

Artículo científico

Evaluación del comportamiento de bacterias potencialmente probióticas en medio de cultivo suplementado con pectina cítrica

Evaluation of the behavior of potentially probiotic bacteria in culture medium supplemented with citrus pectin

E. Neme*; S. Monserrat

Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Avda. Kirchner 1900, (4000), San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. *E-mail: elineme@hotmail.com

Resumen

Las industrias alimenticia, médica y farmacéutica constantemente están buscando nuevos productos que proporcionen mayor rendimiento, menor contaminación ambiental y que a su vez sean funcionales. Entre ellos se encuentran los probióticos, prebióticos, etc. Los probióticos son microorganismos que alcanzan las zonas finales del tracto digestivo ejerciendo un efecto positivo sobre la salud del consumidor, humano o animal. Sin embargo, para que se adhieran y colonicen necesitan una dieta rica en sustratos prebióticos que generen un ambiente propicio. Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles que promueven el crecimiento y/o actividad de poblaciones bacterianas benéficas del colon. En este sentido, la capacidad prebiótica de la pectina, un complejo polisacárido presente en las plantas, es todavía muy discutida. El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de 3 cepas potencialmente probióticas en un medio suplementado con pectina cítrica. La extracción de pectina se realizó por el método de Hidrólisis Ácida, a partir de cáscaras residuales de limón: húmeda y deshidratada. Las bacterias lácticas utilizadas fueron: *Lactobacillus amylovorus* LB31; *Enterococcus faecium* C14 y *Enterococcus faecium* C38. El crecimiento bacteriano se realizó en medio de cultivo LAPTg, con y sin el agregado de pectina cítrica. Las concentraciones de pectina ensayada fueron (0,1; 0,5 y 1 %). Los resultados revelaron que las cepas evaluadas fueron capaces de crecer en todas las concentraciones de pectina cítrica experimentadas. El medio suplementado con 0,5 % de pectina obtuvo el mayor crecimiento de las 3 cepas en estudio. La cepa LB31 presentó el mayor crecimiento en dicho medio.

Palabras clave: Desarrollo; Bacterias lácticas; Pectina; Cítricos.

Abstract

The food, medical and pharmaceutical industries are constantly looking for new products that provide better performance, lower environmental pollution and that are in turn functional. Among them are probiotics, prebiotics, etc. Probiotics are microorganisms that reach the final areas of the digestive tract, exerting a positive effect on the health of the human or animal consumer. However, in order for them to adhere and colonize, they need a diet rich in prebiotic substrates that generate an enabling environment. Prebiotics are nondigestible food ingredients that promote the growth and / or activity of beneficial bacterial colon populations. In this sense, the prebiotic capacity of pectin, a polysaccharide complex present in plants, is still much discussed. The objective of this work was to evaluate the behavior of 3 potentially probiotic strains in a medium supplemented with citrus pectin. The extraction of pectin was carried out by the Acid Hydrolysis method, from residual lemon peels: wet and dehydrated. The lactic bacteria used were: *Lactobacillus amylovorus* LB31; *Enterococcus faecium* C14 and *Enterococcus faecium* C38. Bacterial growth was performed in LAPTg culture medium, with and without the addition of pectin. The pectin concentrations tested were (0.1, 0.5 and 1%). The results revealed that the strains evaluated were able to grow in all the concentrations of citric pectin experienced. The medium supplemented with 0.5% pectin obtained the highest growth of the 3 strains under study. The LB31 strain showed the highest growth in said medium.

Keywords: Growth; Lactic bacteria; Pectin; Citrus.

Recibido: 21/04/20; Aceptado: 28/06/20.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Introducción

Los probióticos se definen como ingredientes alimentarios microbianos vivos, que al ser ingeridos en cantidades suficientes, ejercen efectos benéficos sobre la salud de quien lo consume (Olagnero *et al.*, 2007). Sin embargo, para que se adhieran y colonicen, necesitan una dieta rica en sustratos prebióticos que generen un ambiente propicio.

