

## Actividad prebiótica de fructanos con distinto grado de polimerización obtenidos de tubérculos de topinambur (*Helianthus tuberosus* L.)

**Rubel I.A.<sup>1</sup>, Pérez E.E.<sup>2</sup>, Genovese D.B.<sup>2</sup> y Manrique G.D.<sup>1</sup>**

<sup>(1)</sup> Universidad Nacional del Centro de la Pcia de Bs. As. Dpto de Ingeniería Química – Núcleo TECSE.

<sup>(2)</sup> Planta Piloto de Ingeniería Química. CONICET - Universidad Nacional del Sur

[irubel@plapiqui.edu.ar](mailto:irubel@plapiqui.edu.ar)

**Resumen:** Los prebióticos son carbohidratos no digeribles que afectan positivamente la salud del huésped por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias del colon. La inulina es un carbohidrato de reserva vegetal con propiedades prebióticas que dependen de la dosis ingerida y de su grado de polimerización (DP). Este último, a su vez, viene determinado por la fuente, condiciones de cultivo y almacenamiento y métodos de extracción. El tubérculo de topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) almacena fructanos y su DP disminuye en función del tiempo de almacenamiento. El objetivo de este trabajo fue analizar la actividad prebiótica de fructanos de tubérculos de topinambur almacenados durante diferentes períodos, y compararla con la de una inulina comercial de achicoria. El grado de polimerización promedio (DP<sub>n</sub>) fue obtenido utilizando HPLC. La actividad prebiótica *in vitro* se evaluó mediante parámetros de crecimiento de *L. paracasei* durante 24 horas. La inulina con DP<sub>n</sub> 9 mostró la mayor actividad prebiótica, siendo comparable a la de la inulina de referencia (DP<sub>n</sub> 10). Este resultado permite considerar a la inulina de topinambur como un potencial ingrediente prebiótico para el desarrollo de alimentos funcionales.

**Palabras clave:** topinambur, inulina, prebiótico, grado de polimerización.

**Abstract:** Prebiotics are non-digestible carbohydrates which positively affect the health of the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon. Inulin is a fructan type plant reserve carbohydrate with prebiotic properties that depend on the dose ingested and the degree of polymerization (DP). The DP of inulin depends, in turn, on the source, the culture conditions and method of extraction and storage. Tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) accumulate fructans, whose DP decreases as a function of storage time. The objective of the present work was to analyze prebiotic activity of fructans of Jerusalem artichoke tubers stored for different periods, in comparison with commercial inulin from chicory. The average degree of polymerization (DP<sub>n</sub>) was obtained using HPLC. The prebiotic *in vitro* activity using 24 hours growth parameters of *L. paracasei* was evaluated. The inulin of DP<sub>n</sub> 9 showed the highest prebiotic activity comparable to the reference inulin (DP<sub>n</sub> 10). This result allows us to consider the inulin of Jerusalem artichoke as a potential prebiotic ingredient for the development of functional foods.

**Keywords:** Jerusalem artichoke, inulin, prebiotic, degree of polymerization.

### Introducción

Los fructanos del tipo inulina son carbohidratos de reserva que están presentes en diversos alimentos de origen vegetal, como cebolla, alcaucil, espárrago, puerro, topinambur, ajo y achicoria. La distribución y el tamaño molecular de los fructanos es variable dependiendo de la fuente de la que se extraigan (Madrigal y Sangronis 2007), como también de las condiciones climáticas de crecimiento y maduración (Pollock y Cairns 1991, Coussement 1999).

La inulina consiste de cadenas lineales de unidades de D-fructosa, unidas mediante enlaces β (2→1), que presentan tienen una unidad de D-glucosa terminal ligada mediante enlace α (1→2) (Ernst y Chatterton 1996). El grado de polimerización de las cadenas (DP) está comprendido entre 3 y 60 unidades de fructosa. De acuerdo al grado de polimerización medio (DP<sub>n</sub>), las inulinas presentan atributos funcionales distintivos que las hacen aptas para su utilización como ingrediente y/o coadyuvante de tecnología en la industria alimenticia como fuente de fibra, sustituto de grasas y azúcares, entre otras aplicaciones (Niness 1999, Narinder y Gupta 2002).

El topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) es una planta que se utiliza en nuestro país, principalmente, con fines hortícola-forrajeros (Raso 1990). Dado que sus tubérculos frescos almacenan entre un 16 y 20% (p/p) de inulina (Rébora 2008) éstos ofrecen diversas aplicaciones, tales como la producción de etanol (Baldini *et al.* 2004), y además son una excelente fuente potencial de ingredientes para la industria alimenticia (Kaur y Gupta 2002). La inulina de topinambur presenta un DP<sub>n</sub> entre 3 y 30 (Baldini *et al.* 2004). El tiempo y la temperatura de almacenamiento de los tubérculos condicionan el DP de los fructanos (Saengthongpinit y Sajjaanantakul 2005). En las etapas iniciales, los tubérculos contienen mayor cantidad de fracciones polimerizadas. A medida que transcurre el tiempo de almacenamiento aumenta la actividad enzimática ocasionando la hidrólisis de las moléculas de inulina a FOS, utilizados como fuente energética para el desarrollo y la generación de brotes.

