

INVESTIGACIONES EN FACULTADES DE INGENIERÍA DEL NOA



Universidad Nacional de Salta
**FACULTAD DE
INGENIERIA**



FACULTAD DE
CIENCIAS FORESTALES
Ing. Néstor René Ledesma

INVESTIGACIONES EN FACULTADES DE
INGENIERIA DEL NOA
ISSN: 1853-6662

PROPIEDAD:

Esta publicación es propiedad del
Consejo de Decanos de Ingeniería del
NOA (CODINOA)

PUBLICACIÓN Y COMPAGINACIÓN:

Facultad de Ingeniería – Universidad
Nacional de Salta.
Avenida Bolivia N° 5150
Salta (4400) – SALTA –
REPÚBLICA ARGENTINA

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN:

Delicia Ester Acosta
Ricardo Daniel Quinteros
Walter Orlando Vaca

Autoridades

Facultad de Tecnología y Ciencias Aplicadas - Universidad Nacional de Catamarca
Ingeniero Agrimensor Carlos Humberto Savio

Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional de Jujuy
Ingeniero Informático Luis Alejandro Vargas

Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional de Salta
Ingeniero en Construcciones Héctor Raúl Casado

Facultad de Ciencias Exactas y Tecnologías - Universidad Nacional de Santiago del Estero
Ingeniero Vial Pedro Juvenal Basualdo

Facultad de Agronomía y Agroindustrias - Universidad Nacional de Santiago del Estero
Doctora Ingeniera en Industrias Agrícolas y Alimentarias Myriam Elizabeth Villarreal

Facultad de Ciencias Forestales - Universidad Nacional de Santiago del Estero
Doctor Ingeniero en Industrias Forestales Juan Carlos Medina

Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología - Universidad Nacional de Tucumán
Doctor Ingeniero Electricista Miguel Ángel Cabrera

3

Editor General

Quinteros, Ricardo Daniel

Comité Editorial

Dra María Soledad Vicente (UNSa)

Dr. Ricardo Daniel Quinteros (UNSa)

Dra. Delicia Ester Acosta (UNSa)

Sr. Walter Orlando Vaca (UNSa)

Efecto de prebióticos comerciales sobre el crecimiento de la cepa probiótica *Limosilactobacillus reuteri* CRL 1098

Gómez, Jorge N.^{1,2}; Sosa, Andrea¹; Ledesma, Ana E.^{1,3}; Taranto, María P⁴ y Bustos, Ana Y.^{1,2}

(1) Centro de Investigación en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL-UNSE CONICET). RN 9- Km 1125, (4206) Santiago del Estero, Argentina.

nicolasgoib@gmail.com; amsosa2288@gmail.com; analedesma@yahoo.com.ar;

Abustos@uspt.edu.ar

(2) Facultad de Agronomía y Agroindustrias (FAyA), Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano Sur 1912, (4200) Santiago del Estero, Argentina.

(3) Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnologías Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano Sur 1912, (4200) Santiago del Estero, Argentina.

(4) Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET). C. Batalla de Chacabuco 145 Sur, T4000 Tucumán, Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de la cepa probiótica *Limosilactobacillus (L.) reuteri* CRL 1098 de metabolizar diferentes prebióticos comerciales. Además, se estudió el efecto de la suplementación en medio de cultivo MRS con dichos prebióticos a diferentes concentraciones finales (0,5; 1,0 y 2,0% p/v). Los prebióticos empleados fueron lactulosa e inulinas con distinto grado de polimerización. Nuestros resultados muestran que la cepa no fue capaz de crecer en ausencia de una fuente de carbono. Sin embargo, fue capaz de metabolizar fructooligosacáridos, todas las inulinas empleadas y lactulosa. Por otra parte, cuando los prebióticos se agregaron como aditivos, la inulina HP (de alta pureza y de alto grado de polimerización) y la lactulosa, mejoraron el crecimiento de la cepa con respecto al control en caldo MRS, en las tres concentraciones mencionadas. Estos resultados nos permiten profundizar en el estudio del metabolismo de prebióticos por cepas de bacterias lácticas (BL) y representan las bases para el diseño de alimentos simbióticos.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the ability of the probiotic strain *Limosilactobacillus (L.) reuteri* CRL 1098 to metabolize different commercial prebiotics. In addition, the effect of supplementation in MRS culture medium with said prebiotics at different final concentrations (0.5, 1.0 and 2.0% w/v) was studied. The prebiotics used were lactulose and inulins with different polymerization degrees. Our results show that the strain was not able to grow in the absence of a carbon source. However, it was able to metabolize fructooligosaccharides, all the inulins assayed and lactulose. On the other hand, when prebiotics were added, the HP inulin (of high purity and high degree of polymerization) and the lactulose, improved the growth of the strain with respect to the growth in MRS broth control, at the three mentioned concentrations. These results allow us to deepen the study of the metabolism of prebiotics by lactic acid bacteria (BL) strains and represent the basis for the design of symbiotic foods.