Se entiende por prebióticos a los ingredientes alimentarios no digeribles, que promueven el crecimiento y/o actividad de poblaciones bacterianas benéficas del colon, mejorando la salud del hospedador (Boehm *et al.*, 2005). Son carbohidratos no digeridos por las enzimas estomacales, y fermentados por las bacterias benéficas presentes en el colon, actuando como sustrato de las mismas. La combinación entre probióticos y prebióticos se denomina simbiótico; dicha interacción da como resultado diversos productos finales (etanol, lactato, y ácidos grasos de cadena corta, etc.) que contribuyen al correcto mantenimiento del estado de salud del hospedador humano o animal (Meléndez Rentería *et al.*, 2011). En este sentido, existen autores que afirman que el uso de aditivos simbióticos logra más beneficios que los observados por los probióticos y prebióticos por separado. De hecho, se considera que la leche humana es un simbiótico, ya que contiene oligosacáridos (los más diversos y complejos que los encontrados en muchos otros mamíferos) y bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas, principalmente bifidobacterias, las cuales aparecen en mayor número que los lactobacilos en las heces de lactantes (Heyman y Menard, 2002; Zangeronimo *et al.*, 2011).

La importancia demostrada por los compuestos prebióticos en mantener el equilibrio de la microbiota benéfica intestinal, ha hecho que las investigaciones se abocaran a la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente prebióticos. Entre dichos compuestos se encuentra la pectina, un polisacárido estructural constituyente de la pared celular de todas las plantas superiores y de las cáscaras de sus frutos. Este polisacárido tiene como unidad monomérica al ácido D-galacturónico unido en cadenas mediante enlaces glucosídicos α -(1-4) con algunos de sus grupos carboxílicos esterificados con alcohol metílico. Hay monómeros de ramnosa insertos dentro de la cadena principal de residuos de ácido galacturónico, unidos al extremo reductor de los mismos por enlaces (1α - 2β), y

al extremo no reductor del siguiente residuo urónico por enlaces (1β - 4α). Otros monómeros serían: galactosa, arabinosa, xilosa, ácido glucurónico y fucosa (Braverman, 1952). El grado de esterificación (DE, por sus siglas en inglés) de las pectinas determina las futuras aplicaciones de las mismas y las clasifica en: pectinas de alto metoxilo (HM por sus siglas en inglés) con más del 50% de sus grupos carboxílicos esterificados con alcohol metílico y pectinas de bajo metoxilo (LM por sus siglas en inglés) con menos del 50% de sus grupos carboxílicos esterificados (Gülseren *et al.*, 2012; Ciriminna *et al.*, 2017).

Las aplicaciones de la pectina se basan en sus propiedades de agente gelificante, estabilizante y emulsificante (Bottger, 1990; Gao *et al.*, 2010). Entre ellas se pueden mencionar: elaboración de mermeladas, jaleas, dulces, aceites esenciales, mayonesas y cosméticos. Es un protector y regulador del sistema gastrointestinal, se emplea en el tratamiento de individuos hipercolesterolémicos, gastritis, úlceras, envenenamiento por metales y se está investigando su papel como prebiótico (Voragen *et al.*, 1995; Farahnaky *et al.*, 2005; Bengmark y Ortiz de Urbina, 2005; Munarin *et al.*, 2012).

Los diversos resultados obtenidos sobre el rol de la pectina como prebiótico, pueden atribuirse a distintas causas, como ser las diferentes estructuras y composiciones de las pectinas aisladas, lo que está directamente relacionado con el método de extracción de las mismas (Ptichkina *et al.*, 2008; Yapo, 2009; Ciriminna *et al.*, 2017) o la preferencia de algunas cepas probióticas por carbohidratos específicos. Se ha demostrado que el agregado de galactooligosacáridos favorece el crecimiento *in vitro* de *Bifidobacterium lactis* (Gopal *et al.*, 2001). Del mismo modo, *Bifidobacterium angulatum*, *B. infantis* y *B. adolescentis* crecen en presencia de oligosacáridos pécticos derivados de pectina de alto metoxilo (Rastall *et al.*, 2002).

De la amplia variedad de materia prima existente para la extracción de pectina, la más usada es la cáscara de los frutos cítricos, debido al rendimiento y a la calidad de la pectina obtenida (Tako *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2014).