Los prebióticos son carbohidratos resistentes a la hidrólisis enzimática en el tracto gastrointestinal (Rumessen *et al.* 1990) que llegan intactos al colon donde son fermentados selectivamente promoviendo el crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias benéficas (Gibson y Roberfroid 1995, Gibson, 1998). Dichos microorganismos se denominan probióticos, dentro de los cuales se encuentran los lactobacilos y las bifidobacterias, que contribuyen a equilibrar la flora microbiana del colon, suprimiendo el crecimiento de bacterias patógenas mediante diversos mecanismos, como la producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato). De esta manera inhiben la producción de materiales carcinogénicos y aumentan la inmunidad (Tancrede 1992, Roberfroid 1993, Roberfroid *et al.* 1998, Gibson, 1998, Menne *et al.* 2000). Por otro lado, se ha demostrado que los prebióticos pueden aumentar la absorción de calcio y magnesio; regular los niveles de glucosa y promover la reducción del colesterol sérico (Coudray *et al.* 1997, Niness 1999).

Los fructanos del tipo inulina son considerados ingredientes alimenticios prebióticos (Macfarlane *et al.* 1991, Lopez –Molina *et al.* 2005). Varios autores determinaron la actividad prebiótica de fructanos *in vitro* (Palframan *et al.* 2003; Polemis *et al.* 2005). Algunos estudios han demostrado que la mayoría de las especies de bifidobacterias son capaces de utilizar cadenas cortas de FOS e inulina (Roberfroid *et al.* 1998, Perrin *et al.* 2001, Biedrzycka y Bielecka 2004, Rossi *et al.* 2005.). Si bien algunos autores mencionan a la inulina de achicoria como un sustrato prebiótico óptimo para estimular el crecimiento de Lactobacilos (Huebner *et al.* 2007) y a la oligofructosa, de la misma fuente, como promotora del crecimiento de bifidobacterias (Durieux *et al.* 2001), al presente no hay estudios suficientes que confirmen la aptitud del topinambur como fuente alternativa de dichos sustratos con propiedades prebióticas equivalentes a los de achicoria.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad prebiótica *in vitro* frente a *Lactobacillus paracasei* de muestras de inulinas de distintos DP<sub>n</sub>, provenientes de tubérculos de topinambur, y analizarla comparativamente con la correspondiente a inulina comercial de achicoria.

## **Materiales y Métodos**

### ***Material vegetal y almacenamiento***

Se utilizaron tubérculos de *Helianthus tuberosus* L., variedad Bianka, originalmente proveniente de Lonca Hue (Traslasierra, Córdoba), los que fueron extraídos y plantados en terrenos del INTA Manfredi (Córdoba). Las muestras de topinambur fueron cosechadas a los 10 meses de su siembra. Se almacenaron en cámara frigorífica a una temperatura de 4-5°C y una humedad relativa mínima del 98%.

### ***Reactivos***

Oligofruetosacáridos Orafit P95, inulina HP e inulina GR Beneo-Orafit (Bélgica) fueron gentilmente donados por la firma Saporiti (Argentina); glucosa, fructosa, arabinosa y sacarosa se adquirieron de Sigma-Aldrich (EEUU). Los reactivos y medios de cultivo utilizados en los ensayos de actividad prebiótica fueron: agar agar, caldo MRS, MRS agar, extracto de carne, extracto de levadura y proteosa peptona de Britania (Argentina); glicerol de Biopack (Argentina) y glucosa de Merck (Alemania). Todos los otros reactivos utilizados fueron de calidad p.a.

### ***Preparación de las muestras de topinambur***

Se retiraron de la cámara lotes de tubérculos para la posterior extracción de inulina a los 0, 2, 4 y 8 meses de almacenamiento. En consecuencia, a las inulinas extraídas se las denominó Inulina 0, Inulina 2, Inulina 4 e

Inulina 8. Los tubérculos de cada lote fueron cortados en rodajas de aproximadamente 3 mm y se liofilizaron en equipo L-A-B3-C, (Rificor, Argentina) a -40 °C y a una presión de 0,014 mm de Hg durante el tiempo requerido para llegar a peso constante (aproximadamente 72 h). El material liofilizado se almacenó en bolsas con cierre hermético (Ziplock, Argentina) bajo atmósfera de nitrógeno. Las bolsas se dispusieron dentro de cajas plásticas herméticamente cerradas, en lugar seco (40% HR) y fresco (15-25 °C) hasta su uso.

