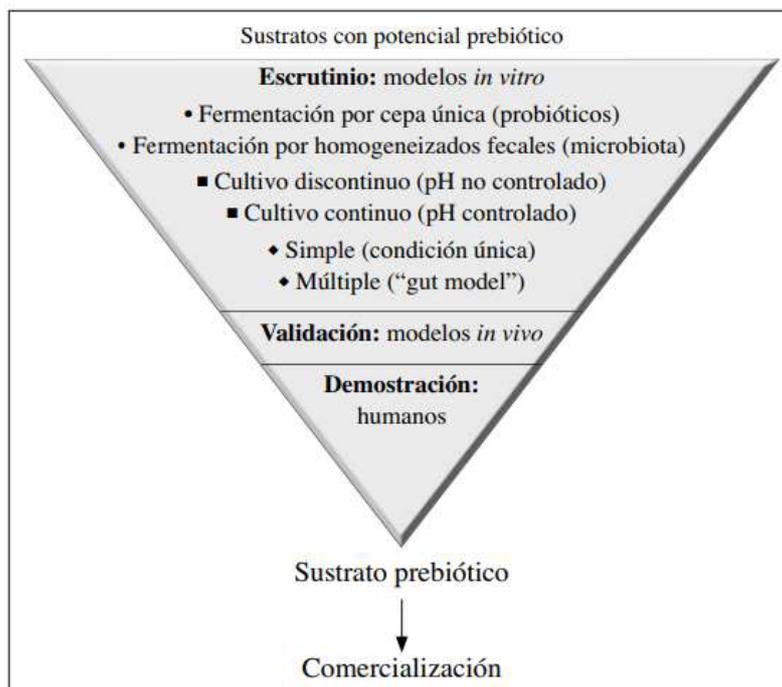


Figura 7 Hoja de ruta para la cuantificación de la aptitud prebiótica de ingredientes alimentarios (Corzo et al., 2015).

1.7.1 Modelos *in vitro*

Para estudiar la biodegradación de compuestos con potencial prebiótico, el modelo más simple consiste en evaluar el comportamiento de cultivos simples definidos, generalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en presencia del sustrato a valorar. Uno de los objetivos de este estudio es poner a punto un método para evaluar la aptitud prebiótica *in vitro* de determinados ingredientes alimentarios (extractos/ingredientes vegetales).

Para ello es necesario considerar previamente algunos aspectos, entre ellos: qué especies bacterianas van a ser evaluadas, cuáles son sus condiciones de cultivo idóneas (medios de cultivo, temperatura, aeración, etc.) y realizar sus correspondientes curvas de crecimiento para caracterizar las distintas fases del crecimiento bacteriano (latencia, crecimiento exponencial, estacionaria y de muerte celular). Y de este modo poder comparar el comportamiento de las bacterias seleccionadas (entendido como crecimiento) en presencia y ausencia del extracto/ingrediente vegetal cuya potencialidad prebiótica se quiere testar.

Para ello, hay que tener en cuenta las bacterias que van a utilizarse y realizar sus curvas de crecimiento correspondientes en su medio idóneo. De esta manera, podrán compararse los resultados de dicha curva con los que se obtengan al emplear otros ingredientes y posteriormente analizarlos (Corzo et al., 2015).

Digestión *in vitro*

Los alimentos, en el organismo, sufren un proceso de digestión antes de llegar al GIT. Por esta razón, consideramos que para poder cuantificar de forma más realista la potencial aptitud prebiótica de los extractos vegetales/ingredientes seleccionados era recomendable simular previamente su digestión a escala de laboratorio. Por ello decidimos incluir en el ensayo una etapa anterior de digestión *in vitro*.

Si bien es cierto que la presencia de compuestos bioactivos en la dieta, tales como la fibra dietética y los polifenoles, está relacionada con los beneficios descritos anteriormente en el apartado 1.4, su repercusión sobre la salud depende del estado bioquímico en el que llegan al torrente sanguíneo y a los tejidos. El proceso de digestión conlleva una serie de cambios en los macro y micronutrientes condicionando así, su biodisponibilidad final. Por ello, resultan de gran interés los ensayos de digestión *in vitro*, dado que los resultados obtenidos son reproducibles y de costo bajo.

1.7.2 Modelos *in vivo*

Los ensayos *in vivo* con animales de experimentación son útiles para confirmar el efecto de los prebióticos sobre la dinámica y actividad de la microbiota intestinal. El modelo más empleado es el de roedor, en el que se suministra el sustrato prebiótico a los animales por vía oral, en agua, en la comida o por sonda gástrica. Durante el período de intervención se recogen muestras de heces a distintos tiempos para analizar la dinámica de la microbiota intestinal. Finalmente, si así lo requiere el ensayo, se sacrifican a los animales y se procede al análisis completo del contenido intestinal, contenido cecal y tejidos.

Por otro lado, se han empleado animales libres de microorganismos (*germ-free*) que se colonizan con microbiota humana, permitiendo de este modo estudiar *in vivo* el efecto de potenciales prebióticos, considerando, además, las consecuentes diferencias debidas al organismo animal.

Para completar los estudios que permiten demostrar científicamente la eficacia de los prebióticos, es necesario llevar a cabo estudios en seres humanos (ensayos clínicos). Actualmente, existe la metodología para evaluar distintos tipos de respuestas digestivas (Corzo et al., 2015):

- **Intraluminales** (volumen de gas o heces, productos metabólicos, composición/actividad metabólica de la microbiota)
- **Sensitivas** (cognitiva, hedonista)
- **Motoras** (motilidad, tránsito)
- **Función de membrana** (secreción-absorción)

Hay que recalcar que todos los ensayos *in vivo* deben realizarse de acuerdo a la normativa legal y ética vigente a nivel regional, estatal o internacional según sea el ámbito de aplicación y, bajo la supervisión del correspondiente Comité Ético autorizado para tal efecto.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es poner a punto un nuevo método *in vitro* para cuantificar la aptitud prebiótica de vegetales/ingredientes de distinto origen vegetal basado en medidas espectrofotométricas.

Como objetivos específicos del estudio se plantean los siguientes:

1. Caracterización del crecimiento (parámetros cinéticos) de las bacterias propuestas como indicadores: *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *L. casei*, *B. breve* y *B. longum*.
2. Digestión *in vitro* de los extractos/ingredientes vegetales
3. Definición de los pasos del método de ensayo *in vitro* y de las condiciones experimentales para cuantificar la aptitud prebiótica.

El resultado que se espera obtener del trabajo realizado es, en primer lugar, poner a punto el método “*in vitro*” para cuantificar la aptitud prebiótica de ingredientes/extractos vegetales, establecer las condiciones experimentales adecuadas para el crecimiento de las bacterias de interés, estudiar su comportamiento frente a las posibles variables que afectan a la técnica y optimizar el proceso.

El éxito del estudio es conseguir que la puesta a punto tenga la mayor reproducibilidad posible para las mismas condiciones de trabajo, así como la optimización del mismo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron los microorganismos detallados en la Tabla 3. Todas las bacterias se conservan en crioviales almacenados en ultra congelador (Sanyo MDP-U7386S N° 08060089) a -80°C hasta su uso.

Tabla 3 Microorganismos utilizados en este estudio

Microorganismo	Origen	Condiciones de cultivo	Fuente
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT ¹ 903	MRS; 37°C; anaerobiosis	Heces humanas
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475	MRS; 37°C; anaerobiosis	Queso
<i>Lactobacillus gasseri</i>	CECT 4479	MRS; 37°C; anaerobiosis	Boca humana
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CECT 925	MRS; 37°C; anaerobiosis	Intestino adulto
<i>Bifidobacterium breve</i>	CECT 4839	MRS; 37°C; anaerobiosis	Intestino adulto
<i>Bifidobacterium longum</i>	LMG ² 13197	MRS; 37°C; anaerobiosis	Intestino infantil

¹CECT: Colección española de cultivo

²LMG/BCCM: Belgian coordinated collections of microorganisms

3.2. Medios de cultivo¹

Como medios de crecimiento de las diferentes especies de *Lactobacillus* se utilizaron:

- **MRS caldo** suministrado por la firma Merck KGaA (medio líquido).
- **MRS agar** suministrado por la firma Merck KGaA (medio sólido).

Como medio de crecimiento de las diferentes especies de *Bifidobacterium* se utilizaron:

- **LSM caldo.** Este medio se formula empleando MRS (90% v/v) e Iso-Sensitest Broth (10 %v/v), este último, suministrado por la firma Oxoid. La mezcla se suplementa con 0.3 g/L de cisteína. Ante la dificultad de encontrar medios de cultivo líquidos específicos para el cultivo de Bifidobacterias, se decidió emplear este medio de cultivo recomendado en la ISO 10932 [Leche y productos lácteos: determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antibióticos aplicables a las Bifidobacterias y BAL del no enterocólicas] para el crecimiento de este grupo bacteriano.
- **LSM agar.** LSM caldo suplementado con 15 g/L agar bacteriológico
- **Bifidobacterium agar** suministrado por la firma BD Bioscience

El MRS caldo y LSM caldo se emplearon para preparar los cultivos bacterianos líquidos denominados precultivos (10 mL) y suspensiones bacterianas (50 mL) (Figura 8), así como para la realización de las curvas de crecimiento y las rectas recuento microbiano (UFC/mL) vs densidad óptica (DO) (“rectas de calibrado o rectas patrón”), mientras que el MRS agar, LSM agar y Bifidobacterium agar se emplearon para realizar agotamientos por estrías, réplicas y recuentos microbianos en placa.

¹ La composición nutricional de todos los medios de cultivo aparece recogida en el Anexo 2.

Para el estudio de la aptitud prebiótica se utilizaron dos medios de cultivos tanto para *Lactobacillus* como para *Bifidobacterium*: **PYF sin fuente de carbono** y **PYF con fuente de carbono**. Todos los medios se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante y una vez formulados, se esterilizaron en la autoclave a 121°C durante 20 minutos (modelo HI CLAVE HG 80, 230V). Una vez atemperados se emplearon en los ensayos antes especificados.

3.3. Suspensiones de trabajo

A partir del criovial almacenado en congelación (-80°C) se sembraron mediante la técnica de agotamiento por estrías, placas de MRS agar (cepas del género *Lactobacillus*) y de Bifidobacterium agar (cepas del género *Bifidobacterium*). A continuación, se incubaron en cabina de anaerobiosis (Macs va500 microaerophilic workstation) durante 24-48h a 37°C (+- 1°C) en presencia de la siguiente composición de gases (90% N₂, 5% H₂ y 0,05% CO₂). A partir de una colonia aislada se prepararon los precultivos. Para ello, se sembraron frascos estériles que contenían 10 mL de medio de cultivo (MRS caldo para *Lactobacillus* y LSM para *Bifidobacterium*) y se incubaron durante 24h en condiciones antes indicadas. Una vez transcurrido ese tiempo y habiéndose llegado a la fase exponencial o estacionaria temprana, se determina la concentración del cultivo bacteriano mediante recuento en cámara de Thoma (BRAND GMBH + CO KG 717805) empleando para ello un microscopio Nikon eclipse 50i. Este recuento se realiza con el fin de inocular un volumen exacto tal que la concentración bacteriana inicial en el cultivo (botella con 50 mL medio de cultivo) sea 10⁶ufc/ml (Figuras 8 y 9). El volumen necesario que hay que inocular se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$V_1 \cdot []_1 = V_2 \cdot []_2$$

Donde V₁ es el volumen de la botella denominada “cultivo” (50 mL), []₁ es 10⁶ufc/ml, []₂ es la concentración del pre-cultivo (botella con 10 mL de medio de cultivo y que se calcula mediante recuento en cámara Thoma) y V₂ el volumen desconocido (a añadir a partir del pre-cultivo al cultivo).

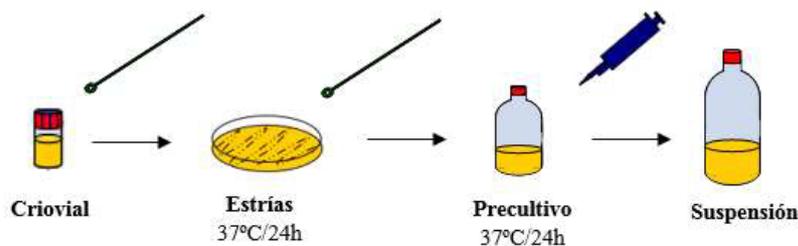
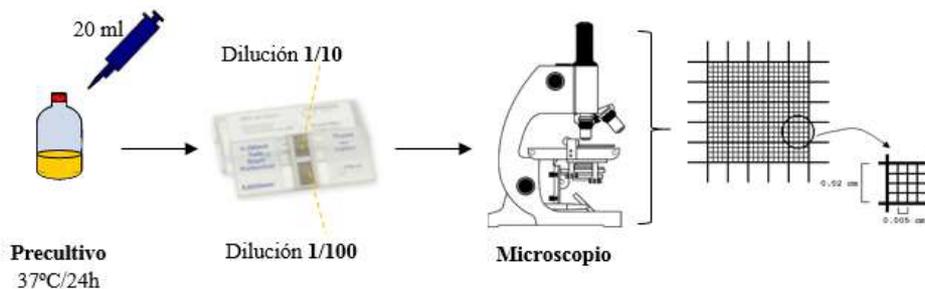


Figura 8 Metodología utilizada para la obtención de suspensiones en fase estacionaria.



$$[]_1 = \text{Media de recuentos en el cuadrante} \cdot (4 \cdot 10^6) \cdot \text{Factor dilución}$$

Figura 9 Metodología utilizada para el recuento en cámara de Thoma.

3.4. Curvas de crecimiento microbiano

Para elaborar las curvas de crecimiento se parte una solución de trabajo denominada “cultivo” y obtenida según las indicaciones recogidas en el apartado anterior.

Una vez inoculado el medio de cultivo (botella 50 mL), se tomaron muestras a intervalos de tiempo previamente establecidos (0, 2, 4, 6, 8, 14, 16, 18, 20, 24, 26, 28, 38, 48 horas). Concretamente, se tomaron 0,1 mL de muestra para la realización de las correspondientes diluciones seriadas en BPW (0,1%) y posterior recuento microbiológico y 2 mL para la medición de pH. Una vez realizadas las diluciones, las muestras se sembraron en superficie en placas de Petri que contenían los medios de cultivo indicados en anteriormente (apartado 3.2). A continuación, las placas se incubaron durante 24-48 horas a 37°C en la cabina de anaerobiosis y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL (UFC/mL) se cuantificó a partir de los recuentos obtenidos en cada placa correspondiente a cada dilución, de al menos dos diluciones seriadas consecutivas. Los resultados de las curvas de crecimiento se muestran representando el logaritmo del número de UFC/mL frente al tiempo de incubación en horas o días.

3.3.1 Medida de la densidad óptica (DO)

La medida de la densidad óptica se ha realizado tanto para monitorizar el crecimiento de los cultivos bacterianos como para construir las “rectas patrón” de los distintos microorganismos (ver apartado 5.2.)

La **densidad óptica** es una magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia para una longitud de onda. Un cultivo bacteriano actúa como una suspensión coloidal ya que absorbe o transmite la luz que pasa a través de él. Cuando las bacterias se multiplican en un medio líquido, éste se torna turbio, y esta turbidez se mide en el espectrofotómetro. La medida de la absorbancia de un cultivo a distintos tiempos monitoriza la curva de crecimiento de una población bacteriana en sus distintas fases, considerando que, dentro de ciertos límites, la dispersión de la luz es proporcional a la masa de cultivo.

Concretamente, la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Jasco V-530) empleando cubetas desechables (Brad; Cat No 7590 15). Como blanco se emplearon los medios de cultivos sin inocular y se consideró que la linealidad en la medida se mantenía hasta valores de absorbancia de 0.8-1.0. Alterativamente y para los ensayos de evaluación de la actividad prebiótica (apartado 3.6.), las mediciones se realizaron en placa microtiter (Mikrotestplatte 96 Well.F SARSTEDT) en un lector de placas ELISA (Multiskan Ascent. Thermo Labsystems)

3.3.2 Medida del pH

Las BAL y las Bifidobacterias, a medida que van creciendo, metabolizan los nutrientes presentes en el medio de cultivo a través de vías fermentativas dando lugar, entre otros compuestos, a metabolitos ácidos como el ácido láctico y/o el ácido acético. Como consecuencia de esta producción, el medio de cultivo se acidifica y se produce un descenso del pH.