En este sentido, se sabe que la actividad limonera en Argentina se caracteriza por poseer un dinamismo que le otorga relevancia a nivel internacional, siendo productor, procesador industrial y exportador de limón y sus derivados. El incremento del área limonera se debe a la expansión ocurrida en Tucumán, donde funcionan seis plan-

tas industrializadoras que operan como complejos integrados con elaboración de jugo concentrado, cáscara deshidratada y cáscara húmeda (Ministerio de Desarrollo Productivo, 2011; Gundlach Hayward, 2012). Parte de esta última, se usa en la alimentación animal y otra parte se dispone a cielo abierto causando contaminación del suelo y mantos freáticos. Una alternativa posible para reducir este problema sería la deshidratación de la cáscara húmeda y la consiguiente extracción de pectina en nuestra provincia, con lo que se disminuiría la contaminación ambiental provocada por la mala gestión de la cáscara húmeda residual de la industria cítrica.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de 3 cepas potencialmente probióticas (*Lactobacillus amylovorus*, cepa RRLB 31; *Enterococcus faecium*, cepa RRC14 y *Enterococcus faecium*, cepa RRC38) en un medio de cultivo suplementado con pectina cítrica como fuente de carbono.

Materiales y métodos

Materia prima para la extracción de pectina

La extracción de pectina se realizó a partir de cáscaras residuales, húmedas y deshidratadas, suministradas por las citricolas Cota Ltda. y Citrusvil Grupo Lucci. Las cáscaras fueron una mezcla de diferentes variedades de limón cosechados en la provincia de Tucumán, Argentina.

Se evaluó también, pectina cítrica comercial en polvo (Saporiti S.A. Tucumán, Argentina) caracterizada como pectina de set rápido, conteniendo ácido galacturónico (76,1 %); azúcares neutros (373 mg/g); humedad (6 %) y cenizas (3,5 %). El grado de esterificación fue lo único que se verificó en el laboratorio.

Extracción de pectina

La extracción de pectina se realizó por el método de hidrólisis ácida (Braverman, 1952). Para lo cual, se hirvió la cáscara durante 1 minuto (1 gramo de cáscara /100 mL de agua destilada) con el objetivo de inactivar enzimas y eliminar suciedades y/o microorganismos que podrían estar presentes (Devia Pineda, 2003). Luego se coló la cáscara y se mezcló con la misma cantidad de agua destilada usada inicialmente, y se agregó ácido cítrico concentrado o ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N hasta obtener un pH de 1,5. La hidrólisis

ácida se llevó a cabo durante 1 h a 80 °C. Al cabo de la cual, se filtró y el sobrenadante se precipitó con alcohol etílico (96°). Posteriormente, se filtró con un lienzo y se lavó con alcohol etílico (96°). Se eligió alcohol etílico para precipitar la pectina ya que es un proceso factible de escalar, fácil de separar del producto final y reciclable. Finalmente, se secó en estufa durante 7 h a 37 °C, se molió en molinillo para café, se envasó en frascos de plástico estériles con tapa a rosca y se almacenó a temperatura ambiente.

El rendimiento obtenido se calculó usando la siguiente fórmula:

Rendimiento de pectina = (g pectina obtenida/g cáscara procesada) x 100

Determinación del grado de esterificación de la pectina

Se preparó una suspensión de pectina al 1 % con agua destilada y se tituló con NaOH 0,1028 N utilizando fenolftaleína como indicador. La cantidad de NaOH empleada en esta titulación se denominó "A". Luego se agregaron 20 mL de NaOH 0,4715 N y se dejó en agitación suave con el fin de desesterificar completamente la pectina. Pasado este tiempo, se vertieron 20 mL de HCl 0,4809 N para neutralizar la solución; se tituló nuevamente con NaOH 0,1028 N (Schultz, 1965). Esta cantidad se denominó "B".

El grado de esterificación (DE) fue calculado con la siguiente fórmula:

$$DE = (B/A + B) \times 100$$

Donde A son los mL de NaOH utilizados en la valoración A; y B los mL de NaOH utilizados en la valoración B.

Este ensayo se realizó 3 veces y se utilizó, tanto la pectina extraída en la etapa anterior, como la pectina cítrica comercial.