#### ***Obtención del extracto bruto de tubérculos de topinambur***

Las rodajas del tubérculo liofilizadas, correspondientes a cada uno de los estadios de almacenamiento se molieron en un molinillo (Braun, México) hasta obtener un polvo homogéneo. La extracción de fructanos se realizó en un sistema *batch* termostatzado a 85°C con agitación, empleando agua destilada como solvente, en una relación líquido-sólido 8:1. El proceso se llevó a cabo durante dos horas. El extracto bruto se separó mediante etapas sucesivas de filtración por muselina y papel, a 80 °C y se liofilizó en frasco de vidrio con tapa a rosca, bajo las mismas condiciones utilizadas para los tubérculos. El material resultante se almacenó en los mismos frascos, bajo atmósfera de nitrógeno en lugar seco (40%HR) y fresco (15-25 °C) para su posterior análisis y utilización como sustrato en el estudio de capacidad prebiótica.

#### ***Purificación del extracto bruto***

Un volumen de 230 mL de extracto bruto se llevó a pH 11,2 agregando hidróxido de calcio sólido y se mantuvo en agitación a 65 °C durante 30 minutos. Luego, se elevó la temperatura a 85 °C y se agregó hidróxido de calcio adicional, hasta formación de precipitado (pH cercano a 12). Se mantuvo en agitación por otros 45 minutos, se separó el precipitado por filtración, y se descartó. El filtrado se carbonató por burbujeo rápido con CO<sub>2</sub> a 65 °C, hasta pH 10,8 y luego se centrifugó a 3200 rpm, durante 10 minutos en centrífuga DCA-300, (PRESVAC S.R.L., Argentina). El sobrenadante obtenido se separó mediante filtración bajo vacío con papel (S&S N° 859) a 65 °C. Se realizó una segunda etapa de carbonatación por burbujeo con CO<sub>2</sub>, hasta pH 8,9. Finalmente, se centrifugó y se filtró nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores. El extracto límpido obtenido se calentó a 65 °C durante 15 minutos y se adicionó carbón activado en una proporción del 1% (p/p). El carbón se separó mediante filtración por papel bajo vacío. Se obtuvo así un extracto límpido amarillo pálido que fue liofilizado para su posterior uso.

#### ***Hidrólisis ácida del extracto purificado***

El liofilizado correspondiente al extracto purificado se suspendió en ácido clorhídrico 0,01M (2 mL de ácido por cada 20 mg de sólido) y la suspensión resultante se mantuvo a 90 °C durante 6 horas. Finalmente, se neutralizó con hidróxido de sodio 0,01M, obteniéndose así el hidrolizado del extracto purificado para su posterior análisis.

#### ***Cuantificación de carbohidratos y determinación de su grado de polimerización promedio (DP<sub>n</sub>)***

Los carbohidratos del extracto purificado y del correspondiente hidrolizado, se determinaron por HPLC utilizando un sistema cromatográfico Alliance e2695, (Waters, EEUU), equipado con una columna Aminex HPX-87C (Bio-Rad, EEUU) de 300 mm x 7,8 mm, bucle de inyección de 10 µL y detector de índice de refracción 2414, (Waters, EEUU). Como fase móvil se empleó agua tridestilada, con un caudal de 0,3 mL min<sup>-1</sup> y la temperatura de la columna se mantuvo en 65 °C. El programa de procesamiento de datos utilizado fue Empower 2 (Shimadzu, Japón). Se utilizó estandarización externa con soluciones de los diferentes azúcares en concentraciones de 1 a 10 mg mL<sup>-1</sup>. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Asumiendo la hidrólisis total de la sacarosa, los contenidos de fructosa y glucosa, producidas por dicho proceso (F<sub>S</sub> y G<sub>S</sub>, respectivamente) se calcularon mediante la siguiente expresión:

$$F_S = G_S = \frac{S}{2} \quad (1)$$

También se determinaron los niveles de fructosa y glucosa en las muestras, antes y después de la hidrólisis ácida (F<sub>L</sub>, G<sub>L</sub> y F<sub>T</sub>, G<sub>T</sub>, respectivamente). A partir de estos datos se calcularon los contenidos de fructosa y glucosa provenientes de los fructanos (F<sub>I</sub> y G<sub>I</sub>, respectivamente) mediante las siguientes expresiones:

$$F_I = F_T - (F_L + F_S) \quad (2)$$

$$G_I = G_T - (G_L + G_S) \quad (3)$$

Las ecuaciones 2 y 3 son válidas cuando se considera la hidrólisis total de los fructanos.

El grado de polimerización promedio (DPn) de los fructanos (inulina) fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$DP = \frac{F_I + G_I}{G_I} \quad (4)$$

La ecuación 4 es válida cuando se asume que cada molécula de fructano contiene una unidad de glucosa (Kocsis *et al.*, 2007).