Palabras claves: Bacterias lácticas-probióticos-prebióticos.

Keywords: Lactic acid bacteria-probiotics-prebiotics.

1. INTRODUCCIÓN

Los prebióticos se definen como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del huésped y que confiere un beneficio para la salud” (Gibson et al., 2017). Entre los microbios intestinales que pueden metabolizar oligosacáridos prebióticos se encuentran las bacterias lácticas (BL) (Endo et al., 2016). Actualmente, en el mercado se ofrece una amplia gama de prebióticos de variada composición, tales como fructanos tipo inulina y fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), lactulosa y oligosacáridos de leche humana (HMO) (Sabater Sánchez, 2015). Sin embargo, a pesar de su importancia, en la actualidad no ha sido estudiado con profundidad el metabolismo prebiótico en cepas de BAL. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de la cepa probiótica *L. reuteri* CRL 1098 de metabolizar diferentes prebióticos comerciales. Además, se estudió el efecto de la suplementación con dichos prebióticos a diferentes concentraciones, sobre el crecimiento del probiótico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa *L. reuteri* CRL 1098 perteneciente a la colección de cultivos del Centro de Referencias para lactobacilos (CERELA-CONICET). Esta cepa acredita propiedades probióticas asociadas a su potencial para reducir el colesterol sérico, además de efecto inmunoestimulante y capacidad de producir corrinoïdes con actividad cobalamina (Bustos, 2016). El microorganismo fue cultivado en caldo MRS a 37 °C previo a su uso en los diferentes ensayos. Se emplearon los prebióticos Inulina Orafti® GR, Inulina Orafti® HSI, inulina Orafti® HP, FOS-P95 Orafti®, gentilmente cedidos por el grupo Saporiti y lactulosa (Sigma-Aldrich). Los mismos fueron esterilizados por filtración (0,45 mm). Orafti® GR Y HSI contienen 92% y 88 de inulina, respectivamente, y un grado de polimerización (GP) ≥ 10 , mientras que HP presenta 100 % de inulina y GP ≥ 23 . FOS-P95 es una mezcla de fructooligosacáridos de cadena corta con un 95% de pureza. Adicionalmente, se

incluyó fructosa (MRS-Fru) como control para estudiar si la cepa puede crecer en presencia de esta hexosa como única fuente de carbono.

2.2 Fermentación de oligosacáridos prebióticos por *L. reuteri*

Con el fin de evaluar la capacidad de la cepa CRL 1098 de fermentar prebióticos comerciales como única fuente de carbono, un cultivo de 16 h a 37° C de la cepa se centrifugó a 5000 x g y se lavó con solución fisiológica previo a su inoculación en caldo MRS control, MRS sin glucosa, MRS sin glucosa con el agregado de los prebióticos al 2% (p/v) y MRS sin glucosa con fructosa al 2%. Los cultivos se incubaron durante 24 h a 37° C y se tomaron muestras al inicio y al final para evaluar crecimiento mediante recuento en placa. El valor obtenido es la media de al menos tres experimentos independientes.