Para medir el pH, se pipetea 2 mL de la muestra en un tubo de ensayo y se mide el valor directamente en el pH metro previamente calibrado (Crison GLP 21).

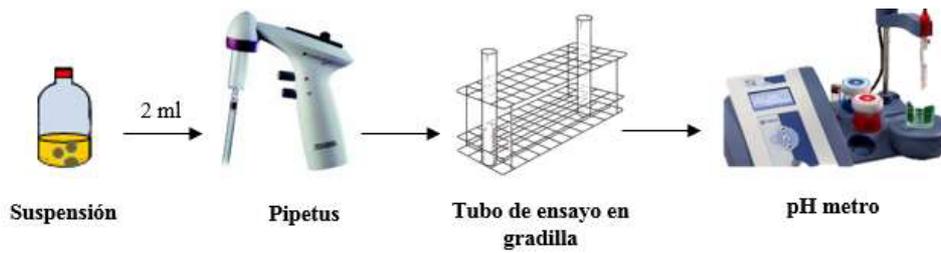


Figura 10 Metodología utilizada para la medida del pH

3.3.3 Recuento de colonias bacterianas en placa

El recuento de colonias bacterianas en placa es una de las técnicas microbiológicas más utilizadas para determinar el número de células viables en una muestra (Figura 11). Los pasos para la realización del recuento microbiológico son los siguientes:

1. Dilución de la muestra en una solución tamponada (BPW 0,1%) y a continuación, realización de diluciones decimales seriadas.
2. Siembra de la muestra en superficie. A no ser que se especifique lo contrario, se añaden 100 μ L de muestra por placa y se extienden con el asa de siembra (siembra en superficie).
3. Incubación de las placas de los medios de cultivo seleccionados en las condiciones indicadas en la Tabla 3.
4. Recuento de UFC. Elegir, de entre todas las placas, las correspondientes a aquella dilución o diluciones que presentan un número de UFC entre 30 y 300 en la superficie del agar.
5. Determinación del número de microorganismos viables presentes en la muestra original aplicando la fórmula: $n^{\circ} \text{ colonias en placa} * \text{Factor de dilución} * \text{volumen de muestra sembrado}$

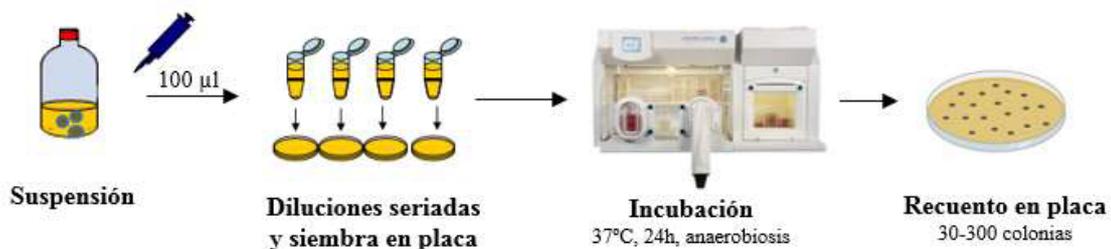


Figura 11 Metodología utilizada para el recuento en placa.

3.3.4 Modelo de Gompertz. Modelo matemático para ajustar las curvas de crecimiento y obtener parámetros cinéticos

Existen diversos modelos matemáticos que permiten predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales (factores). Algunos de los principales factores que afectan el crecimiento microbiano son la temperatura y el pH, por lo que deben tenerse en cuenta para lograr una determinada predicción. La aplicación de modelos matemáticos se realiza en dos etapas principales:

1. Modelado de la curva de crecimiento de un microorganismo
2. Descripción de la variación de los distintos parámetros que afectan a dicha curva

Los modelos matemáticos se clasifican en 3 niveles: Primario, secundario y terciario. El modelo utilizado en este proyecto, *Modelo de Gompertz*, se encuentra en el primero de ellos. Este nivel se caracteriza por describir cambios en el número de microorganismos en función del tiempo. El modelo de Gompertz presenta una ecuación que es muy útil en la industria alimentaria ya que logra predecir la duración y seguridad de los alimentos, así como determinar la estabilidad microbiana de nuevos productos alimenticios y ayudar en la evaluación de posibles riesgos para la salud. (Cardenas, Giannuzzi, Noia, & Zaritzky, 2017)

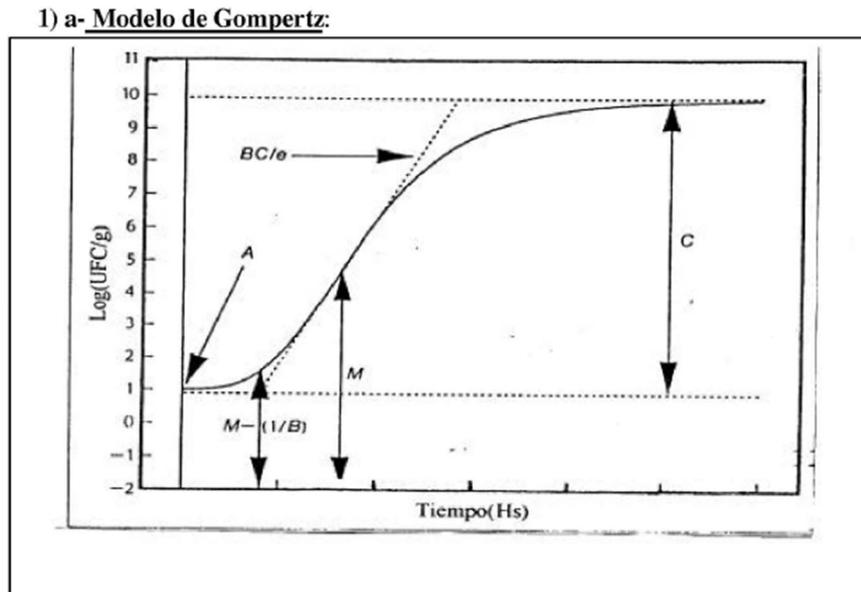


Figura 12 Parámetros correspondientes a la curva de crecimiento en el Modelo de Gompertz. (Cardenas, Giannuzzi, Noia, & Zaritzky, 2017)

La ecuación de Gompertz es una función doble exponencial basado en 4 parámetros que describen una curva sigmoidea asimétrica:

$$\text{Log } N = A + C \exp\{-\exp[-B(t-M)]\}$$

Donde:

- **Log N:** logaritmo decimal de los recuentos microbianos [log UFC/ml] al tiempo t(h).
- **A:** logaritmo de los recuentos cuando el tiempo decrece indefinidamente. Aproximadamente equivale al logaritmo del recuento inicial de bacterias (log UFC/mL)
- **C:** logaritmo de los recuentos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos logaritmo de crecimiento). Es la diferencia entre el valor más alto y más bajo de la asíntota.
- **M:** tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento.
- **B:** velocidad de crecimiento máxima relativa al tiempo M.

De estos parámetros se deriva la velocidad específica de crecimiento ($\mu = B.C/e$), la duración de la fase de latencia [$LPD = (M-1)/B$] y la máxima densidad de población ($MPD = A+C$).

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento de los distintos microorganismos evaluados en el proyecto se empleó el complemento de Excel denominado Solver para realizar la modelización de dichas curvas y obtener los parámetros propios de la ecuación de Gompertz (ver apartado 5.1.). Se consideró que un ajuste perfecto al modelo se obtenía cuando el valor del coeficiente de correlación (R^2) estaba próximo a 1, mientras que para el caso del error cuadrático medio (RMSE) el valor debía estar próximo a 0.

3.5. Extractos vegetales

3.5.1 Caracterización nutricional de los extractos vegetales²

La capacidad antioxidante total *in vitro* se determinó mediante espectrofotometría. La técnica cuantifica la pérdida de coloración violeta del radical DPPH+ cuando este entra en contacto con una sustancia oxidante (reacción redox). Como patrón para la calibración externa se utiliza Trolox (análogo de vitamina E). De forma complementaria y para algunos extractos, se cuantificaron los compuestos fenólicos libres y combinados mediante espectrofotometría UV-VIS a través de una reacción colorimétrica con el reactivo Folin-Ciocalteu (750 nm).

La FD ha sido cuantificada empleando los métodos oficiales de la AOAC (Association Of Analytical communities).

Tabla 4 Caracterización funcional de los extractos vegetales/ingredientes del proyecto

Empresa ³	Extracto	Características relevantes
Empresa 1	E 1.1	Rico en fibra
	E 1.2	
	E 1.3	
	E 1.4	
	E 1.5	
Empresa 2	E 2.1	Alta capacidad antioxidante
	E 2.2	
	E 2.3	
	E 2.4	
Empresa 3	E 3.1	Alto contenido de polifenoles
	E 3.2	
	E 3.3	
	E 3.4	

3.5.2 Digestión *in vitro* de los extractos vegetales

El procedimiento de digestión *in vitro* está basado en el artículo “INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion” (Brodkorb et al., 2019) y se resume en la figura 13. Se divide en 3 etapas: 1) Preparación de la muestra (pesada del extracto/ingrediente y dosificación

² Esta caracterización se ha realizado por el personal de CNTA dentro del marco del proyecto BIOTAGUT de forma independiente al desarrollo de este TFG. Sin embargo, se ha considerado relevante incluir un breve resumen de estos resultados porque contribuye a entender porque estos extractos/ingredientes podrían actuar como potenciales moduladores de la microbiota intestinal.

³ Los nombres de las empresas y de los extractos aparecen codificados porque se trata de datos confidenciales propiedad de las empresas.

en el alimento funcional); 2) Digestión, que consta a su vez de 3 fases (oral, gástrica e intestinal) y; 3) Tratamiento de muestra.

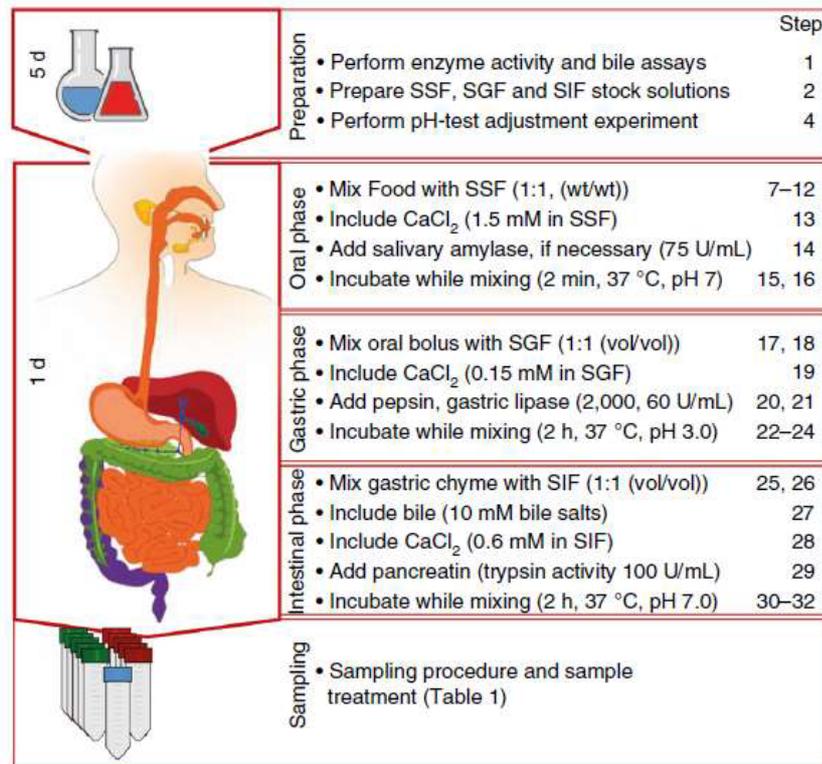


Figura 13 Esquema del procedimiento de digestión in vitro.

Para la preparación de la digestión *in vitro*, es necesario determinar previa y experimentalmente la actividad de todas las enzimas digestivas y las concentraciones de sales biliares, utilizando los ensayos estandarizados recomendados para tal efecto.

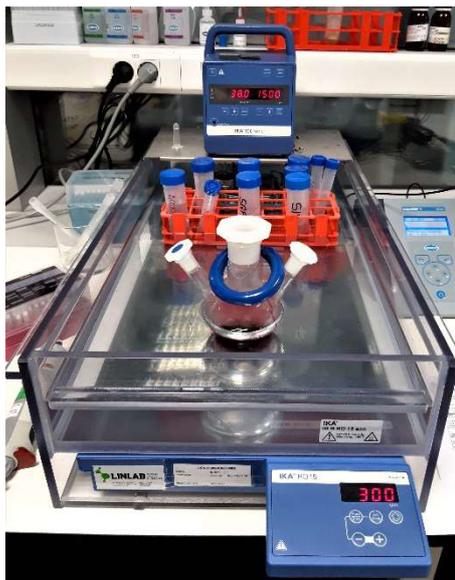


Ilustración 1 Digestión *in vitro* de té de guaraná (Fase Gástrica)

En esta figura se muestra el equipo para realizar digestión “*in vitro*”. Concretamente, el equipamiento es: baño termostático (37°C en este caso), pH metro y matraz esférico esmerilado de fondo plano de 3 bocas. El extracto se prepara en función del método de consumo habitual (tipo de tratamiento térmico, precocinado, etc.) y de la dosis en la que está presente en la formulación del alimento (Ej: 10 g/L) para poder añadirlo al matraz de digestión de forma que se asemeje lo máximo posible a la realidad. Por una de las entradas del matraz se introduce la sonda de temperatura y por la otra, la sonda de pH para medir de manera continua el pH y poder ajustarlo en función de la etapa de digestión en la que nos encontremos.

Tabla 5 Características principales de las fases de digestión oral, gástrica e intestinal.

FASE	Oral	Gástrica	Intestinal
Duración	2 min	120 min	120 min
Enzimas	<i>α amilasa</i>	<i>Pepsina y lipasa gástrica</i>	<i>Enzimas pancreáticas</i>
Búfer	Fluido salival simulado (SSF)	Fluido gástrico simulado (SGF)	Fluido intestinal simulado (SIF)
pH	7	3	7
Procedimiento	Dilución del alimento 1:1 (p/p) con SSF, sin enzima (ya que no hay almidón como sustrato en los extractos vegetales empleados/ingredientes), masticación simulada del alimento mediante agitación magnética.	Dilución del bolo oral 1:1 (v/v) con SGF y pepsina (Sin lipasa gástrica, ya que no hay triglicéridos en los extractos vegetales/ingredientes empleados). Se incuba bajo agitación magnética durante 2h.	Dilución del quimo gástrico 1:1 (v/v) con SIF, sales biliares y pancreatina. Se incuba bajo agitación magnética durante 2h.

El último paso del procedimiento involucra el tratamiento de la muestra, almacenamiento y posterior análisis. En este caso, los extractos digeridos son sometidos a un proceso de liofilización. Los digeridos se liofilizan con el fin de obtener una muestra homogénea, manejable a la hora de preparar soluciones, y de mantenerlos intactos con el paso del tiempo (Esto se debe a que los liofilos se guardan en congelación a -80°C).

3.6. Puesta a punto de la metodología de evaluación de aptitud prebiótica

3.6.1. Preparación de las suspensiones bacterianas

La metodología desarrollada se detalla a continuación (Figura 14). En primer lugar, a partir de un cultivo puro de cada una de estas cepas (colonias aisladas en estrías) se prepararon los correspondientes pre-cultivos (ver apartado 3.3.).

Pasado el tiempo de incubación (24 horas, 37°C en anaerobiosis), el cultivo se centrifugó (Centrífuga SORVALL ST 40R Thermo Scientific) y el pellet bacteriano se lavó con medio de cultivo PYF sin fuente de carbono para eliminar los restos de medio de cultivo rico en fuente de carbono y otros nutrientes (procedentes del pre-cultivo). Esta operación se repitió en dos ocasiones.

A continuación, el pellet se resuspendió en un determinado volumen de medio PYF sin fuente de carbono y se determinó su concentración (UFC/mL) mediante recuento en cámara de Thoma para poder preparar las correspondientes suspensiones bacterianas (20 mL) a una concentración de 10^5 ufc/mL.