### **Microorganismo y condiciones de cultivo**

Se trabajó con una cepa pura liofilizada de *L. paracasei* BGP1 (CLERICI-SACCO, Cadorago, Italia). La cepa fue activada en caldo MRS comercial durante 12 h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y conservada a -80 °C en caldo MRS con glicerol al 20% (p/v), hasta su utilización. A partir del cultivo congelado, se subcultivó en vial con 10 mL del correspondiente medio de cultivo a ensayar y se incubó por 12 h a 37 °C bajo anaerobiosis. Un volumen de 45 mL del medio de cultivo a estudiar se inoculó con 100 µL del subcultivo y se incubó bajo las mismas condiciones anteriores para obtener cultivos de toda una noche (ON). Se extrajeron muestras a diferentes tiempos para las mediciones de pH y acidez, durante 24 h, y de recuento en placa a las 48 h.

Los medios de cultivo utilizados fueron: 1) MRS (2 % de glucosa); 2) MRS-Basal conteniendo: 10 g L<sup>-1</sup> proteasa peptona, 8 g L<sup>-1</sup> extracto de carne, 4 g.L<sup>-1</sup> extracto de levadura, 1mL Tween 80, 2 g.L<sup>-1</sup> fosfato dipotásico, 5 g.L<sup>-1</sup> acetato de sodio, 2 g.L<sup>-1</sup> citrato de amonio, 0,02 g.L<sup>-1</sup> sulfato de magnesio y 0,05 g.L<sup>-1</sup> sulfato de manganeso; 3) MRS-Basal+1% de glucosa; 4) MRS-Basal+1% de inulina GR; 5) MRS-Basal+1% de inulina extraída de topinambur en los diferentes tiempos de almacenamiento. El contenido de la fuente de carbono en medios fue seleccionado en base a trabajos previos que demostraron que la suplementación con un 1% (p/v) de inulina en MRS es suficiente para evidenciar el efecto estimulante sobre el crecimiento de bacterias benéficas comparado con el MRS basal. (Dandan *et al.*, 2008). A todos los medios se les agregó 0,02% de L-cisteína para mejorar las condiciones de anaerobiosis y estimular el crecimiento de la cepa probiótica. Para preparar los correspondientes medios sólidos se agregó, a los medios líquidos, 1,5% (p/v) de agar. En todos los casos el pH se ajustó a 7. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La inulina GR y las extraídas de topinambur se esterilizaron por exposición a luz UV (40W) durante 15 min, antes de su adición a los medios de cultivo correspondientes, previamente autoclavados y atemperados. Las cepas de *L. paracasei* fueron inoculadas en caldo MRS-Basal, como control negativo (sin fuente de carbono). Los controles positivos fueron MRS-Basal+1% de glucosa (fuente de carbono óptima) y MRS-Basal+1% de inulina GR (prebiótico de referencia).

### **Ensayos de actividad prebiótica frente a *L. paracasei***

**Recuento en placa (UFC/mL):** Se evaluó el crecimiento de *L. paracasei* en medio MRS-Basal con glucosa, inulina GR comercial e inulina de topinambur de diferentes DPn, como únicas fuentes de carbono, como así también en medio sin carbohidrato fermentable. En cada caso, los medios de MRS agar en placas de Petri se sembraron en superficie con 50 µL de las diluciones de sus respectivos cultivos ON. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 37 °C por 48 h. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los valores de recuento en placa fueron utilizados para el cálculo de una tasa de crecimiento relativa a glucosa, según la siguiente expresión:

$$TC = \frac{\text{Log} (UFC \text{ mL}^{-1})_{\text{preb},t} - \text{Log} (UFC \text{ mL}^{-1})_{\text{preb},0}}{\text{Log} (UFC \text{ mL}^{-1})_{\text{glu},t} - \text{Log} (UFC \text{ mL}^{-1})_{\text{glu},0}} \quad (6)$$

donde:

$(\text{UFCmL}^{-1})_{\text{preb, t}}$  y  $(\text{UFC mL}^{-1})_{\text{preb, 0}}$ : Unidades formadoras de colonias de *L. paracasei* por mL de medio MRS-Basal + 1% de inulina al tiempo t y 0, respectivamente.

$(\text{UFCmL}^{-1})_{\text{glu, t}}$  y  $(\text{UFC mL}^{-1})_{\text{glu, 0}}$ : Unidades formadoras de colonias de *L. paracasei* por mL de medio MRS-Basal + 1% de glucosa al tiempo t y 0, respectivamente.