Bacterias lácticas potencialmente probióticas

Las bacterias lácticas utilizadas fueron: *Lactobacillus amylovorus* LB31; *Enterococcus faecium* C14 y *Enterococcus faecium* C38. Estas fueron obtenidas mediante hisopados anales y fecales a partir de cerdos jóvenes y sanos por Ross (2010) y donadas por la Cátedra de Salud Pública de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Las tres cepas lácticas estudiadas fueron clasifi-

cadadas como “potencialmente probióticas”, ya que fueron capaces de mostrar inhibición de microorganismos patógenos, viabilidad bajo condiciones de acidez, capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, reducción de carga parasitaria en cerdos y producción de ácido linoleico conjugado (Ross, 2010).

Activación y crecimiento de las bacterias lácticas potencialmente probióticas

La activación y crecimiento de las cepas se efectuó por repiques sucesivos en medio de cultivo fresco LAPTg. El control de la pureza se realizó mediante diluciones decimales seriadas de un cultivo toda la noche, en medio LAPTg, y siembra de las diluciones adecuadas en los medios sólidos LAPTg, para cocos y MRS para lactobacilos, ya que favorece el crecimiento de lactobacilos frente al de cocos (Rivas y Garro, 2006).

Posteriormente, se quitó la glucosa del medio y se reemplazó por pectina en las siguientes concentraciones: 0,1; 0,5 y 1 %. Los medios sin glucosa y con pectina fueron llamados LAPTp 0,1 %; LAPTp 0,5 % y LAPTp 1 %, respectivamente, según la concentración del carbohidrato agregado. Las concentraciones de pectina fueron elegidas de acuerdo a Shim, (2005) y Grimoud *et al.* (2010).

La conservación de las cepas se realizó a -20°C en medio leche con extracto de levadura.

Evaluación *in vitro* del crecimiento de las bacterias lácticas en presencia de diferentes concentraciones de pectina cítrica

Para este ensayo se tomaron 3 mL de cada cepa crecida en los medios de cultivo con y sin pectina (LAPTg, LAPTp 0,1 %; LAPTp 0,5 % y LAPTp 1 %) para inocular los correspondientes bioreactores conteniendo 150 mL de medios de cultivo fresco: LAPTg; LAPTp 0,1 %; LAPTp 0,5 % y LAPTp 1 %. Finalmente, los bioreactores fueron colocados en un baño termostático a 40 rpm y 37°C .

Las curvas de crecimiento se realizaron a partir del recuento de células viables (Log UFC/mL) en el tiempo. Las mismas se realizaron bajo condiciones de asepsia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis de los datos

El análisis estadístico del rendimiento en la extracción de pectina se hizo mediante un modelo lineal general, en el que el tipo de cáscara y el ácido utilizado fueron los factores fijos. El análisis del crecimiento de las bacterias en función de las di-

ferentes concentraciones de pectina se realizó mediante un modelo lineal general donde la cepa, el medio de cultivo y el tiempo de incubación fueron los factores fijos y la densidad óptica y el recuento de células viables fueron las variables respuesta. En todos los casos, se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y heteroscedasticidad y se modeló la varianza en caso de ser necesario. Las diferencias entre medias se evaluaron mediante la prueba de Fisher con corrección de Sidak. Se utilizó la interfaz para R incluida en el programa Infostat (versión 2008 para Windows).

Resultados y discusión

Rendimiento en la extracción de pectina

La Tabla 1 muestra los promedios de los rendimientos de pectina obtenidos por hidrólisis ácida, a partir de las cáscaras húmedas y deshidratadas del limón, con ácido clorhídrico y cítrico. El modelo lineal general mostró un efecto significativo de la cáscara ($F = 20,69$; $p = 0,0019$) pero no del ácido ($F = 4,12$; $p = 0,0768$) ni de la interacción entre ambos factores ($F = 1,31$; $p = 0,2856$). La cáscara deshidratada presentó un mayor rendimiento de extracción de pectina que la cáscara húmeda.

Tabla 1. Rendimiento de pectina obtenido por hidrólisis ácida en función del ácido utilizado.