2.3 Efecto de la suplementación del medio de cultivo con prebióticos sobre el crecimiento bacteriano

Para estudiar el efecto de la suplementación con prebióticos en el crecimiento de la cepa, la misma se inoculó en caldo MRS con y sin el agregado de distintas concentraciones (0,5%, 1,0% y 2,0%) de los prebióticos evaluados en el punto anterior. Los cultivos se incubaron durante 24 h a 37° C y se tomaron muestras periódicas para evaluar crecimiento mediante medidas de absorbancia y recuento en placa. Además, se calcularon las tasas de crecimiento (TCR) de acuerdo a la ecuación (1)

$$TCR = \frac{(P_{24} - P_0)}{(G_{24} - G_0)} \quad (1)$$

dónde: P_{24} , P_0 = UFC/mL de *L. reuteri* en presencia del prebiótico a 24 hs y tiempo inicial, respectivamente. G_{24} , G_0 = UFC/mL de *L. reuteri* en presencia de glucosa a 24 h y tiempo inicial, respectivamente. (Watson. 2013). Un valor de $TCR = 1$ indica que no hay diferencias respecto del crecimiento en medio con glucosa, mientras que un valor de $TCR < 1$ indica menor crecimiento respecto del control con glucosa y $TCR > 1$ indica un efecto estimulante del crecimiento de la cepa en comparación con la glucosa como fuente de carbono (Rubel y col., 2014).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Fermentación de oligosacáridos prebióticos por *L. reuteri*

En la tabla 1 se muestra el crecimiento de la cepa *L. reuteri* en caldo MRS control, sin glucosa y con fructosa o diferentes prebióticos como única fuente de carbono. Los valores corresponden a las medias de tres experimentos independientes \pm desviación estándar. Los deltas se calcularon como la diferencia entre Log UFC/mL a t_{24} y t_0 h, el recuento inicial correspondió a $6,90 \pm 0,31$ Log UFC/mL. Diferentes letras dentro de las columnas indican diferencias significativas para un valor de $p < 0.05$ respecto del MRS (control).

Tabla 1. Crecimiento de la cepa *L. reuteri* CRL 1098 en medios MRS sin glucosa, MRS control y MRS con prebióticos al 2,0 % como única fuente de carbono.

	Δ Log UFC/mL
MRS (sin glucosa)	$0,11 \pm 0,31^C$
MRS control	$2,31 \pm 0,14^A$
MRS-GR	$1,64 \pm 0,17^B$
MRS-HSI	$1,68 \pm 0,11^B$
MRS-HP	$2,50 \pm 0,21^A$
MRS-FOS	$2,50 \pm 0,11^A$
MRS-fru	$2,36 \pm 0,16^A$
MRS-L	$2,43 \pm 0,12^A$

Los resultados muestran que la cepa no fue capaz de crecer en un medio sin una fuente de carbono (MRS sin glucosa), ya que no existen diferencias significativas en los recuentos de colonias comparados con el inóculo inicial (valor- $p > 0,05$). Por otra parte, en presencia de los prebióticos y fructosa propuestos como fuente de carbono se observa un crecimiento significativo (valor- $p < 0,05$) luego de 24 h de incubación, el cual fue dependiente del sacárido añadido. En presencia de oligofructosa FOS-P95, inulina HP y lactulosa, se observa un crecimiento comparable con el MRS control con glucosa. En presencia de inulinas de bajo GP (GR y HSI), el crecimiento es menor que en el MRS control (valor- $p > 0,05$). Además, la cepa presenta la capacidad de usar la fructosa como fuente de carbono. Es importante destacar que Ortiz, (2014) reportó que la cepa *L. reuteri* CRL 1101 no presentó crecimiento en

medio MRS con fructosa como única fuente de carbono.

En la figura 1 se observan las TCR luego de la incubación por 24 h en los medios de cultivo con los carbohidratos prebióticos mencionados anteriormente, en comparación con el crecimiento en medio MRS (con glucosa como fuente de carbono). Se observa que las TCR para la inulina HP, FOS-P95, fructosa y lactulosa presentan un valor > 1 y no difieren significativamente entre estas (valor- $p < 0,05$) luego de la incubación por 24 h. Por otro lado, los valores de TCR < 1 correspondientes a inulina GR y HSI sugieren que la cepa fermenta estos prebióticos con menor eficiencia que la glucosa. Se ha sugerido que el crecimiento y la viabilidad de los cultivos probióticos en presencia de un sustrato prebiótico depende tanto de la cepa probiótica considerada como del grado de polimerización del prebiótico (Palacio, 2015).