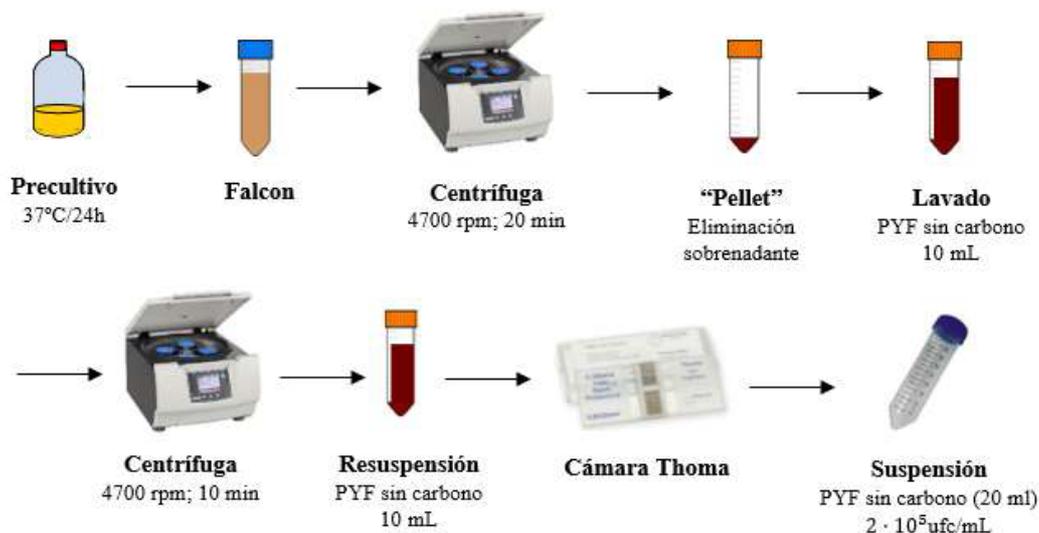


Figura 14 Metodología utilizada para preparar las suspensiones bacterianas utilizadas en el ensayo de cuantificación de aptitud prebiótica

3.6.2. Rectas de calibrado

La mayoría de los métodos analíticos contemplan una etapa de calibración en la que se relaciona la respuesta instrumental (absorbancia en el caso de este estudio) con la propiedad que se está buscando, recuento microbiano en este caso concreto, mediante un modelo de línea recta. Este modelo consiste en encontrar la recta de calibrado que mejor se ajuste a una serie de n puntos experimentales, donde cada punto se encuentra definido por una variable x (concentración del analito de interés) y una variable y (respuesta instrumental: absorbancia). La recta de calibrado está definida por una coordenada en el origen (n) y una pendiente (m), a través de la ecuación:

$$y = mx + n$$

La validación de un modelo es tan importante como su establecimiento. De acuerdo con eso, se confirmará que el modelo es adecuado para la finalidad mediante la comprobación del coeficiente de determinación r^2 . En este estudio se consideraron como válidos los valores comprendidos entre **0,90** y **0,99**. El procedimiento seguido para realizar las rectas de calibrado de los microorganismos de interés es el siguiente (Figura 15):

Se sembraron mediante estrías por agotamiento cada una de las bacterias y se incubaron en anaerobiosis durante 24 horas a 37°C. A partir de una colonia aislada, se prepararon los pre-cultivos. Se incubaron en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas a 37°C y una vez crecidos se realizaron las suspensiones bacterianas en el medio **PYF con fuente de carbono**. Se incubaron las suspensiones en las mismas condiciones, y una vez que crecieron se centrifugaron a 4700 rpm durante 10 minutos para obtener el pellet. Se re suspendió el pellet en el medio limitante **PYF sin fuente de carbono**, se prepararon las soluciones a las concentraciones [1/2, 1/3, 1/5, 1/6, 1/10, 1/25, 1/50, 1/70 y 1/100] y se midió la absorbancia a 620 nm. Estos datos se representaron en una gráfica de dispersión y se obtuvo la ecuación de la recta que será nuestra recta de calibrado.

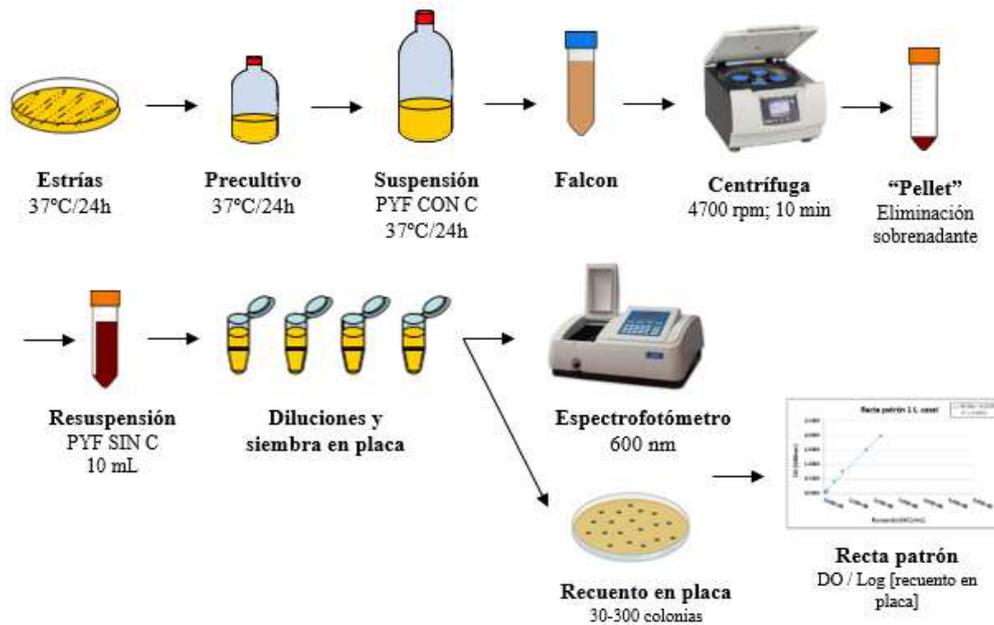


Figura 15 Metodología utilizada para las rectas de calibración

3.6.3. Preparación de las soluciones inulina GR Beneo

Durante la puesta a punto del método, las soluciones de inulina evaluadas fueron: 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14% (p/v). Finalmente, una vez optimizado el procedimiento y como control interno en cada tanda de análisis, se incluyó únicamente la solución de inulina al 14% p/v

Todas las soluciones de inulina se prepararon concentradas 2X (ej. 6%, 8%, etc. respectivamente) en medio PYF sin fuente de carbono y se filtraron por filtro de 0,22 micras para esterilizarlas. En aquellos casos en los que fue necesario (soluciones más concentradas), estas fueron previamente filtradas a través de un filtro de 0,45 micras para evitar la colmatación de los filtros.

3.6.4. Evaluación de la actividad prebiótica (puesta a punto)

Una vez obtenidas las suspensiones bacterianas (ver apartado 3.6.1.) y las soluciones de inulina (ver apartado 3.6.3.) se procedió a evaluar propiamente la actividad prebiótica. Para ello, en primer lugar, a cada pocillo de la placa microtiter se añadieron 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada a $2 \cdot 10^5$ ufc/mL y 100 μ L de la solución de inulina del % p/v. A continuación, la placa se incubó a 37°C en anaerobiosis y se midió la absorbancia a 600 nm a las 24, 48 y 72 horas de incubación en un lector de placas ELISA.

Varios ensayos tuvieron que repetirse ya que los resultados obtenidos no fueron los esperados. Esto resultó debido a pequeñas modificaciones en la preparación de las soluciones de inulina y a contaminaciones producidas que impidieron continuar con algunos de los ensayos. Se realizaron varias repeticiones en días diferentes para comprobar el posible error producido por la manipulación del técnico, el estado de la inulina o el material teóricamente estéril, posibles contaminaciones ambientales, etc.

Para combatir estas contaminaciones y asegurar una completa esterilidad ambiental, los últimos ensayos se realizaron en la cabina de seguridad biológica, tal y como se muestra en la Ilustración 2. Por otro lado, para combatir los problemas identificados con la preparación de las soluciones

de inulina, éstas fueron preparadas de manera idéntica en los últimos ensayos: Pesado de inulina, adición de los 20mL de PYF sin fuente de carbono, vortexado y filtrado inmediato de cada una.

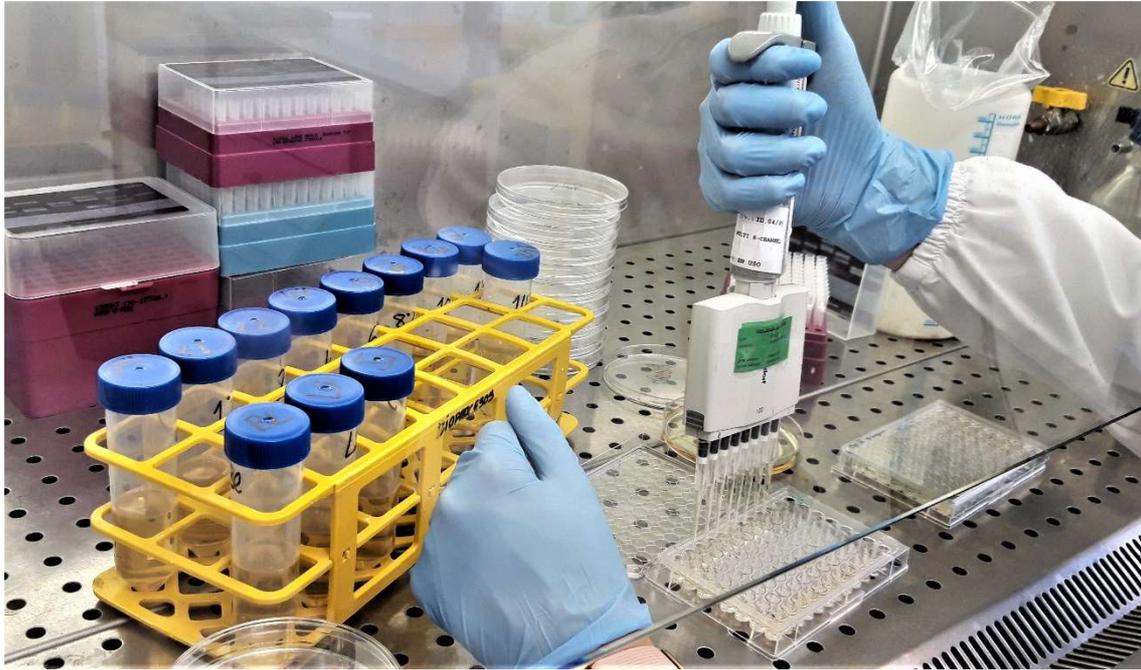


Ilustración 2 Preparación de la placa microtiter con las soluciones de inulina y las suspensiones bacterianas empleando la pipeta multicanal

La siguiente figura muestra la cabina de seguridad biológica en uno de los ensayos realizados. Las soluciones de Inulina se vortexan y homogenizan antes de ser añadidas a los pocillos de la placa microtiter y se utiliza la pipeta multicanal para agilizar el trabajo. Es necesaria una concentración absoluta, ya que cualquier pequeño movimiento descuidado de la pipeta puede derivar en contaminaciones cruzadas entre pocillos y dar resultados erróneos de DO.

3.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para comprobar las posibles diferencias significativas que existen entre el efecto prebiótico que presenta la concentración del 14% de inulina frente al control (0% de inulina). Para ello, se empleó el complemento de Excel denominado Análisis de datos.

Se estableció la existencia de diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95%, siendo el nivel de significación $\alpha=0,05$. Un valor inferior al nivel de significación determinó la presencia de diferencias significativas, mientras que uno superior indicó la ausencia de las mismas. Cuanto menor fue el valor de probabilidad (p-valor), mayores diferencias significativas hubo y por lo tanto, mayor efecto prebiótico presentó la inulina frente a la bacteria estudiada.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental realizado en el laboratorio permitió determinar los siguientes objetivos:

- Poner a punto un método para evaluar la aptitud prebiótica de ingredientes alimentarios *in vitro*.
- Determinar los parámetros cinéticos de las bacterias en estudio

Las bacterias del GIT son organismos independientes, por lo tanto, presentan comportamiento diferente. Es posible que un extracto vegetal promueva el crecimiento de alguna bacteria, pero no de otra y viceversa. Para establecer la metodología adecuada (temperatura y tiempo de incubación, medio de cultivo, dosis de extracto, etc.), se empleó como control positivo la inulina Orafiti-GR, procedente de achicoria y reconocida por la EFSA (European Food Safety Authority) como molécula con actividad prebiótica. Como la EFSA no especifica qué porcentaje específico de inulina promueve el crecimiento de las bacterias del tracto gastrointestinal, se probaron distintas concentraciones de ésta (p/v); 0%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% y 14%; con las bacterias seleccionadas para el estudio y se escogieron las más adecuadas para el ensayo. Esta puesta a punto fue basada en el artículo “*Evaluation of Prebiotic Effects of High-Purity Galactooligosaccharides in vitro and in vivo*” (Ki Bae et al., 2016).

Para la puesta a punto del método se realizó el siguiente diseño experimental (Figura 16):

- › 6 bacterias seleccionadas: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. gasseri*, *B. breve* y *B. longum*
- › 14 ensayos
- › Mismo número de réplicas por cada bacteria
- › 10 concentraciones diferentes de solución de inulina para cada bacteria

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solución inulina	0%	0,5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	
Medio	Medio										
Medio	<i>L. casei</i>	Medio									
Medio	0%	0,5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	
Medio	<i>L. casei</i>	Medio									
Medio	0%	0,5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	
Medio	<i>L. casei</i>	Medio									
Medio	0%	0,5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	
Medio	<i>L.gasseri</i>	Medio									
Medio	0%	0,5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	
Medio	<i>L.gasseri</i>	Medio									
Medio	0%	0,5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	
Medio	<i>L.gasseri</i>	Medio									
Medio	0%	0,5%	1%	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	
Medio	Medio										

Figura 16 Esquema de un ensayo de la evaluación de aptitud prebiótica de la Inulina GR Beneo en distintas concentraciones sobre el crecimiento de *L. casei* y *L. gasseri*.

La placa microtiter cuenta con 96 pocillos. En los pocillos más externos de la placa se adiciona medio de cultivo (PYF sin fuente de C), que servirá como blanco para la lectura de la DO (filas A y H, columnas 1 y 12). Además, hay que tener en cuenta que estos pocillos son más sensibles a la desecación al estar situados en la parte más exterior de la placa y que, al colocar en esta posición únicamente medio de cultivo, evitamos que sea una muestra problema la que sufra este inconveniente.

A continuación, la placa se divide por la mitad y en las primeras tres primeras filas (filas B-D) se inocula una bacteria y en las tres siguientes otra distinta (filas E-G).

La columna n° 2 se corresponde con el control de crecimiento de cada una de las bacterias puesto que no se adiciona inulina, la DO observada en esta columna a los distintos tiempos deberá coincidir con los valores de DO y recuento obtenidos en las correspondientes rectas patrón. En los pocillos de la columna n°3 se añade la concentración de inulina más baja a evaluar (0,5%), mientras que la concentración más alta (14%) se adiciona en los pocillos de la columna n°11. En las columnas intermedias, se agregan las concentraciones intermedias de inulina. Los resultados de DO que se obtengan en las columnas n°2-n°11 nos permitirán evaluar el efecto que tiene la inulina sobre el crecimiento de las bacterias del GIT seleccionadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de la cinética de crecimiento de *Bifidobacterium breve* y *longum* y de *Lactobacillus acidophilus*, *reuteri*, *gasseri* y *casei*.

En primer lugar, se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes a las bacterias *B. breve*, *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. gasseri* y *L. casei* monitorizando el recuento microbiano y la variación de pH a lo largo del tiempo.

Las curvas de crecimiento microbiano se realizaron, en primer lugar, para poder determinar los parámetros cinéticos de cada bacteria a través de la ecuación de Mafart et al., 2004 que simplifica el modelo matemático de Gompertz y, en segundo lugar, para poder comparar éstas con las curvas de crecimiento microbiano en presencia de inulina (sustrato prebiótico). A continuación, se muestran los gráficos correspondientes a las curvas de crecimiento obtenidos experimentalmente en el laboratorio y su ajuste al modelo teórico de la ecuación de Gompertz (Gráficos 1 – 6). Las curvas de crecimiento microbiano en las que se muestra el crecimiento microbiano vs la variación de pH están recogidas en el Anexo 3.