**pH y acidificación de la cepa:** La producción de ácido y el pH se evaluaron durante las 24 h de incubación, sin agitación. A distintos tiempos, se extrajeron alícuotas de las muestras (2 mL) para medir su pH con pHmetro HI 2211 (HANNA, EE.UU.). Posteriormente, cada muestra se diluyó con un volumen igual de agua destilada y se tituló frente a NaOH 0,11M, utilizando fenolftaleína como indicador. Finalmente se calculó el porcentaje de ácido láctico (% AL) según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ AL} = \{ \text{volumen NaOH (mL)} \times 0.11\text{M} \times 90 \text{ g mol}^{-1} \times 100 \} / \{ 2 \times 1000 \} \quad (5)$$

Donde:  $90 \text{ g mol}^{-1}$  corresponde al peso molecular del ácido láctico.

### **Análisis Estadístico**

Todos los resultados fueron expresados como valor medio y desvío estándar e interpretados por un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las muestras se determinaron con el test LSD de Fisher, utilizando Infostat versión 2011.

## **Resultados y Discusión**

### **Grado de Polimerización**

El  $\text{DP}_n$ , calculado para cada inulina extraída de tubérculos de topinambur con diferentes tiempos de almacenamiento, se muestra en la **Tabla 1**.

Tiempo de almacenamiento de (meses)	Grado de polimerización promedio ( $\text{DP}_n$ )
0	$12.08 \pm 0.87^a$
2	$9.77 \pm 0.96^b$
4	$9.16 \pm 0.31^{b,c}$
8	$8.31 \pm 0.20^c$

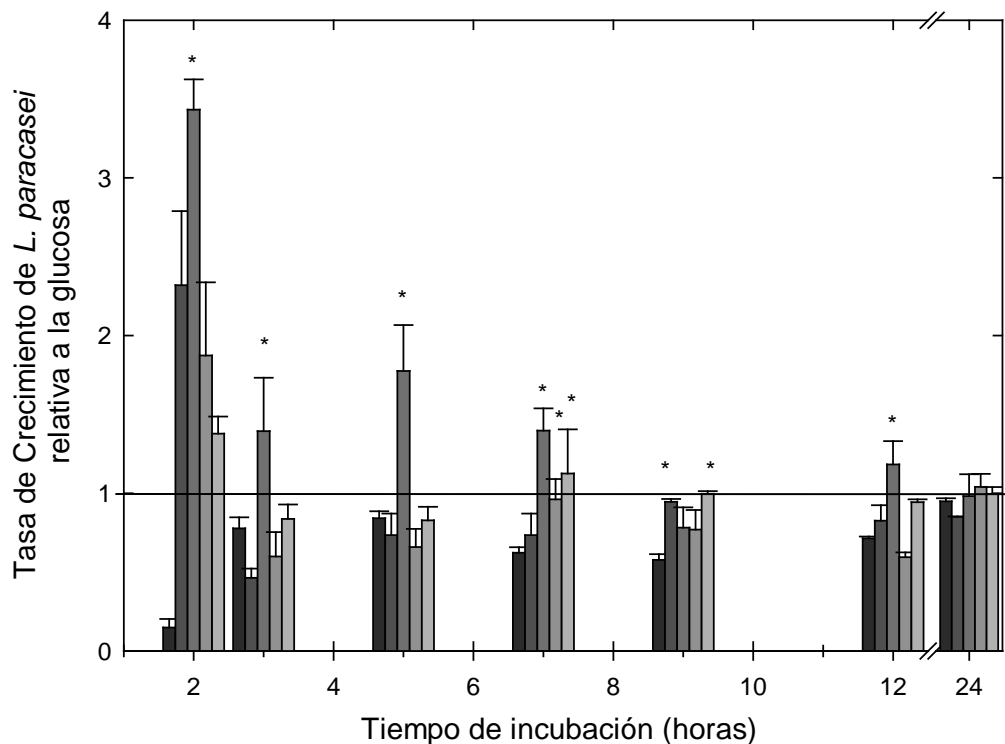
**Tabla 1.** Grado de polimerización promedio ( $\text{DP}_n$ ) de la inulina extraída de tubérculos de topinambur almacenado por diferentes períodos. Los valores representan las medias  $\pm$  SD (n=3).

Letras diferentes indican diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ .

En general, se manifestó un decrecimiento significativo en los valores de  $\text{DP}_n$  con el tiempo, evidenciando que la distribución de pesos moleculares de las cadenas de inulina presentes varía durante el almacenamiento de los tubérculos.

### **Ensayos de actividad prebiótica in vitro frente a *L. paracasei***

La **Figura 1** muestra la tasa de crecimiento (TC) relativa a glucosa de *L. paracasei* a distintos tiempos de cultivo, durante 24 h en agar MRS-Basal+1% de inulina de topinambur con diferentes  $\text{DP}_n$ .



**Figura 1.** Tasa de Crecimiento de *Lactobacillus paracasei* relativa a glucosa en función del tiempo de incubación en anaerobiosis a 37 °C durante 24 h en MRS Inulina 0 (■), Inulina 2 (▒), Inulina 4 (▓), Inulina 8 (◻), inulina GR (◻). Los valores fueron expresados como los promedios ± SD (n=3). Las diferencias significativas (p < 0,05) entre los cultivos se indican con un asterisco (\*).