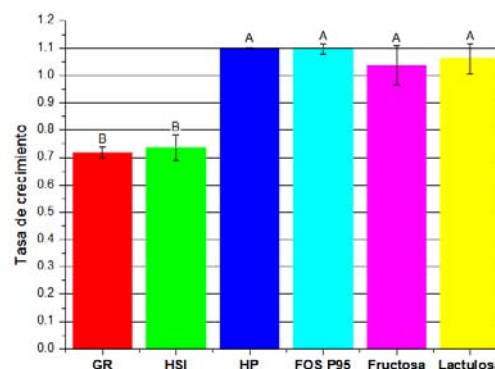


Figura 1. Tasa de crecimiento de *L. reuteri* CRL 1098 relativa a la glucosa en los distintos medios durante 24 h de incubación en microaerofilia a 37° C. Letras diferentes indican diferencias significativas (valor- $p < 0,05$).

En este sentido, Watson et al., (2013) evaluaron el crecimiento de distintas cepas del género *Lactobacillus* en medio MRS con distintos carbohidratos prebióticos como única fuente de carbono/energía, donde se observó perfiles de crecimiento diferenciados según el género estudiado. En general, los datos de crecimiento *in vitro* obtenidos por este autor, muestran que FOS, FOS/inulina e inulina resultaron sustratos de crecimiento bastante pobres para la mayoría de los lactobacilos ensayados. Por el contrario, la lactulosa, permitió crecimientos de intermedios a buenos, para quince de sesenta y cinco de las

cepas lácticas ensayadas. En particular, las cuatro cepas de *L. reuteri* (antes *Lactobacillus reuteri*), ATCC 55730, DSM 17938, DSM 20016 y DSM 20053 presentaron buen desarrollo microbiano en el medio MRS convencional y con lactulosa con DO_{600nm} final $>$ a 0,8, lo que coincide con nuestros hallazgos. Para FOS las cepas mostraron un ligero crecimiento con DO_{600nm} finales entre 0,3-0,5, excepto la cepa DSM20053 que no presentó desarrollo. De manera remarcable, ninguna de las cepas de *L. reuteri* evaluadas por Watson et al., (2013) presentó crecimiento en inulina HP, mientras que nuestros resultados muestran buen desarrollo de la cepa CRL 1098 en presencia de este prebiótico.

3.2 Efecto de suplementación del medio de cultivo con prebióticos sobre el crecimiento bacteriano

En esta etapa, nos propusimos evaluar si el agregado de prebióticos comerciales al medio de cultivo convencional, era capaz de potenciar el crecimiento de *L. reuteri* CRL 1098. En la figura 2, se muestran las curvas de crecimiento obtenidas en medio MRS y adicionado con prebióticos comerciales a diferentes concentraciones. En la tabla 2 se muestran los recuentos de colonias luego de 24 h de incubación, expresados como Log UFC/mL.

En todos los ensayos, se observa una curva de tipo sigmoidea lo que coincide con el crecimiento bacteriano teórico. En fase exponencial de crecimiento (hasta 5 h de incubación) no se observan diferencias significativas con respecto al control, excepto cuando se agregó lactulosa al medio de cultivo (valor- $p >$ 0,05) (Figura 2). En fase estacionaria de crecimiento (16 h) se observa una diferencia con respecto al control (valor- $p <$ 0,05) para los prebióticos inulina HP y lactulosa, sin diferencias entre las tres concentraciones evaluadas. Las inulinas GR y HSI no mostraron diferencias respecto del MRS control, excepto para MRS-GR al 2,0 % (valor- $p <$ 0,05). A 24 h de incubación se mantienen las diferencias en el crecimiento entre inulina HP y lactulosa, con respecto al control MRS. Similares resultados, se observaron para inulina GR y HSI, sin diferencias significativas entre estos prebióticos y el control.