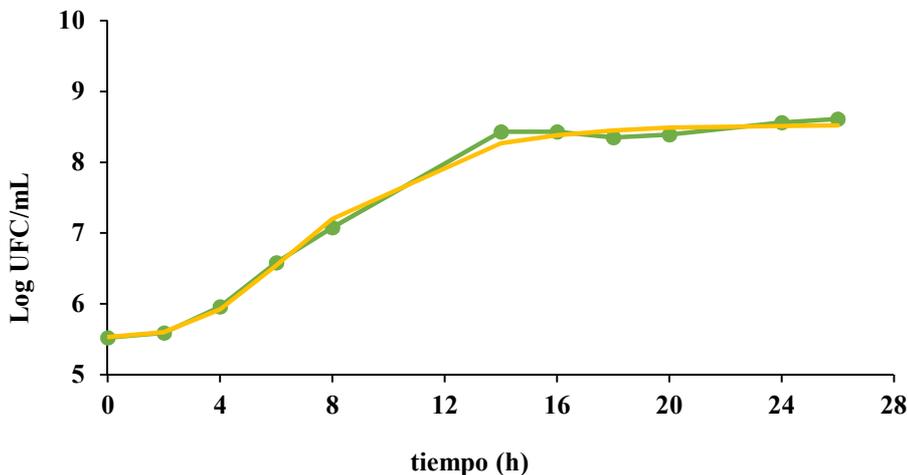


Gráfico 1 Curva de crecimiento de *L. acidophilus* CECT 903(• Reales; - Estimados)

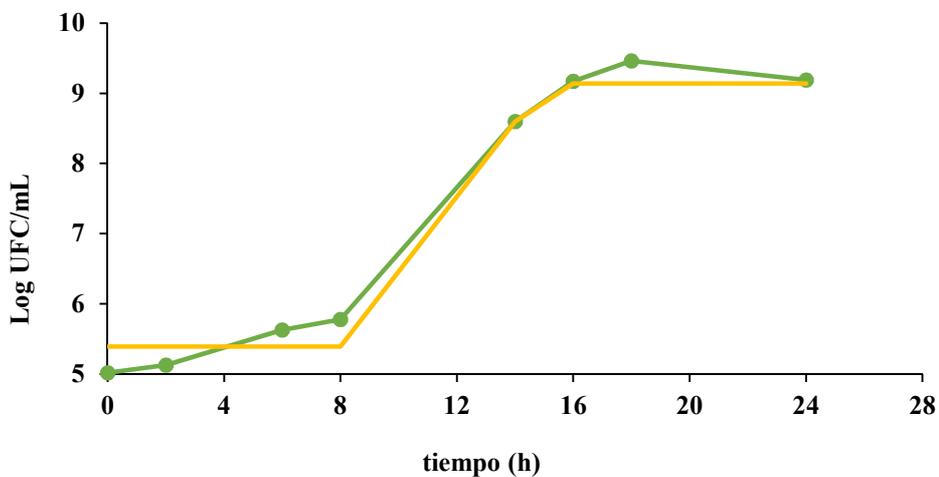


Gráfico 2 Curva de crecimiento de *L. casei* CECT 475(• Reales; - Estimados)

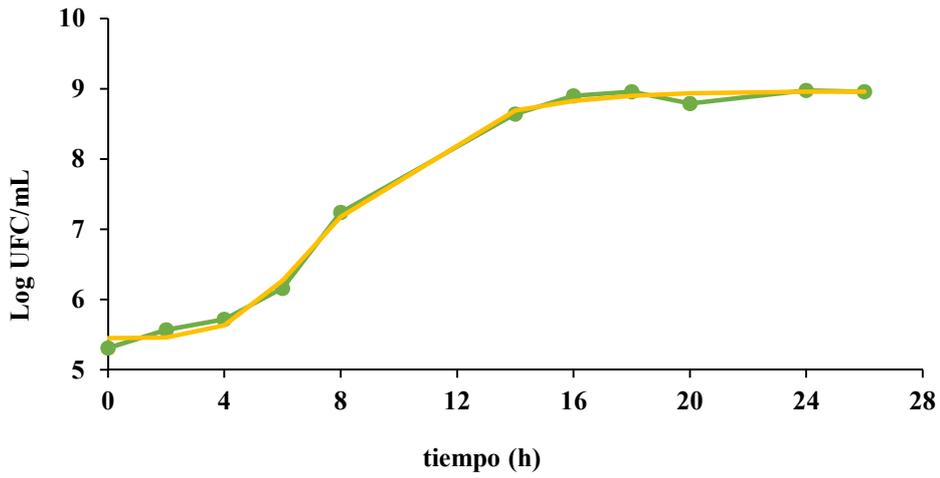


Gráfico 3 Curva de crecimiento de *L. gasseri* CECT 4479 (• Reales; - Estimados)

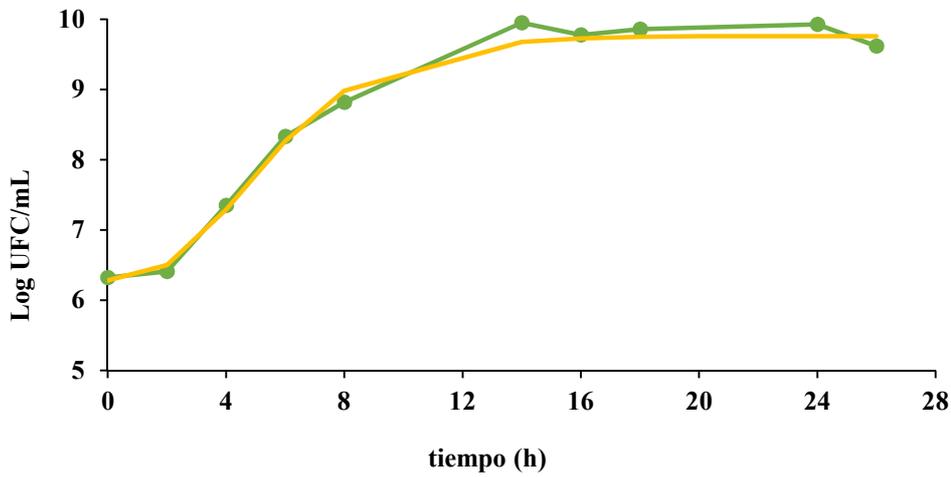


Gráfico 4 Curva de crecimiento de *L. reuteri* CECT 925 (• Reales; - Estimados)

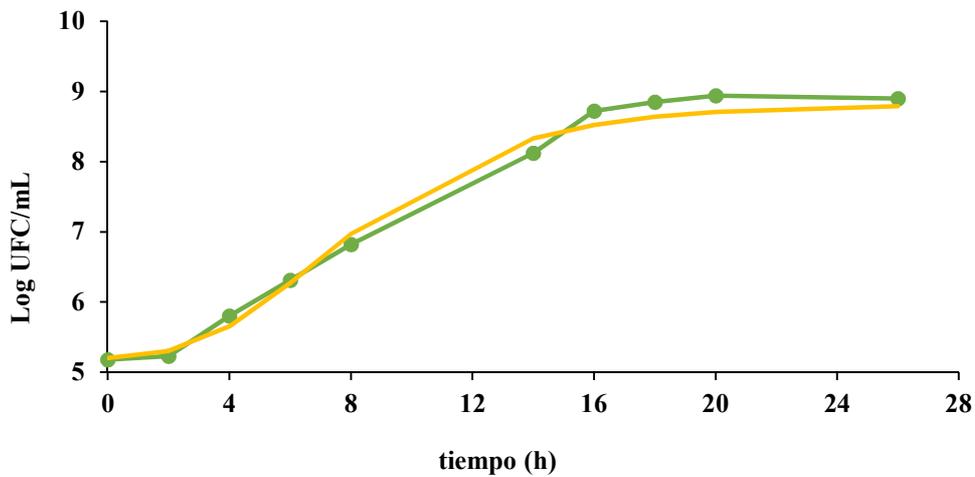


Gráfico 5 Curva de crecimiento de *B. breve* CECT 4839 (• Reales; - Estimados)

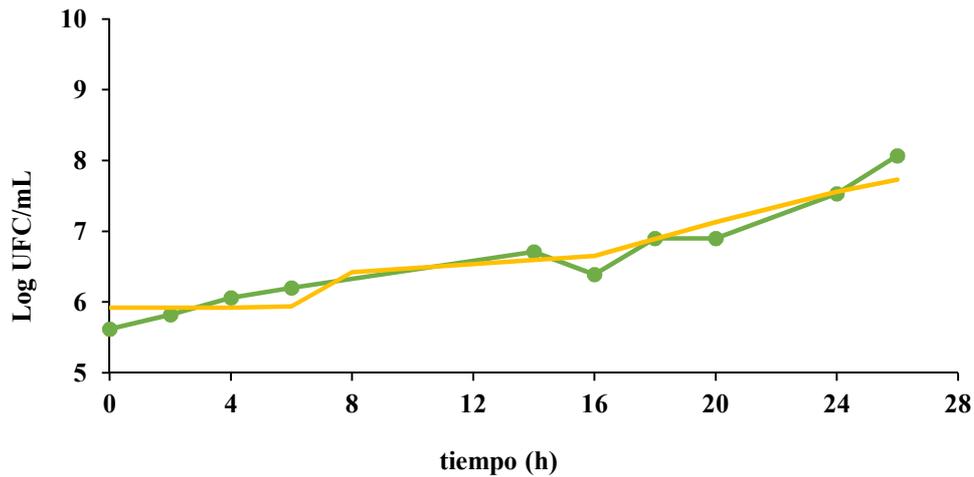


Gráfico 6 Curva de crecimiento de *B. longum* LMG 13197 (• Reales; - Estimados)

Como se puede observar en los gráficos anteriores, la predicción del modelo matemático fue buena para casi todas las especies del género *Lactobacillus* (excepto para *L. casei*), sobre todo para *L. gasseri*, puesto que la línea continua (que representa la ecuación matemática) se corresponde con los datos experimentales (reales) obtenidos en el laboratorio por recuento en placa. Sin embargo, la predicción fue mala para las dos especies del género *Bifidobacterium* y *L. casei*, ya que la línea del modelo se aleja de los datos reales.

Con el fin de cuantificar la precisión del ajuste del modelo, la siguiente tabla (Tabla 6) recoge los valores de los parámetros cinéticos A, B, C y M junto con los coeficientes de correlación R² y RMSE que se han utilizado para valorar la bondad del ajuste.

Tabla 6 Parámetros cinéticos (y coeficientes estadísticos) del modelo de Gompertz para cada una de las bacterias estudiadas

Bacteria	A (Log UFC/mL)	B (h ⁻¹)	C (Log UFC/mL)	M (horas)	R ²	RMSE
<i>L. acidophilus</i>	5.54	0.31	3.00	6.28	0.995	0.084
<i>L. casei</i>	5.39	5.14	3.76	13.64	0.978	0.274
<i>L. gasseri</i>	5.45	0.36	3.51	7.05	0.997	0.087
<i>L. reuteri</i>	6.27	0.40	3.49	4.53	0.984	0.172
<i>B. breve</i>	5.20	0.27	3.61	6.73	0.980	0.209
<i>B. longum</i>	5.92	0.13	2.54	17.67	0.950	0.205

La tabla muestra que los ajustes son buenos para el género *Lactobacillus* puesto que se obtienen valores de R² superiores a 0.97 y los valores de RMSE son inferiores a 0.250. Sin embargo, no lo son para el género *Bifidobacterium* ya que los valores de R² son inferiores a 0.97 y los valores de RMSE son superiores a 0.250 (en caso de *B. breve*).

De acuerdo con la interpretación de cada uno de los parámetros cinéticos que fueron explicados en el apartado 3.3.4, los **recuentos iniciales (A)** se puede observar que fueron muy similares para todos los microorganismos (presentando *B. longum* un valor algo mayor). Esto significa que se ha conseguido inocular las suspensiones bacterianas en la concentración deseada y propuesta (10⁶ UFC/mL).

En el caso de la **velocidad máxima de crecimiento de las bacterias (B)**, se puede observar que *L. casei* fue la más rápida (5.14). Sin embargo, *B. longum* fue la más lenta (0.13). Sin tener en cuenta estas dos bacterias que representan los extremos de velocidades, el resto de las bacterias crecen a una velocidad muy similar. La velocidad de crecimiento suele ser característica de cada especie microbiana y, en ocasiones, el género al que pertenecen tiene similares velocidades.

En el caso del **recuento máximo (C)**, se observa que *L. casei* es la bacteria que más crece (3.76) con respecto a las demás. Por el contrario, la bacteria que menos crece es *B. longum* (con un valor de 2.54). El resto de las bacterias, exceptuando *L. acidophilus*, que crece menos, presentan un crecimiento similar, con valores de aproximadamente 3.4.

Con respecto al **tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (M)**, la bacteria que más rápido se adapta al medio y las condiciones de cultivo es *L. acidophilus*, ya que sólo necesita 6 horas. Por el contrario, la que necesita más tiempo de adaptación es *B. longum*, que necesita casi 18 horas, seguida de *L. casei* que necesita casi 14. El resto de las bacterias se adaptan aproximadamente en unas 7 horas.

5.2. Rectas patrón

En los ensayos de evaluación de la actividad prebiótica, la concentración de población bacteriana (UFC/mL) en los pocillos de la placa microtiter es desconocida, ya que en este ensayo únicamente se mide DO. Hemos decidido emplear esta estrategia porque sería un trabajo muy costoso (tiempo y material de laboratorio) el efectuar recuentos microbiológicos (ver apartado 3.3.3) para cada uno de los 96 pocillos de la placa microtiter. Además, no sólo se ahorra trabajo al técnico, sino que se optimiza de una manera muy significativa el número de condiciones (% inulina y nº de bacterias) que se pueden analizar en un único ensayo.

Por todo ello, fue necesario previamente obtener las rectas patrón para cada una de las bacterias del GIT seleccionadas. De este modo se obtuvieron unas gráficas que correlacionaban el recuento microbiológico (UFC/mL) con la DO y que nos permitían posteriormente en los ensayos de evaluación prebiótica *in vitro* conocer el valor de UFC/mL en el pocillo midiendo únicamente la DO en un lector de placas de ELISA. Esta maniobra apenas requiere unos minutos de trabajo.

A continuación, se muestran los gráficos correspondientes a las rectas patrón de las bacterias estudiadas (Gráficos 7-11).