Muestra	Ácido clorhídrico	Ácido cítrico
Cáscara húmeda	30,4 ± 0,56	28,46 ± 0,13
Cáscara deshidratada	40,2 ± 1,03	34,54 ± 0,97

Los resultados mostrados representan el promedio de 3 repeticiones, expresados como la media ± DE.

Los rendimientos de pectina obtenidos fueron aceptables, según los máximos rendimientos obtenidos por Sayah *et al.* (2014) quienes evaluaron la extracción de pectina empleando diferentes pretratamientos y ácidos. Dichos autores obtuvieron valores de 40 % con ácido sulfúrico; 38,52 % con ácido cítrico; 35,34 % con ácido clorhídrico y 10,19 % con ácido acético, a partir de pieles de naranja sometidas a destilación. Bhat y Singh (2014), compararon el rendimiento de pectina extraída de la piel de la fruta tropical guayaba con ácido clorhídrico concentrado y ácido cítrico al 99,9 %, alcanzando el mayor rendimiento con HCl (16,8 %) y el menor con ácido cítrico (11,12 %). Por su parte, Wikiera *et al.* (2015) lograron mayo-

res rendimientos de pectina de manzana, usando preparados enzimáticos comerciales: Celluclast (18,95 %) y Viscoferm (17,86 %) comparados al obtenido por hidrólisis ácida (14,52 %).

Si bien no hubo efecto significativo del ácido, el mayor rendimiento observado a partir de cáscara deshidratada y ácido clorhídrico podría explicarse por la mayor concentración de pectina en la cáscara deshidratada y la mayor fuerza iónica del ácido clorhídrico, comparado con el ácido cítrico. Es importante tener en cuenta además, que la cantidad de pectina obtenida por precipitación con alcohol aumenta con la fuerza iónica del ácido (Pagán *et al.*, 1999; Bhat y Singh, 2014). A pesar de esto, el ácido cítrico, es más indicado para la extracción de pectina que el ácido clorhídrico. Esto se debe a las ventajas que presenta, ya que a diferencia del ácido clorhídrico, es un ácido orgánico y natural, considerado seguro en la industria alimenticia; es económico, no corrosivo y muestra una elevada reducción de residuos sólidos, disminuyendo la contaminación (Yapo, 2009a; Sayah *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2016). En este sentido, todas estas ventajas compensan la merma en rendimiento.

Grado de esterificación

En la Tabla 2 se presentan los resultados del grado de esterificación de la pectina cítrica extraída y comercial.

Tabla 2. Grado de esterificación (DE) de la pectina aislada del limón y la pectina cítrica comercial.

Muestra	Ácido clorhídrico	Ácido cítrico
Cáscara húmeda	69 ± 0,03	64 ± 0,05
Cáscara deshidratada	74 ± 0,01	70 ± 0,01
Pectina comercial	72 ± 0,02	71 ± 0,05

Los resultados mostrados representan el promedio de 3 repeticiones, expresados como la media ± DE.

Tanto las pectinas extraídas en el laboratorio como la pectina cítrica comercial, obtenidas con ácido cítrico y clorhídrico, presentaron más del 50 % de sus grupos carboxilos esterificados con alcohol metílico por lo que fue posible clasificarlas como pectinas de alto metoxilo.

Yapo *et al.* (2009), extrajeron pectinas de la corteza del maracuyá usando ácido cítrico y diferentes métodos de precipitación; obteniendo pectinas

de alto metoxilo (54 - 59 %) según el método de Schultz (1965). Además concluyeron que el grado de esterificación es independiente del método de precipitación empleado. Venzon *et al.* (2015) caracterizaron pectina extraída a partir de orujo de naranja (modificada y sin modificar) y pectina cítrica comercial, usando ácido cítrico y ácido nítrico; y concluyeron que las pectinas ensayadas resultaron ser de alto metoxilo. Por su parte, Oliveira *et al.* (2016) evaluaron la extracción de pectina, a partir de la piel de banana mediante hidrólisis ácida con ácido cítrico, a diferentes pH (2,0 - 4,5), temperaturas (70 - 90 °C) y tiempos de extracción (120 - 240 min); concluyendo que altas temperaturas y bajos pH aumentan el rendimiento y disminuyen el grado de metoxilación de la pectina.