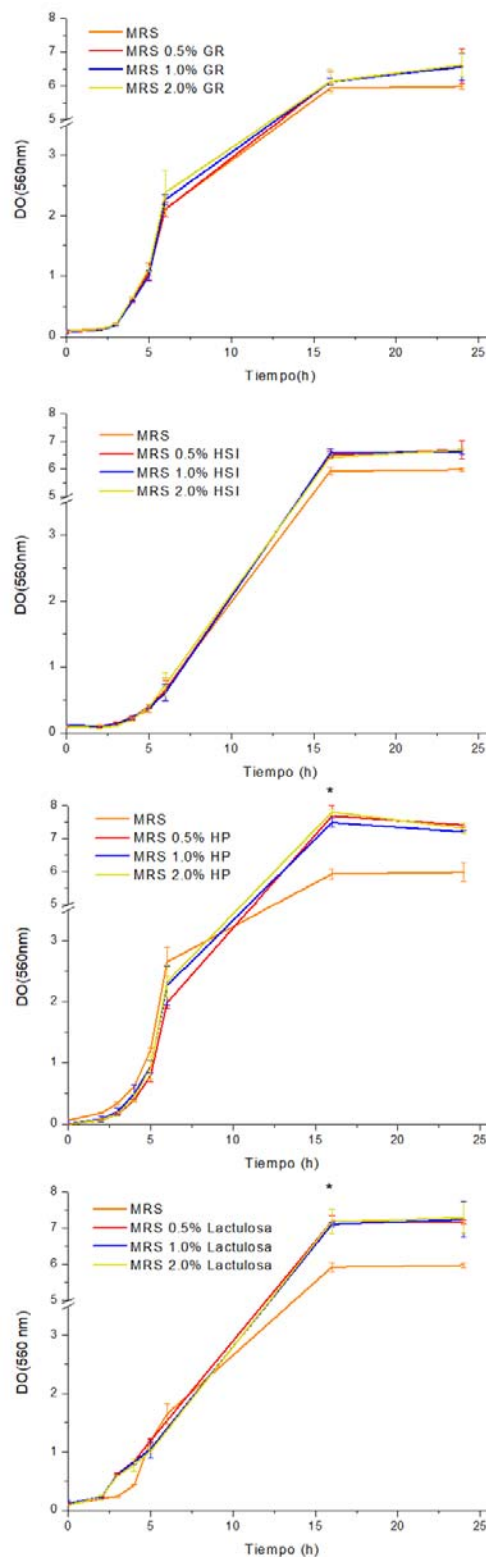


Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa CRL 1098 en medio MRS (color naranja),

suplementado con prebióticos a distintas concentraciones (0,5 % líneas rojas, 1,0 % azules y 2,0 % amarillas). El símbolo “*” en la gráfica significa que existe diferencia significativa entre los ensayos de suplementación y el control MRS (valor- $p < 0,05$).

Tabla 2. Crecimiento de *L. reuteri* CRL 1098 en MRS control y MRS suplementado con prebióticos a distintas concentraciones después de 24 h de incubación.

	Inulina GR	Inulina HSI	Inulina HP	Lactulosa
Control MRS	9,26 ± 0,14 ^A	9,26 ± 0,14 ^A	9,26 ± 0,14 ^A	9,26 ± 0,14 ^A
MRS + 0.5% del prebiótico	9,33 ± 0,01 ^A	9,17 ± 0,07 ^A	9,34 ± 0,01 ^B	9,44 ± 0,05 ^B
MRS + 1.0% del prebiótico	9,32 ± 0,07 ^A	9,19 ± 0,13 ^A	9,39 ± 0,04 ^B	9,53 ± 0,02 ^B
MRS + 2.0% del prebiótico	9,36 ± 0,02 ^B	9,20 ± 0,08 ^A	9,41 ± 0,05 ^B	9,59 ± 0,02 ^B

Las TCR nos permiten analizar mejor los resultados obtenidos. En la figura 3 se muestran los valores obtenidos para los ensayos de suplementación. Inulina HP, GR y lactulosa muestran una TCR > 1, para las tres concentraciones ensayadas, es decir que todos los prebióticos potenciaron el crecimiento de la cepa CRL 1098, salvo la inulina HSI que no difirió significativamente del control en ninguna concentración evaluada es decir ya que se observa una TRC = 1. A la menor concentración evaluada (0,5) %, no existen diferencias significativas entre inulina GR, HP y lactulosa. En presencia de 1,0 y 2,0 % de prebióticos, la mayor TCR corresponde a la lactulosa, seguidas de las inulinas GR y HP (figura 3 B y C).