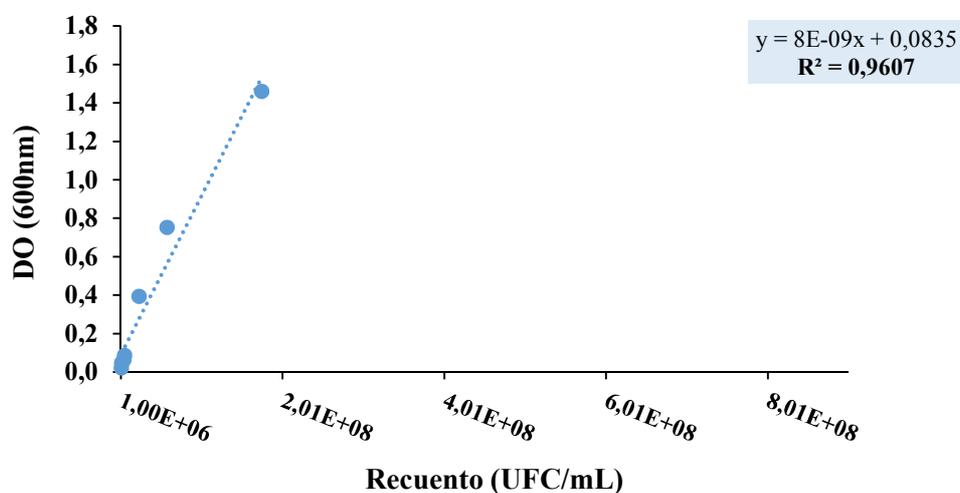


Gráfico 7 Recta patrón de *Lactobacillus acidophilus* CECT 903

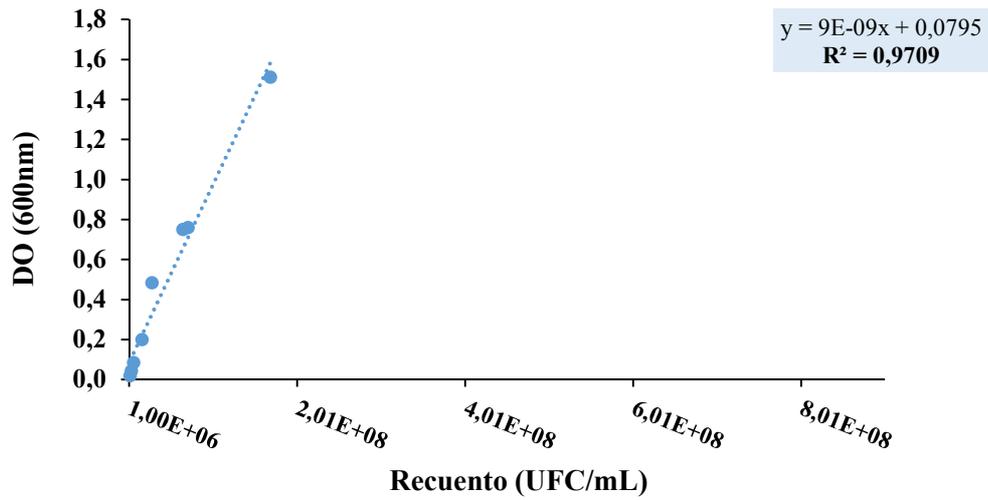


Gráfico 8 Recta patrón de *L. casei* CECT 475

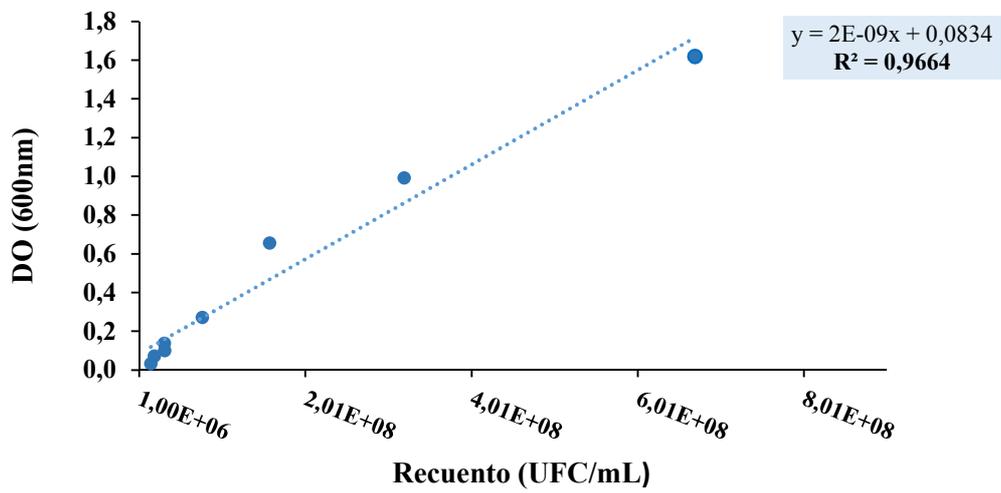


Gráfico 9 Recta patrón de *L. reuteri* CECT 925

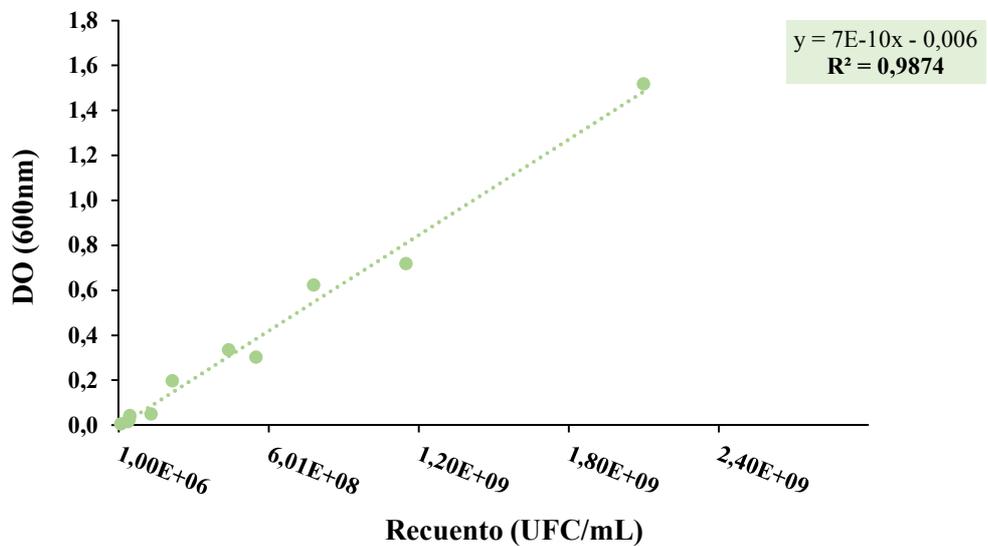


Gráfico 10 Recta patrón de *Bifidobacterium breve* CECT 4839

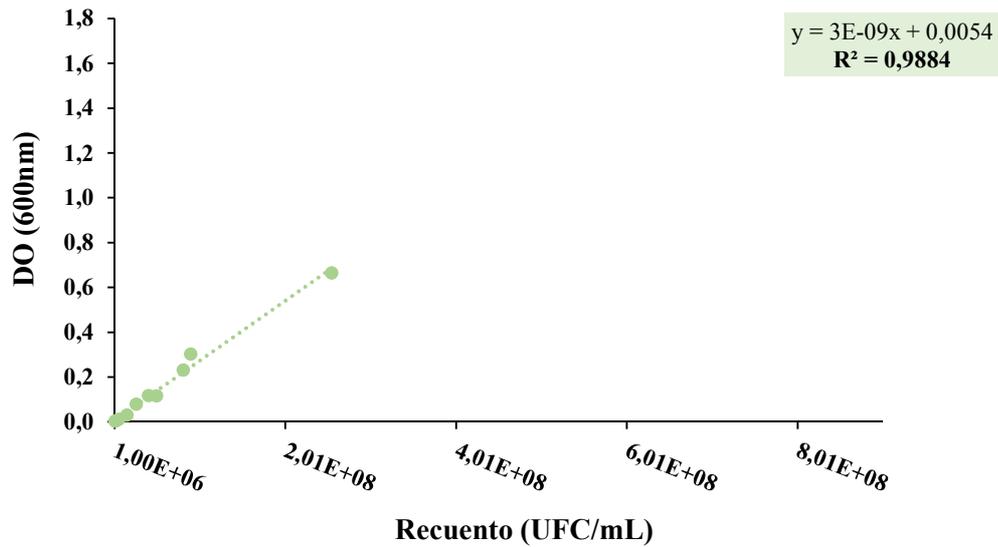


Gráfico 11 Recta patrón de *Bifidobacterium longum* LMG 13197

Como se ha comentado anteriormente en el apartado 3.6.2, en el estudio sólo se consideraron como válidas aquellas rectas patrón que tuvieran un valor de R^2 comprendido entre 0,90 y 0,99. Como se puede observar en las gráficas anteriores (Gráficos 7-11), el valor de R^2 de todas ellas se sitúa dentro del rango de valores permitidos a excepción del correspondiente a *L. gasseri* cuyo valor de R^2 fue inferior a 0,90 y, por lo tanto, se repetirá nuevamente para conseguir un valor que se sitúe dentro del intervalo admitido (0,9-0,99).

5.3. Puesta a punto de la metodología para la cuantificación de aptitud prebiótica

Siguiendo el esquema presentado en el apartado “Diseño experimental” se determinó el potencial prebiótico de una serie de soluciones de inulina de concentración creciente frente a 6 bacterias representantes de la microbiota del GIT. Para ello se monitorizó el crecimiento de estas bacterias en presencia de inulina mediante medición de DO a 620 nm en un total de 6 ensayos independientes. Las siguientes Figuras (Figura 12-18) muestran los resultados para cada una de las bacterias y concentraciones de inulina analizadas. Los datos se recogen en una gráfica que representa la DO en el eje de las ordenadas (y) y, el tiempo en el eje de las abscisas (x). Para cada tiempo analizado, se presenta el valor medio y la desviación estándar correspondiente a todos los ensayos realizados.

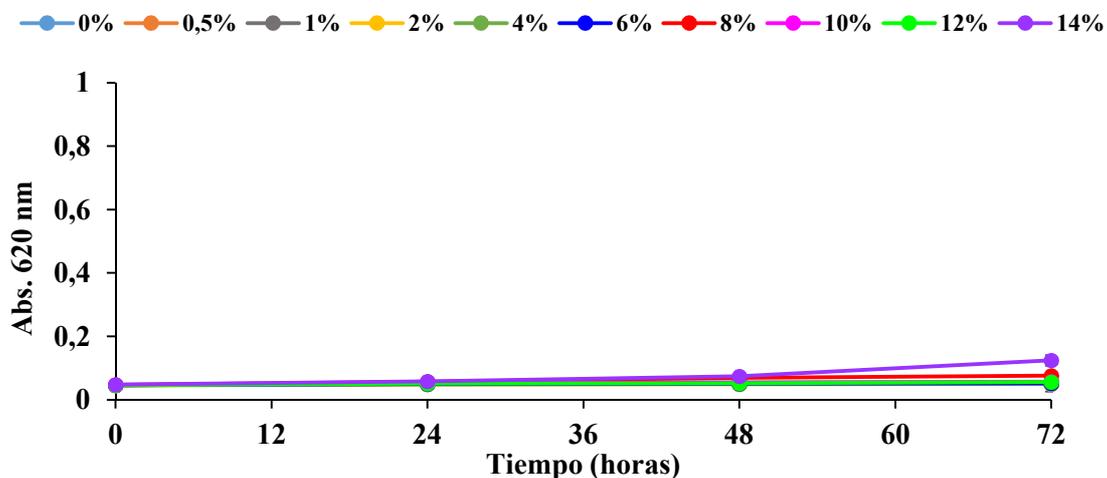


Gráfico 12 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de *L. acidophilus*

Como se puede observar en el gráfico, ninguna de las concentraciones estudiadas de Inulina GR de Beneo muestra efecto prebiótico en la estimulación del crecimiento de *L. acidophilus* tras 48 horas de incubación. Sólo la concentración del 14% (p/v) parece tener un ligero efecto sobre el crecimiento de esta bacteria a las 72 horas de incubación.

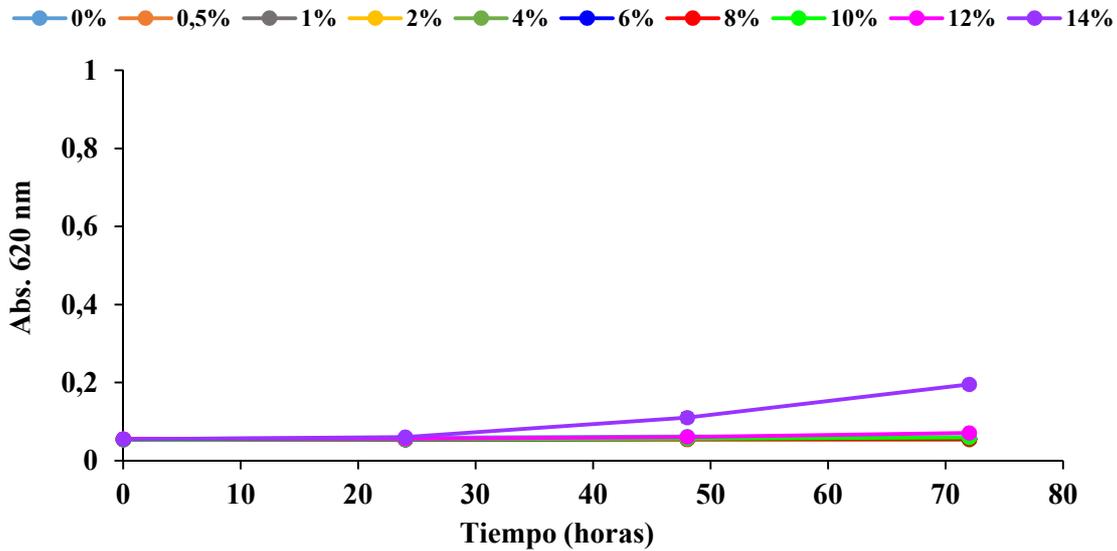


Gráfico 13 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de *L. casei*

Como se puede observar en el gráfico, la única concentración de Inulina GR de Beneo que parece tener un ligero efecto prebiótico sobre el crecimiento de *L. casei* es la máxima concentración estudiada (14%) (p/v). Este efecto comienza a ser visible a las 48 horas de incubación y va incrementándose con el tiempo hasta las 72 horas de incubación.

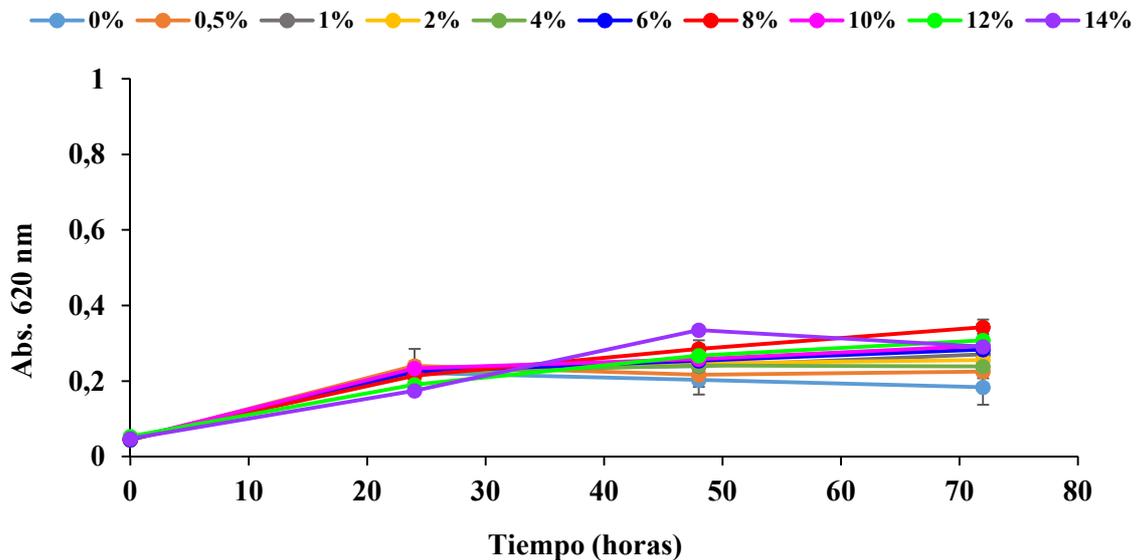


Gráfico 14 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de *L. gasseri*

L. gasseri muestra un ligero crecimiento en todas las situaciones ensayadas, incluso en el medio sin fuente de carbono (0% de inulina). Esto significa que hay un componente en dicho medio (que no es carbono) que el microorganismo está utilizando para crecer. A partir de las 48 horas de incubación, se observa un ligero crecimiento respecto al control (0% de inulina) en orden creciente de concentración. Es decir, mayor es el crecimiento bacteriano cuanto mayor es la

concentración de inulina añadida al medio. Dicho efecto puede apreciarse en el gráfico siguiente (Gráfico 15) en el que se muestra el efecto de la solución del 14% frente al control (0% inulina):