Crecimiento *in vitro* de bacterias lácticas potencialmente probióticas

El análisis estadístico del recuento de células viables (log UFC/ml) en los diferentes medios de cultivo, con y sin pectina, mostró interacción significativa para cepa y tiempo así como para medio y tiempo (Tabla 3). La prueba de comparación entre pares (Fisher con corrección de Sidak) reveló que las diferencias para cepa y tiempo (agrupando medios) se registraron a las 12 h, donde la cepa LB31 tuvo valores más altos que la cepa C14 y a las 16 h, donde la cepa LB31 presentó mayores valores que las otras dos (Tabla 4, Figura 1). Para los otros tiempos, las tres cepas tuvieron el mismo comportamiento, mostrando un pico a las 8 h (Tabla 4, Figura 1). En cuanto a la interacción entre el medio y el tiempo, se observó que las diferencias entre medios se produjeron básicamente en todos los tiempos a partir de las 4 h, donde se destaca que a las 8 h LAPTp 0,5 % y LAPTg mostraron los mayores valores, luego siguió LAPTp 0, 1 % y por último LAPTp 1 % (Tabla 5, Figura 2).

Tabla 3. Resultado del modelo lineal general para el crecimiento de bacterias expresado como recuento de colonias en función de la cepa, del medio y del tiempo de incubación.

	gl	F	p
Cepa	2	30,24	< 0,0001
Medio	3	115,76	< 0,0001
Tiempo	6	773,88	< 0,0001
Cepa*Tiempo	12	1,92	0,0347
Medio*Tiempo	18	8,05	< 0,0001
Cepas*Medio	6	1,09	0,3728
Cepas*Medio*Tiempo	36	0,29	> 0,9999

Tabla 4. Valores promedio para crecimiento de bacterias, determinado por recuento de células viables (expresado como Log UFC/mL en el tiempo) para las distintas cepas y tiempos evaluados.

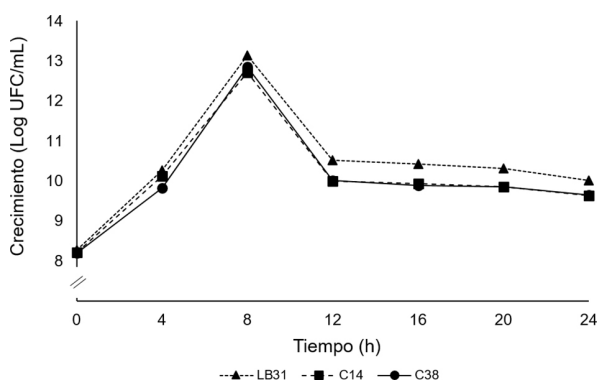
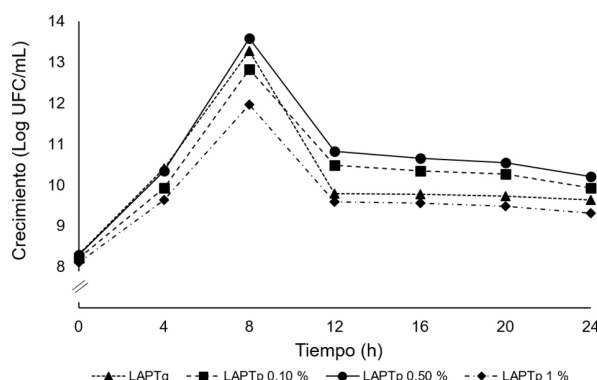
Tiempo (h)	LB31	C14	C38
0	8,28 ± 0,12 f	8,21 ± 0,05 f	8,19 ± 0,08 f
4	10,27 ± 0,12 bcd	10,13 ± 0,05 bcd	9,83 ± 0,08 de
8	13,14 ± 0,12 a	12,72 ± 0,05 a	12,86 ± 0,08 a
12	10,52 ± 0,12 b	9,99 ± 0,05 cde	10,02 ± 0,08 bcde
16	10,43 ± 0,12 bc	9,93 ± 0,05 de	9,88 ± 0,08 de
20	10,31 ± 0,12 bcd	9,86 ± 0,05 de	9,85 ± 0,08 de
24	10,02 ± 0,12 bcde	9,63 ± 0,05 e	9,65 ± 0,08 e

Las medias que se muestran corresponden a los cuatro medios agrupados. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 5. Valores promedio para crecimiento de las bacterias determinado por recuento de células viables (expresado como Log UFC/mL en el tiempo) para los distintos medios y tiempos evaluados.