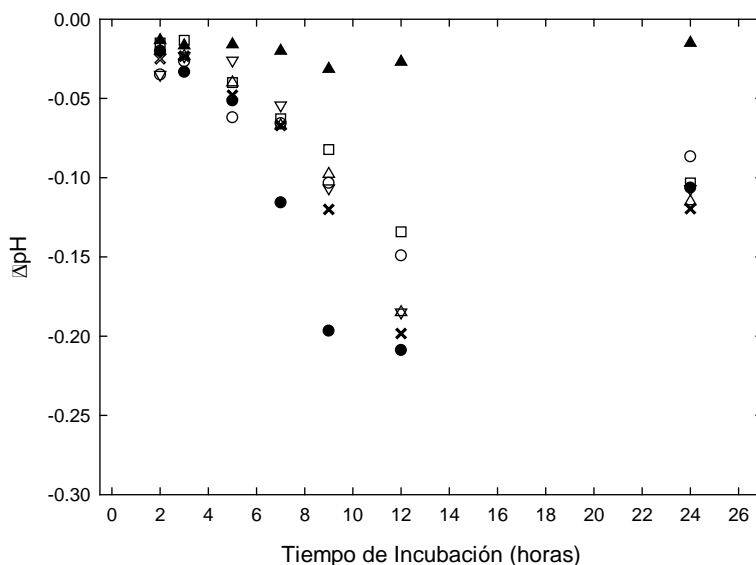
El análisis de la **Figura 1** permite establecer que, a excepción de la Inulina 0 (DP<sub>n</sub> 12), todas las inulinas ensayadas, incluyendo la comercial (DP<sub>n</sub> 10) fueron utilizadas por el probiótico con una eficiencia similar o superior a la glucosa, a partir de las 2 horas de crecimiento. De todas las inulinas ensayadas, la Inulina 4 (DP<sub>n</sub> 9) fue la que produjo la máxima tasa de crecimiento relativa a la glucosa, durante todo el período de incubación. Además, la Inulina 0 (DP<sub>n</sub> 12) fue la que exhibió las menores tasas de crecimiento relativas a la glucosa, lo que indicaría una menor fermentabilidad de este carbohidrato por parte de *L. paracasei*. Este resultado puede interpretarse considerando que la susceptibilidad de los fructanos a la fermentación está determinada por su estructura química y su DP (Biedrzycka y Bielecka 2004). Dandan *et al.* (2008) y Huebner *et al.* (2007) observaron, mediante estudios *in vitro*, mayores tasas de crecimiento de bifidobacterias cuando se utilizaba como sustratos FOS o inulina de cadena corta, comparadas con las obtenidas con inulina de cadena larga. Algunos autores demostraron que la inulina de DP<sub>n</sub> >10 resultó ser menos o más lentamente degradada por bifidobacterias que las de cadena más corta (6 < DP<sub>n</sub> < 10) (McKellar y Modler 1989, Kaplan y Hutkins 2000). El análisis estadístico de las tasas de crecimiento de *L. paracasei* obtenidas en el presente trabajo indica que la inulina de DP<sub>n</sub> 9 resultó ser una fuente de C tan eficiente como la glucosa, para este probiótico.

### pH

El pH del medio disminuye como consecuencia de la producción de ácido láctico proveniente de la fermentación de carbohidratos por parte de *L. paracasei*. En la **Figura 2** se muestra la variación del pH de los distintos medios de cultivo en función del tiempo de incubación del microorganismo. Se observó que el pH del medio MRS basal prácticamente no varió a lo largo de todo el período de incubación estudiado (24 h). En todos los medios el pH se mantuvo prácticamente constante en las primeras horas y luego de 4 horas se presentaron variaciones en los valores de pH que se ampliaron hasta las 12 horas de incubación. A las 24 horas se observa un ascenso de pH,