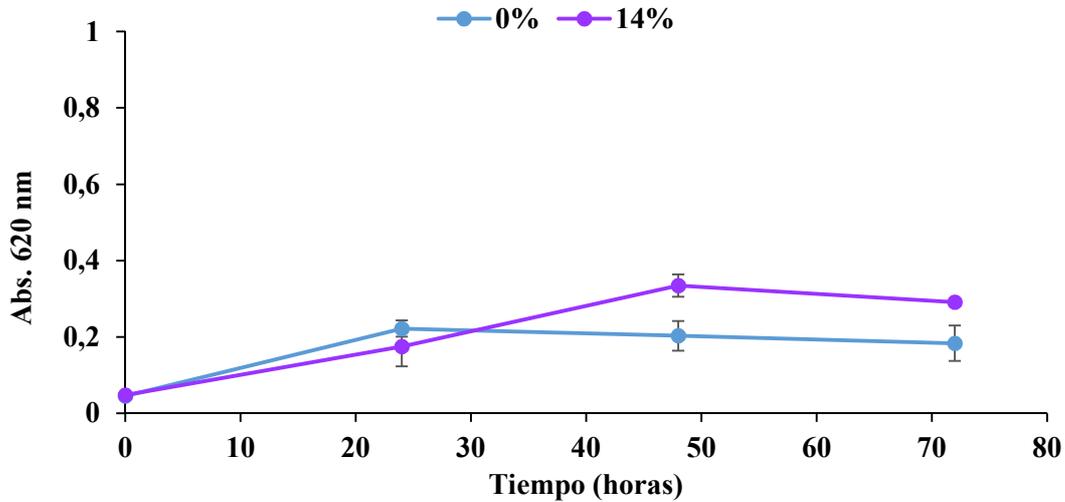


Gráfico 15 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo (14%) sobre el crecimiento de *L. gasseri* frente al control (0% inulina)

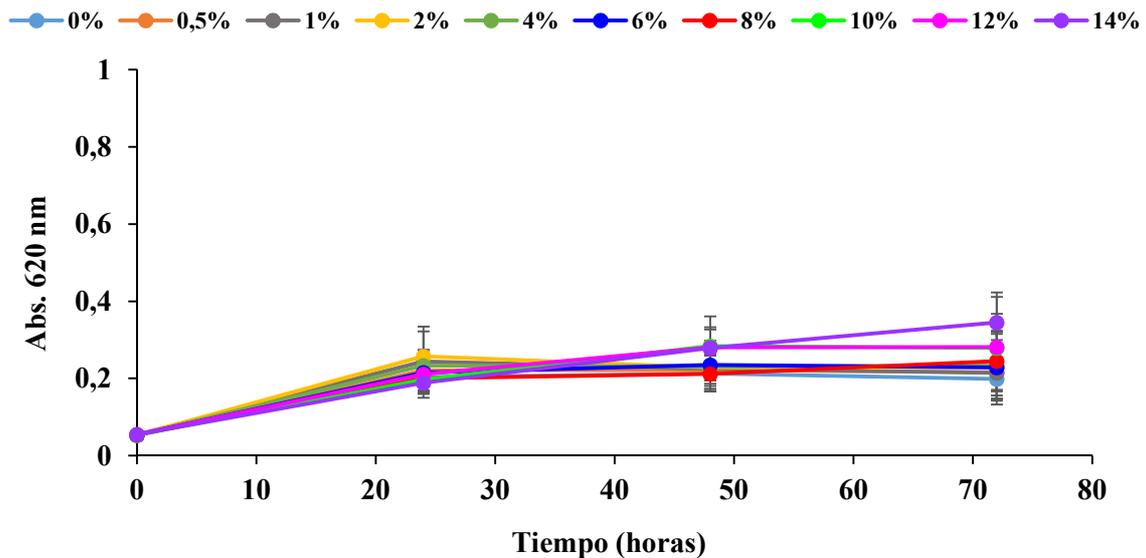


Gráfico 16 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento *L. reuteri*

Al igual que ocurre con *L. gasseri*, *L. reuteri* muestra un ligero crecimiento en todas las situaciones ensayadas, incluso en el medio sin fuente de carbono (0% de inulina). Como ya se ha comentado anteriormente, esto querrá decir que el medio contiene algún componente que el microorganismo está utilizando como sustrato. A partir de las 48 horas de incubación, se observa un ligero crecimiento de la bacteria con respecto al control (0% de inulina) cuanto mayor es la concentración de inulina añadida al medio. Por lo tanto, tras 48 horas de incubación, sólo las concentraciones más altas de inulina estudiadas (10, 12 y 14%) (p/v) tienen un ligero efecto prebiótico sobre el crecimiento de *L. reuteri* con respecto al control.

En el gráfico siguiente (Gráfico 17) se muestra el crecimiento de *L. reuteri* a concentración de 0% y de 14%. Como se ha comentado anteriormente, a 0h de incubación la bacteria ya presenta valores de absorbancia mayores que 0 para ambas concentraciones, siendo la del 14% la que va aumentando los valores de DO con respecto al control (0%) tras las diferentes horas de incubación.

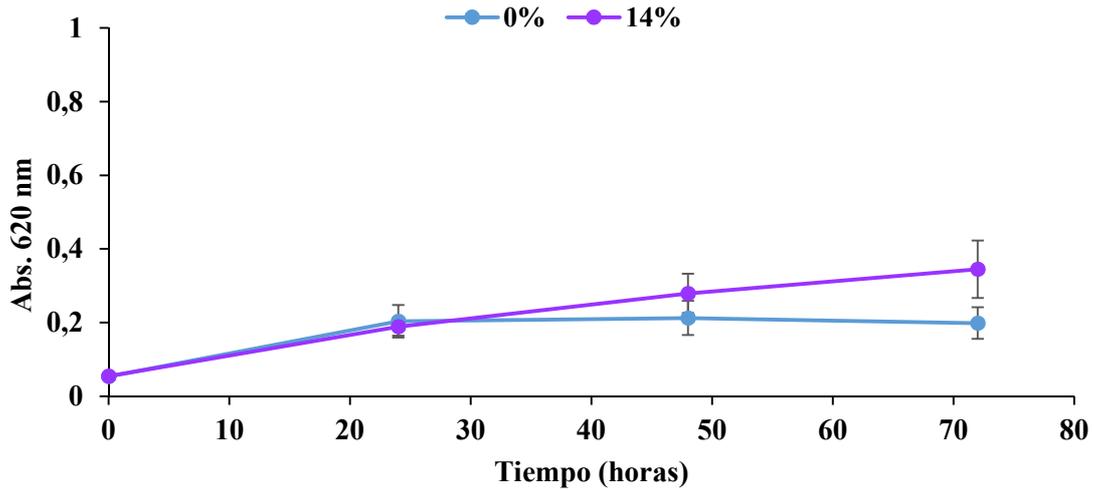


Gráfico 17 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo (14%) sobre el crecimiento de *L. reuteri* frente al control (0% inulina)

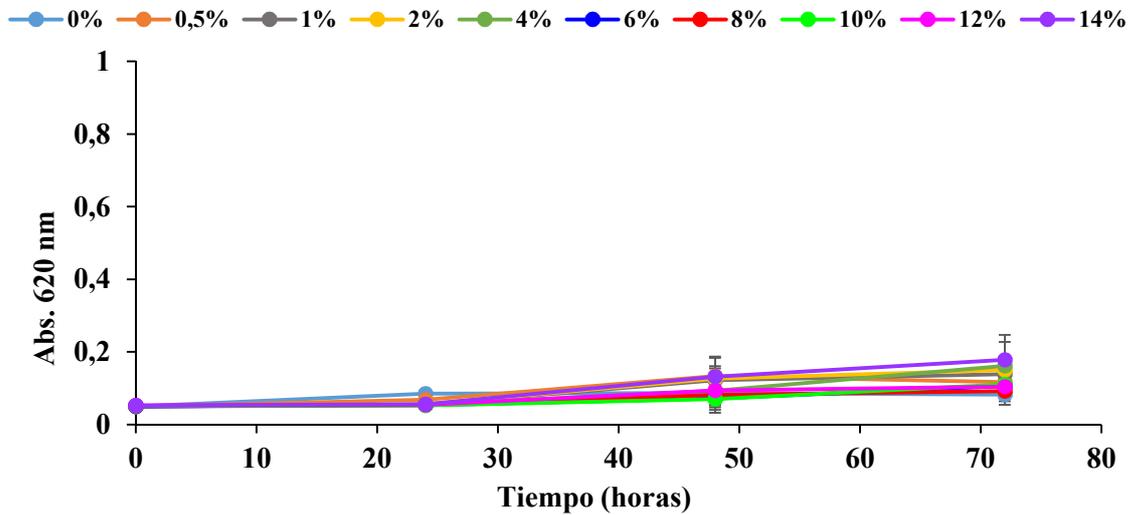


Gráfico 18 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de *B. breve*

Como se puede observar en el gráfico, ninguna de las concentraciones estudiadas de Inulina GR Beneo presenta efecto prebiótico en la estimulación del crecimiento de *B. breve*.

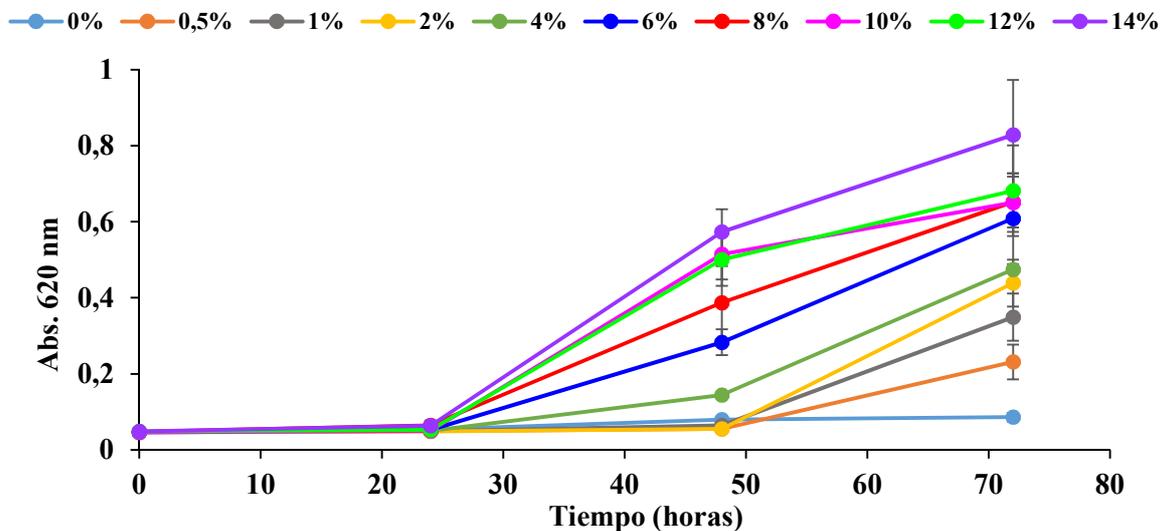


Gráfico 19 Evaluación de la aptitud prebiótica de Inulina GR Beneo sobre el crecimiento de *L. longum*

Como se puede observar en el gráfico, a las 24 horas de incubación *B. longum* no presenta crecimiento para ninguna de las concentraciones estudiadas. A las 48 horas de incubación, el efecto prebiótico de la Inulina GR Beneo sobre esta bacteria ya es visible a concentraciones superiores al 2% (p/v). (Entre las 24 y las 48 horas de incubación no se midió la absorbancia, por lo que el efecto prebiótico sobre la bacteria ha podido comenzar entre este período de tiempo). Además, se puede ver cómo el efecto prebiótico es mayor cuanto mayor es la concentración de Inulina. Tras 72 horas de incubación, todas las concentraciones de Inulina probadas (desde 0,5 hasta 14%) (p/v) muestran efecto prebiótico sobre el crecimiento de *B. longum*, donde la bacteria no es capaz de crecer al no disponer de una fuente de carbono como sustrato.

5.4. Análisis estadístico

Como se ha comentado en el apartado 3.7, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de la máxima concentración de inulina probada (14%) frente a la control (0% de inulina) para establecer las diferencias significativas (Tabla 7):

Tabla 7 Análisis de la varianza (ANOVA) para la concentración de 14% de inulina frente a la control (0% de inulina)

t (h)	Probabilidad (<i>p</i> -valor)					
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>B. breve</i>	<i>B. longum</i>
0	0,6072	0,1161	0,0687	0,0628	0,040	0,4675
24	0,3105	0,1161	0,1818	0,3764	9,5E-07	0,0009
48	0,0065	0,0146	5,7E-05	0,0122	0,0286	3,8E-18
72	0,0002	0,0070	0,0064	0,0002	3,0E-05	3,1E-15

Como se puede observar en la tabla, existen diferencias significativas con un intervalo de confianza del 95% (valores de *p* inferiores a 0,05) entre ambas concentraciones a partir de las 48h de incubación, siendo *B. longum* la bacteria en la que más se refleja dicha diferencia (que reafirma el gráfico 19). Esto quiere decir que la inulina a una concentración del 14% ejerce un efecto prebiótico (estimulación del crecimiento) sobre *B. longum* mucho mayor que para el resto de las bacterias. También puede observarse como la inulina presenta un efecto prebiótico sobre *B. breve* desde las 0h de incubación (Esto se debe a que el medio de cultivo PYF sin fuente de C tiene algún compuesto que la bacteria utiliza como sustrato, como ya se comentó en el apartado 5.3).

5.5. Digestión *in vitro* de los ingredientes y/o extractos vegetales

De los 13 ingredientes recogidos en la Tabla 5, se han digerido un total de 5 correspondientes a la empresa 1 (Ingredientes ricos en fibra, ya que la puesta a punto se realizó con la fibra inulina).

Para un peso inicial de 10 gramos de ingrediente vegetal, se obtuvo un total de 3,5 gramos de liófilo que se emplearán próximamente en los ensayos de evaluación de la actividad prebiótica *in vitro*. Estos liófilos se guardan en congelación para conservar sus propiedades y funciones y evitar su degradación. Debido al tiempo que requiere el proceso de digestión, es recomendable realizar varias en un mismo día, siendo muy cuidadosos a la hora de realizar los cambios de fase. De esta manera, se optimiza considerablemente el proceso.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha analizado el crecimiento de 6 cepas de bacterias representantes de la microbiota del GIT (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *B. breve* y *B. longum*). Para ello se monitorizó el recuento microbiano y la variación del pH y estos valores se modelizaron mediante el modelo matemático de Gompertz. Se ha podido comprobar sobre qué bacterias ha sido bueno el ajuste matemático (*L. acidophilus*, *L. reuteri* y *L. casei*) y sobre qué bacterias no lo ha sido tanto (*L. casei*, *B. breve* y *B. longum*).
2. Se han realizado las rectas patrón para cada una de estas bacterias en las que se ha relacionado la medida de los parámetros de DO y recuento en placa (UFC/mL) y se han obtenido las correspondientes ecuaciones de la recta que serán utilizadas posteriormente para determinar la concentración de población bacteriana en los experimentos de evaluación de la actividad prebiótica *in vitro*.
3. Se ha implantado en CNTA el procedimiento de digestión *in vitro* mediante la metodología descrita en (Brodkorb et al., 2019).
4. Se han digerido un total de 5 extractos vegetales y/o ingredientes del total previsto.
5. Se ha puesto a punto la metodología para cuantificar la aptitud prebiótica de extractos y/o ingredientes vegetales. Para ello, se ha utilizado la Inulina GR de Beneo en distintas concentraciones (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14%) como fuente de carbono.
6. De todas las bacterias evaluadas, la única bacteria cuyo crecimiento se ha visto significativamente promovido por acción de la inulina (efecto prebiótico) fue *B. longum*. Para el caso de *L. casei*, *L. reuteri* y *L. gasseri* se observa un ligero incremento del crecimiento a partir de las 72 horas de incubación y para un 14% de inulina en el medio de cultivo.