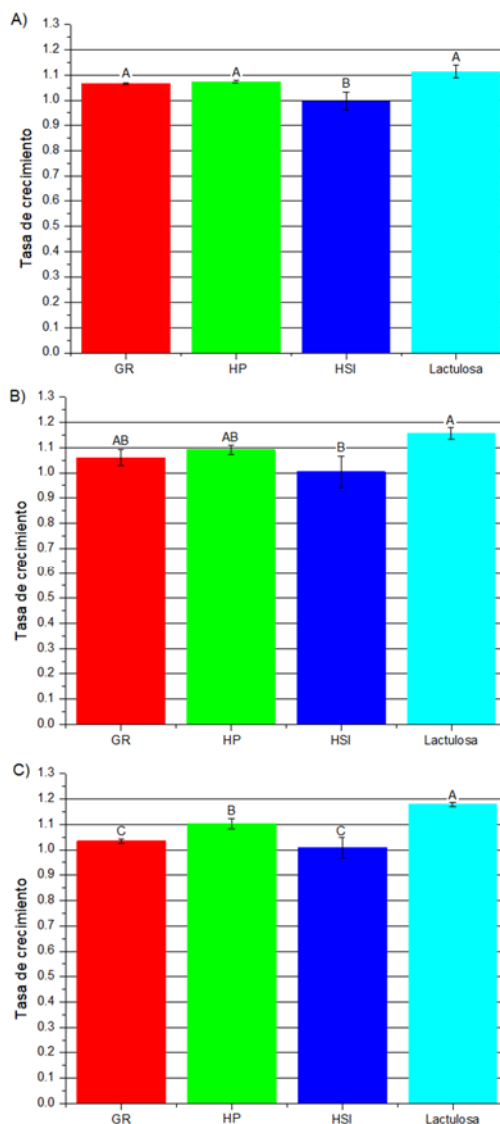


Figura 3. Tasas de crecimiento relativas para los ensayos de suplementación a distintas concentraciones. A) corresponde al 0,5 % de la suplementación, B) al 1,0 % y C) 2,0 %.

4 CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran que la cepa probiótica *L. reuteri* CRL 1098 fue capaz de crecer en presencia de todas las inulinas evaluadas y de lactulosa, observándose los mejores resultados con inulina HP, FOS-P95 y lactulosa. En efecto, se registraron los mayores valores de Log UFC/mL (9,40; 9,40 y 9,33 respectivamente).

Por otra parte, se observa que el agregado de los prebióticos inulina HP y lactulosa al medio MRS mejora el desarrollo de la cepa *L. reuteri* CRL 1098, de manera dependiente de la concentración del prebiótico, obteniéndose un mejor crecimiento con respecto a la glucosa como única fuente de carbono. Las TCR relativo demostraron que a la concentración del 2,0 % de lactulosa como suplemento mejora considerablemente el crecimiento de la cepa, difiriendo significativamente del resto de prebióticos. Estos resultados nos permiten profundizar en el estudio del metabolismo de prebióticos por cepas de bacterias lácticas y representan las bases para el diseño de alimentos sinbióticos.

5 AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (Proyecto PIP No. 11220200102036CO), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Proyecto No. 2019-01323) y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de la UNSE, CITYC-UNSE (Proyecto 23/c147) por los financiamientos otorgados.

6 REFERENCIAS

- Bustos, A. Y. Genetic Characterization and Gene Expression of Bile Salt Hydrolase (bsh) from *Lactobacillus reuteri* CRL 1098, a Probiotic Strain. *International Journal of Genomics, Proteomics, Metabolomics & Bioinformatics*, (2016). 1–8. <https://doi.org/10.19070/2577-4336-160001>
- Endo, A., Nakamura, S., Konishi, K., Nakagawa, J., & Tochio, T. Variations in prebiotic oligosaccharide fermentation by intestinal lactic acid bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, (2016). 67(2), 125–132. <https://doi.org/10.3109/09637486.2016.114709>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Sabater Sánchez, C. Síntesis e identificación de oligosacáridos derivados de lactosa y lactulosa a partir de permeado de suero de quesería. Trabajo fin de máster. Universidad autónoma de Madrid (2015).
- Ortiz, M. E. (2014). Ortiz, María Eugenia; Mozzi, Fernanda Beatriz; Raya, Raul Ricardo; Producción de manitol por bacterias lácticas; (tesis doctoral). Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.
- Palacio, M. I. (2015). Evaluación de propiedades prebióticas de α -galactósidos obtenidos de materiales vegetales y su potencial uso en la elaboración de alimentos funcionales (tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Watson, D., O'Connell Motherway, M., Schoterman, M. H. C., van Neerven, R. J. J., Nauta, A., & Van Sinderen, D. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, (2013). 114(4), 1132–1146. <https://doi.org/10.1111/jam.12105>