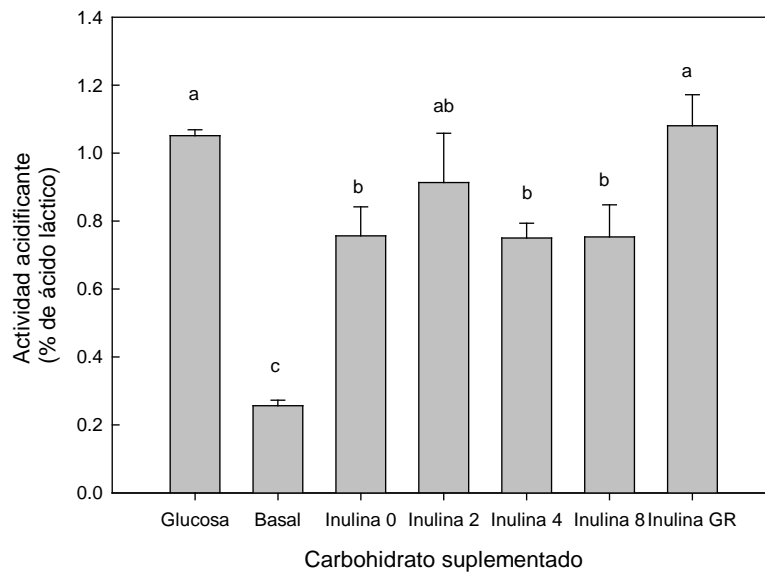
como consecuencia de los procesos bioquímicos que se producen en las etapas de crecimiento avanzado y/o de muerte del microorganismo. Se observó, además, que la magnitud de variación del pH en los medios MRS conteniendo inulina de topinambur fue similar en todos los casos, durante todo el período de incubación. A su vez, la variación de pH en éstos medios fue comparable a la registrada en el caso de MRS suplementado con inulina de achicoria. Al comparar los MRS suplementados con inulina con el MRS+glucosa se observó que éste último mostró un descenso de pH significativamente mayor entre las 5 y 9 horas de incubación, mientras que a las 12 horas, los descensos de pH en estos medios no presentaron diferencias significativas.



**Figura 2.** Variación de pH ( $\Delta\text{pH} = \text{pH}_t - \text{pH}_0$ ) del medio MRS con: Inulina 0 (▲), Inulina 2 (▽), Inulina 4 (○), Inulina 8 (□), inulina GR (X), MRS glucosa (●) al 1%; y MRS basal (▲) en función del tiempo de incubación en anaerobiosis a 37 °C de *Lactobacillus paracasei*. El valor representado resultó del promedio de tres determinaciones independientes. Para mayor claridad, no se muestran las barras de error.

### Actividad acidificante

En la **Figura 3** se muestra la acidez total, expresada como % (p/v) de ácido láctico, de los distintos medios a las 24 h de cultivo de *L. paracasei*. Se observó que los medios de cultivo MRS con inulina de topinambur de diferente grado de polimerización, no presentaron diferencias significativas en el contenido de ácido láctico. Al comparar el porcentaje de ácido láctico producido a las 24 horas de incubación de *L. paracasei* en caldo MRS + Inulina de achicoria GR frente a los de MRS suplementados con inulina de topinambur se evidenciaron porcentajes significativamente menores, para las inulinas correspondientes a los estadios de almacenamiento 0 ( $\text{DP}_n$  12), 4 ( $\text{DP}_n$  9,2) y 8 ( $\text{DP}_n$  8,3); mientras que la inulina 2 ( $\text{DP}_n$  9,8) no presentó diferencias significativas y alcanzó valores semejantes a los obtenidos en MRS glucosa.



**Figura 3.** Actividad acidificante del *Lactobacillus paracasei* a las 24 horas de incubación en anaerobiosis a 37 °C en medio MRS basal, enriquecido con glucosa o inulina al 1%. Los valores fueron expresados como los promedios  $\pm$  SD (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas con  $p < 0,05$ .

### Conclusión

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que, independientemente del DP<sub>n</sub>, todas las inulinas fueron fermentadas por el *Lactobacillus paracasei*, siendo la inulina con DP<sub>n</sub> 9 (extraída de tubérculos almacenados durante 4 meses) la que presentó las mayores tasas de crecimiento, comparables a las obtenidas con glucosa e inulina comercial de achicoria (DP<sub>n</sub> 10). Este resultado indicaría que hay un DP<sub>n</sub> óptimo de inulina que promueve en mayor medida el crecimiento del microorganismo probiótico. Los resultados obtenidos en el presente estudio contribuyen a considerar al topinambur como una fuente potencial de un ingrediente bioactivo para la elaboración de alimentos funcionales, equivalente a la inulina actualmente disponible en el mercado. También se aportó información sobre la influencia del tiempo de almacenamiento de tubérculos de topinambur sobre las propiedades prebióticas de la inulina extraída.

### Referencias:

- Baldini M, Danuso F, Turi M, Vannozzi G. 2004. Evaluation of new clones of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for inulin and sugar yield from stalks and tubers. *Journal Industrial crops and products*, 19: 25-40.
- Biedrzycka E, Bielecka M. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 170-175.
- Coudray C, Bellanger J, Castiglia-Delavaud C, Remesy C, Vermorel M, Rayssiguier Y. 1997. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Journal Clinical Nutrition*, 51: 375-380.
- Coussement P. 1999. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status. *Journal of Nutrition*, 129: 1412-1417.
- Dandan L, Kim J M, Zhengyu J, Jie Z. 2008. Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock. *Anaerobe Food microbiology*, 14: 29-34.
- Durieux, A, Fougnes C, Jacobs H, Simon JP. 2001. Metabolism of chicory fructooligosaccharides by bifidobacteria. *Journal Biotechnology*, 23: 1523 -1527.