7. PRÓXIMOS PASOS

Los próximos pasos que se realizarán en el centro CNTA una vez puesta a punto la metodología de evaluación de la actividad prebiótica serán los siguientes:

1. Completar la digestión de todos los extractos vegetales (8 de 13)
2. Liofilización de los extractos vegetales
3. Cuantificar la posible aptitud prebiótica de los extractos vegetales

En caso de que dichos extractos tengan un resultado positivo, será un punto a favor para las empresas proveedoras de los mismos debido a la creciente demanda de productos funcionales por parte de los consumidores. Un resultado positivo podrá enfocar los objetivos de la empresa de manera diferente, ya que podrían plantearse el diseño y desarrollo de productos funcionales de carácter prebiótico. Es una propuesta muy interesante, ya que el consumo de alimentos que proporcionen beneficios al organismo es una tendencia que se encuentra en auge actualmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Bravo, L. (1998). *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*. 56(11), 317-333.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., & Bohn, T. (2019). *INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion*.
- Carbajal, Á., & UCM. (2018). *Fibra dietética*. La nutrición en la red
- Cardelle Cobas, A. (2009). *Síntesis, caracterización y estudio del carácter prebiótico de oligosacáridos derivados de la lactulosa*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Cardenas, F. J. C., Giannuzzi, L., Noia, M. A., & Zaritzky, N. E. (2017). *El modelado matemático: una herramienta útil para la industria alimenticia*. *Ciencia Veterinaria*, 3(1), 22-28.
- Corzo, N., Alonso, L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., ... Clemente, A. (2015). *Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos*. 31(1), 99-118.
- de las Cagigas Reig, L., & Blanco Anesto, J. (2002). *Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa*. 16(1).
- EFSA. (2015). *Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to «native chicory inulin» and maintenance of normal defecation by increasing stool frequency to Article 13.5 of Regulation (EC) No 1924/2006*. 13(1).
- Figuroa González, I. (2007). *Efecto de prebióticos en el crecimiento de Lactobacillus casei Shirota y Escherichia coli en un sistema de simulación del tracto intestinal*. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Harish, K., & Varghese, T. (2006). *Probiotics in human-evidence based review*. *Calicut Medical Journal* 4(3).
- Huacute, T., Nowinski, A., Drapala, A., Konopelski, P., & Ufnal, M. (2018). Indole and indoxyl sulfate, gut bacteria metabolites of tryptophan, change arterial blood pressure via peripheral and central mechanisms in rats. *Pharmacological Research*, 130, 172-179.
- Ki Bae, H., Jae Hwan, K., Hyuk Kon, K., Sung Hee, H., Yooheon, P., & Hyung Joo, S. (2016). *Evaluation of Prebiotic Effects of High-Purity Galactooligosaccharides in vitro and in vivo*. 54(2), 156-163.

- Kim, T. T., Parajuli, N., Sung, M. M., Bairwa, S. C., Levasseur, J., Soltys, C.-L. M., ... Dyck, J. R. B. (2018). Fecal transplant from resveratrol-fed donors improves glycaemia and cardiovascular features of the metabolic syndrome in mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 315(4), E511-E519.
- Krumbeck, J. A., Maldonado-Gomez, M. X., Ramer-Tait, A. E., & Hutkins, R. W. (2016). Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. *Current Opinion in Gastroenterology*, 32(2), 110-119.
- Ku, S., Park, M. S., Ji, G. E., & You, H. J. (2016). Review on Bifidobacterium bifidum BGN4: Functionality and Nutraceutical Applications as a Probiotic Microorganism. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9).
- Laurell, A., & Sjöberg, K. (2017). Prebiotics and synbiotics in ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 52(4), 477-485.
- Li, H., & Cao, Y. (2010). Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*, 39(5), 1107-1116.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). *Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos*. 25(121).
- Patil, S., Sawant, S., Hauff, K., & Hampp, G. (2018). Validated Postbiotic Screening Confirms Presence of Physiologically-Active Metabolites, Such as Short-Chain Fatty Acids, Amino Acids and Vitamins in Hylak® Forte. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Pérez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., & Osuna, A. (2009). *Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin*. 61, 67-65.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular*. 27(1), 76-89.
- Ronald Ross, R., & R. Preedy, V. (2016). *Probiotics, prebiotics and synbiotics. Bioactive foods in health promotion*.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C., Hollenberg, N., ... Kelm, M. (2006). *Epicatechin mediates beneficial effects of flavonol-rich cocoa on vascular function in humans*. 103, 1024-1029.

- Scott, K. (s. f.). Prebiotics. Recuperado de International scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) website: <https://isappscience.org/prebiotics/>
- Sonnenborn, U. (2016). Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: history of a special Escherichia coli strain with probiotic properties. *FEMS Microbiology Letters*, 363(19).
- Watson, R. R., & Preedy, V. R. (Eds.). (2016). *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: bioactive foods in health promotion*. Amsterdam ; Boston: Elsevier, AP.
- Wilson, B., & Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32 Suppl 1, 64-68.
- Wu, Y., Zhang, Q., Ren, Y., & Ruan, Z. (2017). Effect of probiotic Lactobacillus on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PloS One*, 12(6), e0178868.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica Inulina Orafti GR Beneo

Product Sheet

Orafti®GR

DOC.A4-03*09/07



Description

Orafti®GR	is a food ingredient consisting mainly of chicory inulin. Orafti®GR is a <u>GR</u> anulated powder.
chicory inulin	is a mixture of oligo- and polysaccharides which are composed of fructose units linked together by $\beta(2-1)$ linkages. Almost every molecule is terminated by a glucose unit. The total number of fructose or glucose units (= Degree of Polymerisation or DP) of chicory inulin ranges mainly between 2 and 60.

Compositional Specifications

All values expressed on dry matter.

Analytical Methods : see our Technical Brochures.

Inulin	> 90 %
Glucose + fructose	≤ 4 %
Sucrose	≤ 8 %
Dry Matter (d.m.)	97 ± 1.5 %
Carbohydrate content	> 99.5 %
Average DP of the inulin	≥ 10
Ash (sulphated)	< 0.2 %
Conductivity (15 Brix)	< 250 μ S
Heavy Metals	Pb, As each < 0.1 mg/kg Cd, Hg each < 0.01mg/kg
pH (10°Brix)	5.0 - 7.0

Microbiological Specifications

All values expressed on dry matter.

Analytical Methods : see our Technical Brochures.

Mesophilic bacteria - total count	max. 1000/g
Yeasts	max. 20/g
Moulds	max. 20/g
Thermophilic aerobic spores	max. 1000/g
Anaerobic H ₂ S producing thermophilic spores	max. 25/g
Enterobacteriaceae	absent in 1 g
Bacillus cereus	max. 100/g
Staphilococcus aureus	absent in 1 g
Escherichia coli	absent in 1 g
Clostridium perfringens	absent in 1 g
Clostridium botulinum	absent in 1 g
Salmonella	absent in 100 g
Listeria	Absent in 25 g

Labelling

All values are average values expressed per 100 g commercial product.

Carbohydrates	8 (97 ¹⁾)	Gluten	absent
Sugars	8	Lactose	absent
Dietary Fibre ²⁾	89	Milk/meat/egg components	absent
Protein	absent	Seed/soy components	absent
Fat	absent	Insecticides, pesticides	absent
Vitamins and Minerals	Negligeable	Nuts, nut components	absent
Caloric value ³⁾	120 kcal/505 kJ	Colza	absent
Broteinheite ⁴⁾	0.65	Other allergens	absent
		Enzymatic activity	absent
		Folate	absent

N.D. = Not Detectable N/A = Not Applicable

1) including dietary fibre

2) measured by AOAC Method 997.08

3) based on a caloric value of 1 kcal/g for pure inulin. To be adapted to local regulations.

4) in accordance with German regulations.

Other Information (see also our Technical Brochures)

Aspect	Fine white granulated powder
Behaviour	Hygroscopic
Taste	Slightly sweet, without aftertaste
Solubility in water	120 g/l at 25°C - 350 g/l at 90°C
Wettability in water	Good.
Dispersability in water	Good. May require stirring.
Properties and Applications	See our Technical Brochures.
Particle Sizes	See document "Particle Sizes".
Density	Approx. 580 ± 50 g/l
Labelling - Ingredients List	Inulin
Safety	Safe. Not toxic. Not dangerous. Excessive consumption may cause laxative effects. Is, like other fine powders, when mixed with air and ignited, capable of causing an explosion.
Packaging	Paper bags on pallets, see 'Packaging Sheet Powders'
Optimal storage conditions	Cool and dry, in its original airtight packaging.
Maximum durability	See packaging (minimum 18 months upon delivery)
Transport conditions	According to document 'Transport Conditions'
Irradiation	Not irradiated
GMO	Not containing GMOs or GMO-derived components. Not produced using GMO-based technology.
Kosher	Certified, Orthodox Union
Halal	Certified, Halal Feed and Food Inspection Authority
Plant origin	Suitable for vegetarians & vegans
Produced by	BENEEO-Orafti – see address on packaging label

Represented by :



Anexo 2. Composición nutricional de los medios de cultivo empleados en este trabajo.

Tabla A1.1 Composición nutricional del medio de cultivo Iso-Sensiest Broth.

ISO-SENSIEST BROTH		
Ingredientes		g/L
PROTEÍNAS	Caseína hidrolizada	11
	Peptona	3
FUENTE DE AZÚCAR	Glucosa	2
SALES Y MINERALES	Cloruro de sodio	3
	Hidrogeno fosfato de disodio	2
	Acetato de sodio	1
	Glicerofosfato de magnesio	0,2
	Gluconato de calcio	0,1
	Sulfato de cobalto	0,001
	Sulfato de cobre	0,001
	Sulfato de zinc	0,001
	Sulfato de hierro	0,001
	Cloruro de manganeso	0,002
	Menadiona	0,001
	Cianocobalamina	0,001
	Clorhidrato de L-cisteína	0,02
VITAMINAS	L-Triptófano	0,02
	Piridoxina	0,003
	Pantotenata	0,003
	Nicotinamida	0,003
	Biotina	0,0003
	Tiamina	0,00004
	Adenina	0,01
	Guanina	0,01
	Xantina	0,01
	Uracilo	0,01
pH		7,4 ± 0,2

Tabla A1.2 Composición nutricional del medio de cultivo MRS.

MRS		
Ingredientes		g/L
FUENTE AZÚCAR	Glucosa	20
FUENTE NITRÓGENO ORGÁNICO	Polipeptona	10
	Extracto de carne	10
	Extracto de levadura	5
FUENTE NITRÓGENO INORGÁNICO	Citrato de amonio	2
	Fosfato de dipotasio	2
SALES Y MINERALES	Acetato de sodio	5
	Sulfato de magnesio	0,2
	Sulfato de manganeso	0,04
	Tween 80	1,08
OTROS		
pH		5,7

Tabla A1.3 Composición nutricional del medio de cultivo Bifidobacterium Agar modified.

BIFIDOBACTERIUM AGAR		
Ingredientes		
Base agar Columbia		42,5 g
FUENTE DE AZÚCAR	Glucosa	2,5 g
	Lactulosa	2,5 g
VITAMINAS	Cisteína-HCl	0,5 g
	Riboflavina	0,01 g
OTROS	Ácido propiónico	5 mL

Tabla A1.4 Composición nutricional de los medios de cultivo PYF sin fuente de carbono y PYF con fuente de carbono

PYF SIN FUENTE DE C		PYF CON FUENTE DE C	
Ingredientes	g/100mL	Ingredientes	g/100mL
Extracto levadura	1	Extracto levadura	1
Peptona	0,5	Peptona	0,5
L-cisteína HCl	0,05	L-cisteína HCl	0,05
Triptona	0,5	Triptona	0,5
Solución sal	4	Solución sal	4
pH	6,5	Glucosa	2

Tabla A1.5 Receta solución de sales para el medio PYF

Solución de sales	
Cloruro de calcio	0,02
Sulfato de magnesio	0,02
Fosfato dipotásico	0,1
Fosfato monopotásico	0,1
Cloruro de sodio	0,2
Hidrofosfito disódico pentahidratado	1,7

Anexo 3. Gráficos correspondientes a las curvas de crecimiento microbiano con la medida de pH y DO