- Ernst, MN, Chatterton J. 1996. Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae, *Journal New Phytological*, 132: 63-66.
- Gibson, GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal Nutrition*, 125: 1401-1412.
- Gibson, GR. 1998. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *Br Journal Nutrition*, 80: 209-212.
- Huebner, J, Wehling RL, Hutkins RW. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. *Journal International Dairy*, 17: 770-775.
- Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and lactobacilli. *Applied Environ Microbiology*, 66: 2682-2684.
- Kocsis L, Liebhard P, Praznik W. 2007. Effect of Seasonal Changes on Content and Profile of Soluble Carbohydrates in Tubers of Different Varieties of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), *Journal Agric. Food Chemical*, 55: 9401-9408.
- Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal Applied Microbiology*, 98: 1303-1315.
- Lopez -Molina D, Navarro-Martínez MD, Rojas Melgarejo F, Hiner ANP, Chazarra S, Rodríguez-Lopez JN. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal Phytochemistry* 66: 1476-1484.
- Macfarlane GT, Rombeau J, Cummings JH, Sakata T. 1991. Fermentation reactions in the large intestine. In *Short Chain Fatty Acids, Metabolism and Clinical Importance*. Ross Laboratories Press. Research Conference, Meija-Seika Publications, 63-72.
- Madrigal L, Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales, 57: 387-396.
- McKellar RC, Modler HW. 1989. Metabolism of fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. *Applied Microbiological Biotechnology*, 31: 537-41.
- Menne E, Guggenbuhl N, Roberfroid M. 2000. Human Nutrition and Metabolism—Research Communication. Fn-type Chicory Inulin Hydrolysate has a Prebiotic Effect in Humans. *Journal of Nutrition* pp. 1197-1199.
- Narinder K y Gupta AK. 2002. Review Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27: 703-714.
- Niness, KR. 1999. Inulin and oligofructose: what are they? *Journal Nutrition*, 129: 1402-1406.
- Palframan R, Gibson GR, Rastall RA. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Lett Applied Microbiology*, 37: 281-284.
- Perrin S, Warchol M, Grill JP, Schneider F. 2001. Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *Journal Application. Microbiology*, 90: 859-865.
- Pollock C, Cairns A. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals, *Plant Physiol. Plan Mol Biologcal*, 42: 77-101.
- Pompei A, Cordisco L, Raimondi S, Amaretti A, Pagnoni UM, Matteuzzi D, Rossi M. 2008. In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe Physiology and microbial chemistry*, 14: 280-286.
- Raso E. 1990. Jerusalem artichoke. Effect of nitrogen-potassium fertilizing, *Terra e Sole*, 45: 431-433.
- Rastall RA, Maitin V. 2002. Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol*, 13: 490-496.
- Rébora C. 2008. Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.): usos, cultivo y potencialidad en la región de Cuyo, *Horticultura Argentina*, 27: 30-37.
- Roberfroid MB. 1993. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Review. Journal Food Science*, 33: 103-148.
- Roberfroid, MB, Jan AE, Van Loo, Gibson GR. 1998. The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *Journal American Society for Nutritional Sciences*.

- Rossi M, Corradini C, Amaretti A, Nicolini M, Pompei A, Zanoni S. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides, inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure, fecal cultures. *Application Environmental Microbiology*, 71: 6150-6158.
- Rumessen JJ, Bode S, Hamberg O, Gudmand Hoyer E. 1990. Fructans from Jerusalem artichokes-intestinal transport, absorption, fermentation and influence on blood glucose, insulin and C-peptide response in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 5: 675-681.
- Rutherford PP, Weston EW. 1968. Carbohydrate changes during cold storage of some inulin-containing roots and tubers, *Journal Phytochemistry*, 7: 175-180.
- Saengthongpinit W, Sajjaanantakul T. 2005. Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Journal Postharvest Biology and Technology*, 37: 93-100.
- Tancrede C. 1992. Role of human microflora in health and disease. *Eur Journal Clinical Microbiology Infect Dis*, 11: 1012-1015.
- van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. 2007. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of Application Microbiology*, 102 : 452-460.
- Van der Meulen R, Avonts L, De Vuyst L. 2004. Short Fractions of Oligofructose Are Preferentially Metabolized by *Bifidobacterium animalis*. *Journal of Application Environ Microbiology*, 70: 1923-1930.
- Wang, X., Gibson, G.R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal Appl. Bacteriologycal* , 75: 373-380.

### **Agradecimientos**

Los autores agradecen a la UNCPBA y a ANPCyT por apoyo financiero a la becaria Irene Rubel, y agradecen a la Lic. María Inés Palacio por su apoyo técnico.