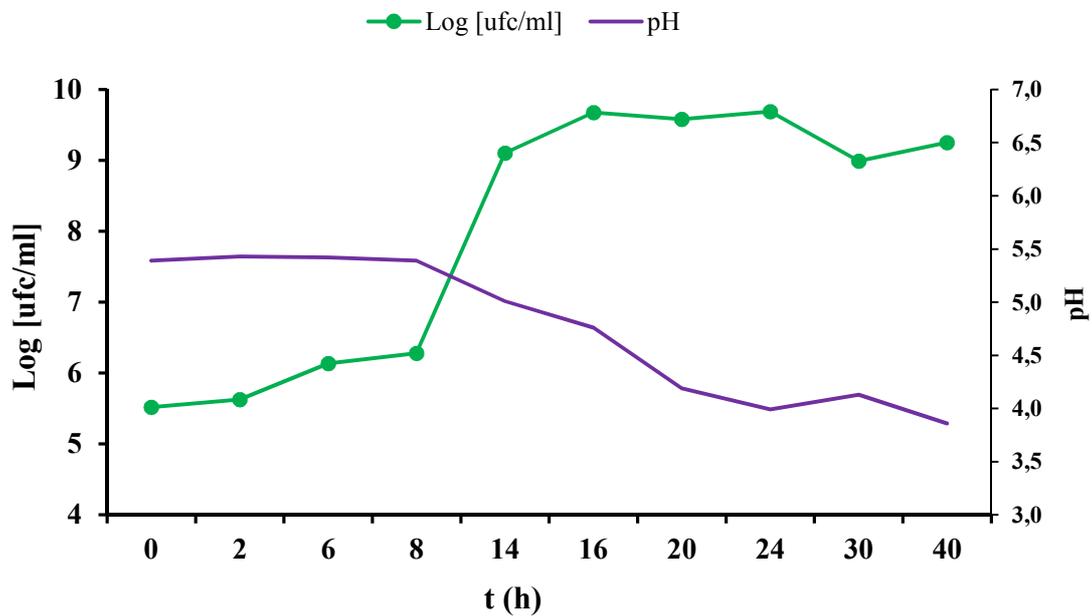


Gráfico A2.1 Curva de crecimiento de *L. casei* CECT 475 en MRS

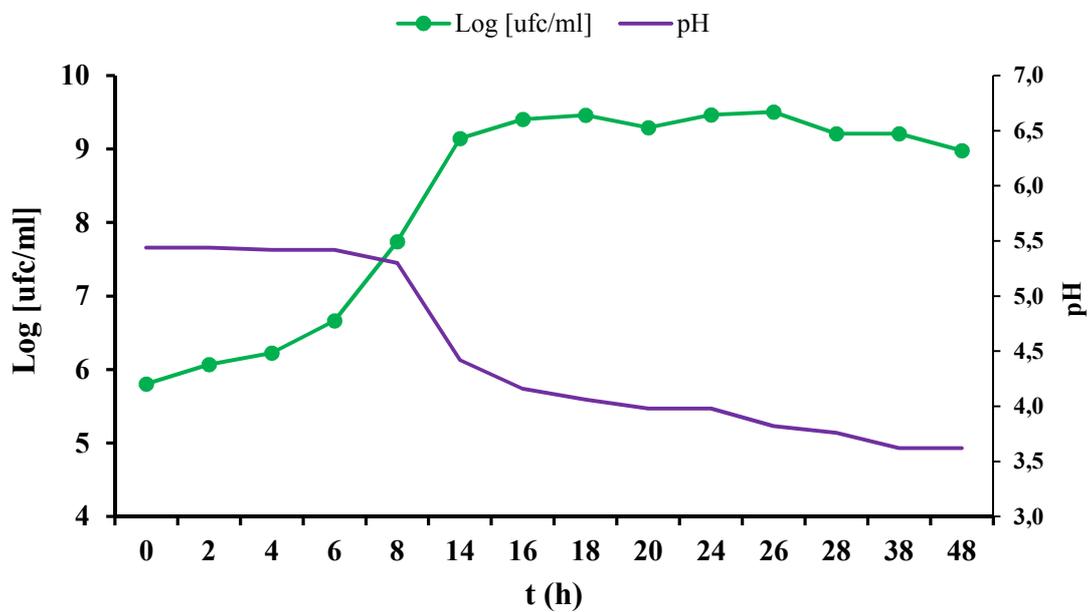


Gráfico A2.2 Curva de crecimiento de *L. gasseri* CECT 4479 en MRS

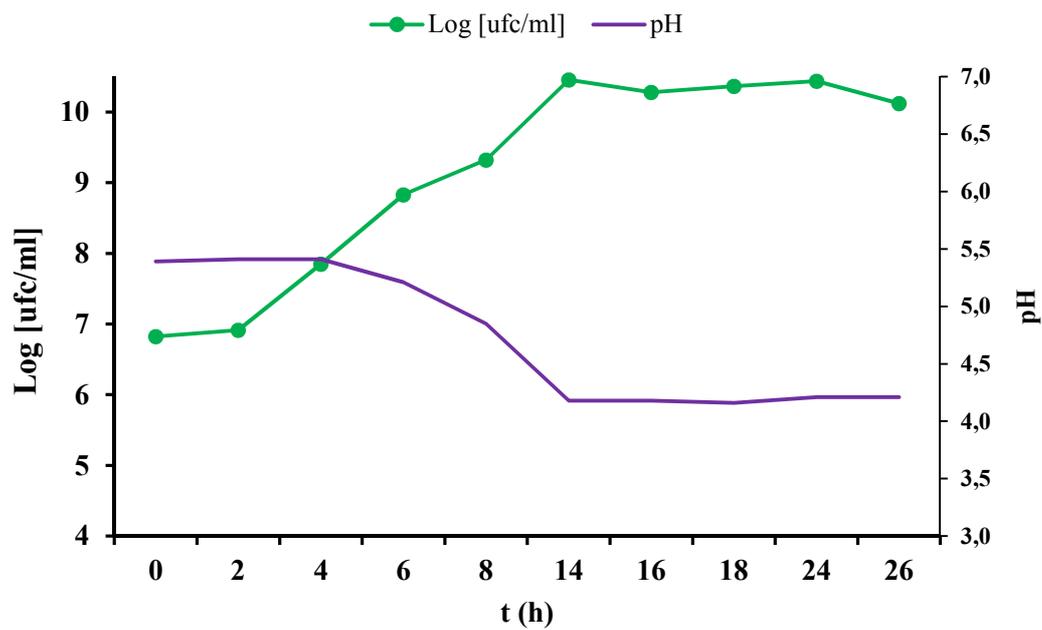


Gráfico A2.3 Curva de crecimiento de *L. reuteri* CECT 925 en MRS

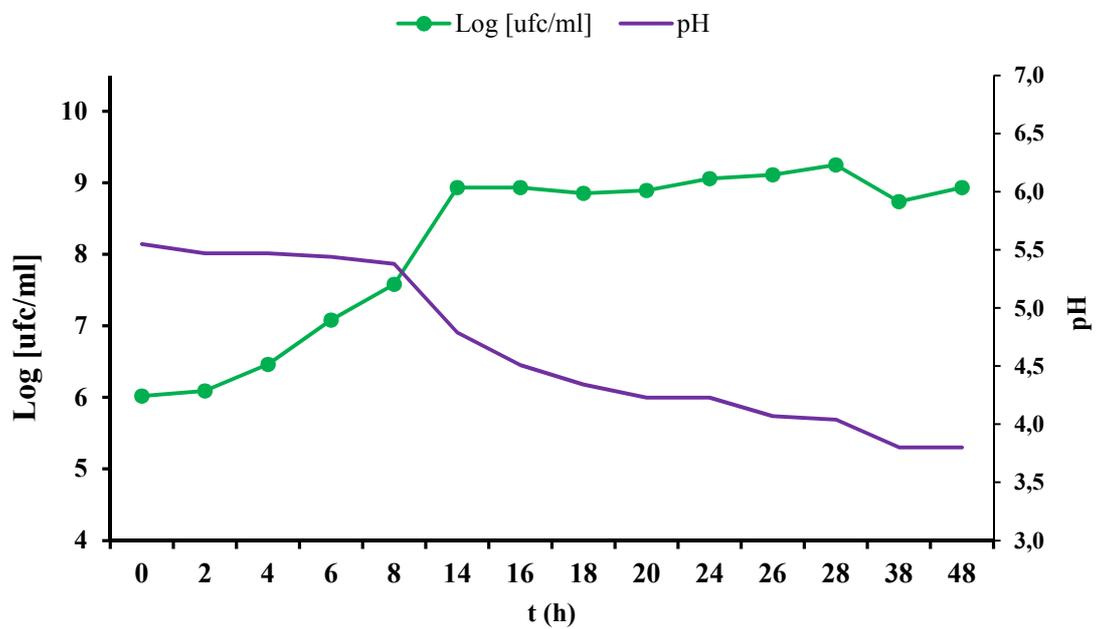


Gráfico A2.4 Curva de crecimiento de *L. acidophilus* CECT 903 en MRS

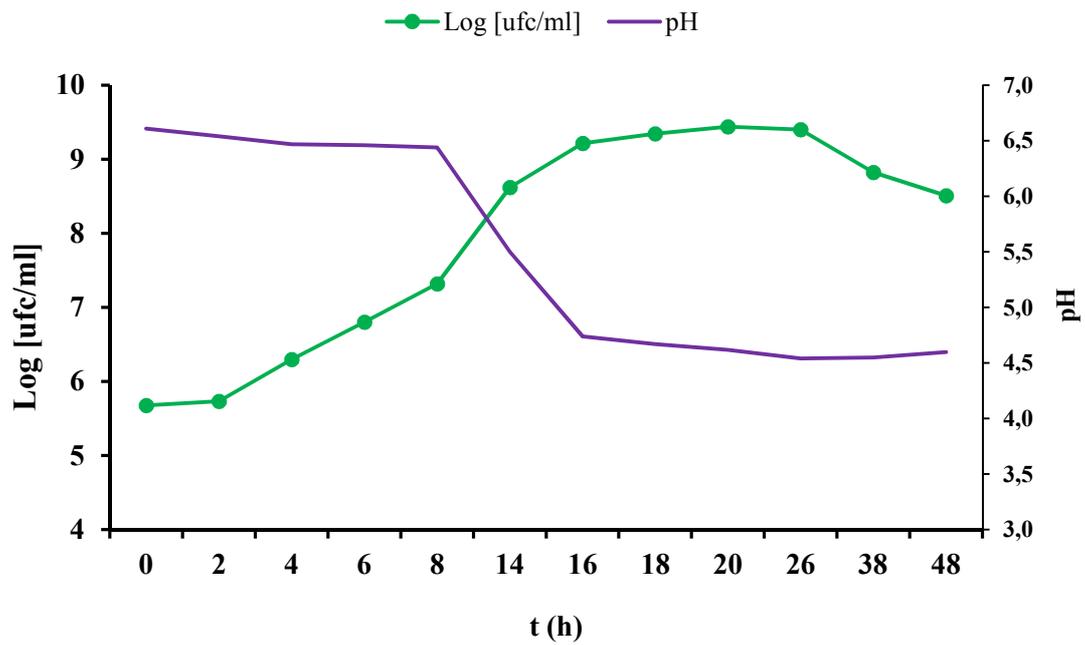


Gráfico A2.5 Curva de crecimiento de *B. breve* CECT 4839 en LSM

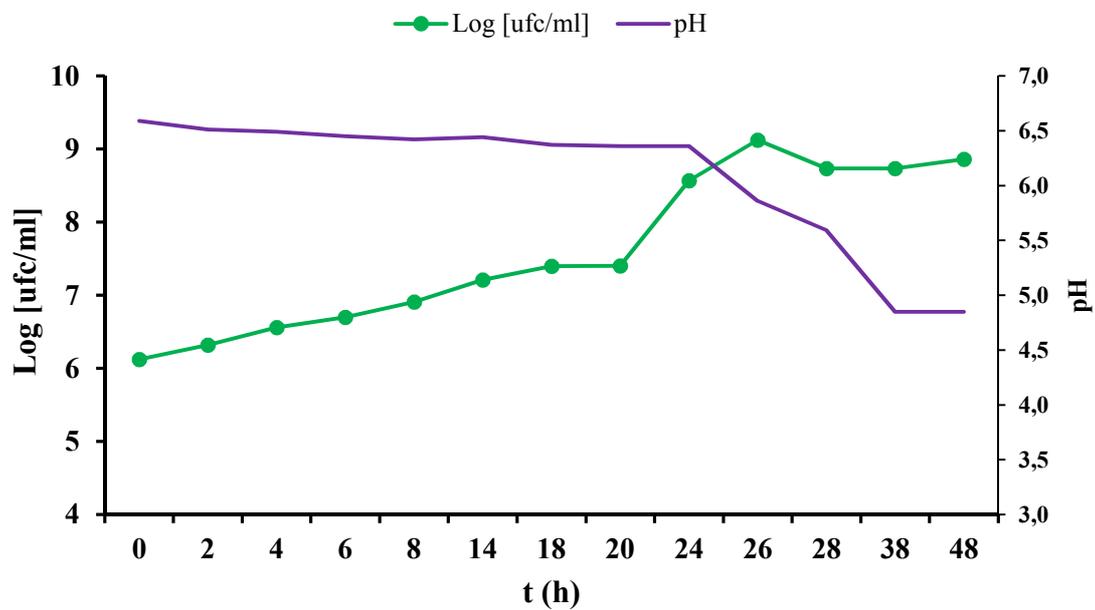


Gráfico A2.6 Curva de crecimiento de *B. longum* LMG 13197 en LSM

Anexo 4. Ejemplo práctico de cuantificación de aptitud prebiótica con extracto de Hibisco (0, 8, 10, 12 y 14%) sobre el crecimiento de *L. casei* y *L. reuteri*

1. Medición de DO en el lector de placas ELISA

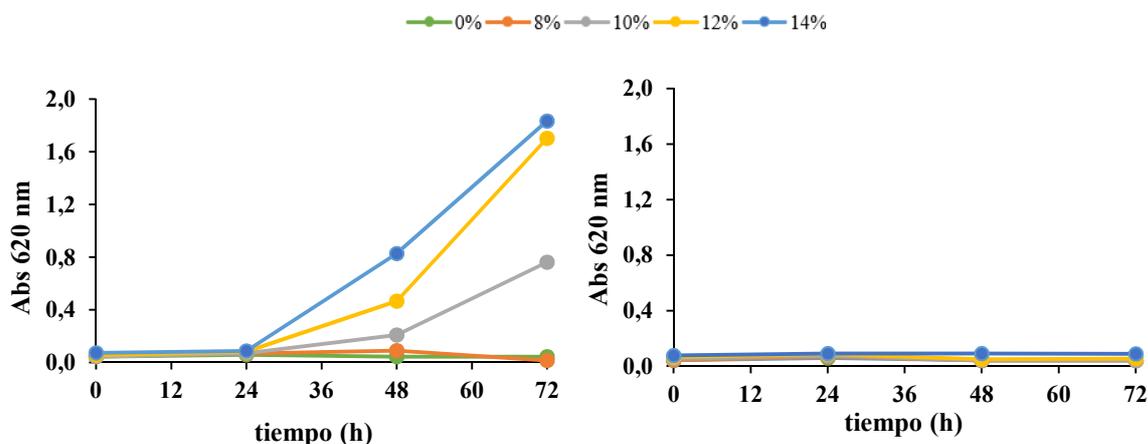


Gráfico A4.1 Evaluación de actividad prebiótica de extracto de Hibisco sobre *L. casei* (ejemplo práctico)

Gráfico A4.2 Evaluación de la actividad prebiótica de extracto de Hibisco sobre *L. reuteri* (ejemplo práctico)

2. Empleo de las ecuaciones de las rectas patrón

» *L. casei*: $y = 9E-09x + 0,0795$

» *L. reuteri*: $y = 2E-09x + 0,0997$

Ejemplo *L. casei* t=48h DO = 0,8; y (UFC/mL) = 8,0E7 UFC/mL

Esta operación se repetirá para cada uno de los tiempos y concentraciones de extracto vegetal y/o ingrediente analizado.

3. Sustitución de los valores de DO (y) en las ecuaciones para hallar la concentración de población bacteriana en UFC/mL (x)

Una vez obtenidos los valores en UFC/mL, se calcula el logaritmo de dichos valores y se elaboran gráficos que muestren la curva de crecimiento microbiano en dicho extracto. Estos gráficos se comparan posteriormente con los gráficos obtenidos en la puesta a punto con el único ingrediente establecido como prebiótico por la EFSA (Inulina GR Beneo).

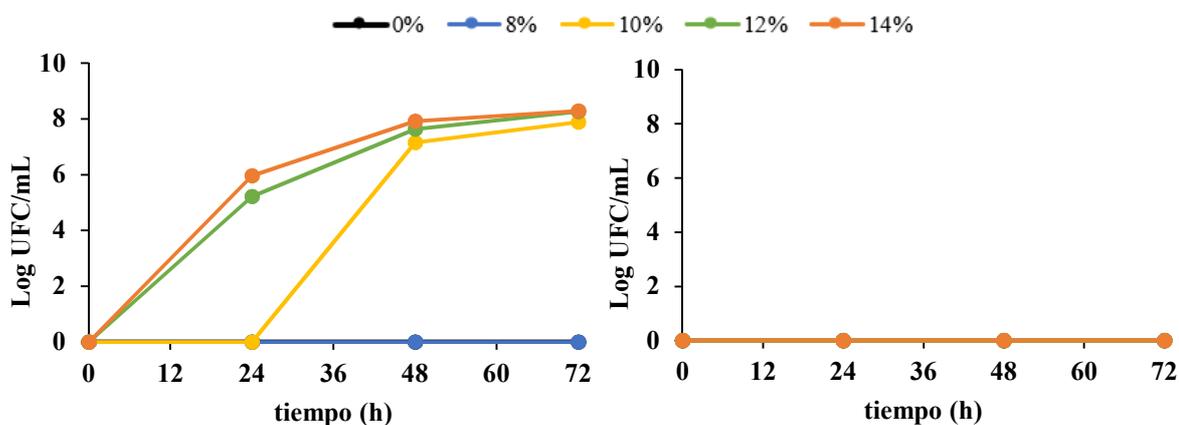


Gráfico A4.3 Curva de crecimiento de *L. casei* en solución de extracto de Hibisco (ejemplo práctico)

Gráfico A4.4 Curva de crecimiento de *L. reuteri* en solución de extracto de Hibisco (ejemplo práctico)

4. Comparación de la curva de crecimiento de los microorganismos en su medio ideal con la curva de crecimiento en solución de extracto vegetal

Se realiza un gráfico que englobe los resultados obtenidos en la prueba de aptitud prebiótica y la curva de crecimiento del microorganismo en su medio idóneo, y así pueden compararse los parámetros cinéticos.

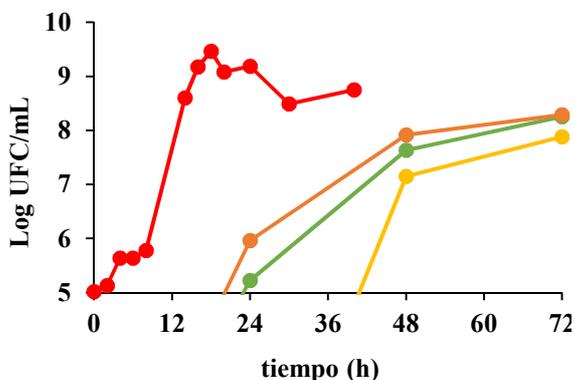


Gráfico A4.5 Curvas de crecimiento de *L. casei* en MRS y extracto de Hibisco (*ejemplo práctico*)

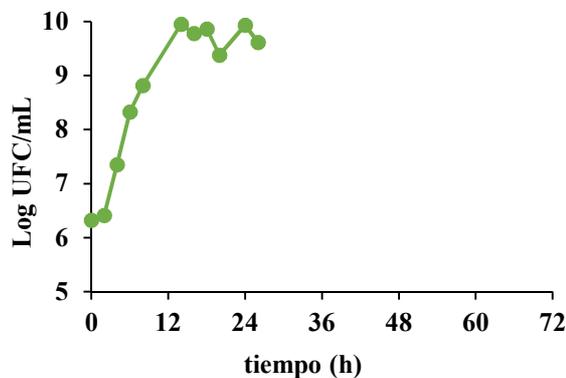


Gráfico A4.6 Curvas de crecimiento de *L. reuteri* en MRS y extracto de Hibisco (*ejemplo práctico*)

Como se puede observar en los gráficos, *L. casei* necesita mucho más tiempo para adaptarse al medio (Hibisco) y emplearlo como sustrato que en su medio de cultivo idóneo (MRS en este caso). Además, con el Hibisco no crece más que hasta 10^8 UFC/mL. En el caso de *L. reuteri*, esta bacteria no crece en presencia de extracto vegetal.

De acuerdo con estos datos, se podría decir que el extracto de Hibisco presenta un ligero potencial prebiótico sobre *L. casei*, ya que estimula su crecimiento, pero no para *L. reuteri* ya que esta bacteria no crece en presencia de este extracto.