Tiempo (h)	LAPTg	LAPTp 0,10 %	LAPTp 0,50 %	LAPTp 1 %
0	8,31 ± 0,1 j	8,21 ± 0,1 j	8,29 ± 0,1 j	8,1 ± 0,1 j
4	10,41 ± 0,1 def	9,92 ± 0,1 fgh	10,34 ± 0,1 def	9,64 ± 0,1 hi
8	13,27 ± 0,1 ab	12,82 ± 0,1 b	13,59 ± 0,1 a	11,96 ± 0,1 c
12	9,79 ± 0,1 ghi	10,49 ± 0,1 de	10,82 ± 0,1 d	9,59 ± 0,1 hi
16	9,77 ± 0,1 ghi	10,35 ± 0,1 def	10,65 ± 0,1 de	9,55 ± 0,1 hi
20	9,73 ± 0,1 ghi	10,27 ± 0,1 efg	10,55 ± 0,1 de	9,48 ± 0,1 hi
24	9,63 ± 0,1 hi	9,92 ± 0,1 fgh	10,2 ± 0,1 efg	9,31 ± 0,1 i

Las medias que se muestran corresponden a las tres cepas agrupadas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

**Figura 1.** Crecimiento de las cepas lácticas potencialmente probióticas (C14, C38 y LB31) determinado por recuento de células viables en el tiempo, expresado como Log UFC/mL. Se presentan los valores promedio agrupando todos los medios.**Figura 2.** Crecimiento de las cepas lácticas potencialmente probióticas (C14, C38 y LB31) determinado por recuento de células viables en el tiempo, expresado como Log UFC/mL. Se presentan los valores promedio agrupando todas las cepas.

BAL (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium bifidum*) en medio de cultivo MRS adicionado con 0,4 % de pectina (aislada a partir de diferentes frutos) comparado al obtenido por el control sin pectina. Por su parte, Míguez *et al.* (2016), demostraron el potencial prebiótico de oligosacáridos pécticos, obtenidos a partir de diferentes materias primas, para incrementar el número de bacterias benéficas en heces humanas (ensayos *in vitro*). Así mismo, Ho *et al.*, (2017), estudiaron el crecimiento de *Bifidobacterium bi-*

fidum y *Lactobacillus acidophilus* en medio MRS sin glucosa y adicionado con hidrolizados de pectina cítrica en diferentes concentraciones (1 %, 2 % y 4 %) observando mayor crecimiento en los medios con hidrolizados de pectina, comparados con el control.

Conclusiones

Fue posible extraer pectina por el método de hidrólisis ácida, a partir de residuos industriales

(cáscaras de limón húmedas y deshidratadas) logrando buenos rendimientos. Las cepas lácticas potencialmente probióticas evaluadas (*Lactobacillus amylovorus* LB31; *Enterococcus faecium*, C14 y *Enterococcus faecium*, C38) fueron capaces de crecer en los medios suplementados con pectina cítrica. Por lo tanto, dicho carbohidrato es metabolizado por las mismas. Los resultados obtenidos plantean una alternativa viable para disminuir la contaminación que generan los residuos industriales, brindando además, información para la futura elaboración del aditivo simbiótico.

Agradecimientos

Se agradece la activa colaboración del Comité Editorial quienes brindaron asesoramiento estadístico.

Referencias bibliográficas

- Ahmed M., Azad A.K.M., Ali M.A., Akter M.F., Jiur Rahman M.D. (2014). Isolation and characterization of pectin extracted from lemon pomace during ripening. *Journal of Food and Nutrition Sciences* 2 (2): 30-35.
- Bengmark S., Ortiz de Urbina J.J. (2005). Simbióticos: una nueva estrategia en el tratamiento de pacientes críticos. *Nutrición Hospitalaria* 20: 147-156.
- Bhat A.S., Singh R.Er. (2014). Extraction and characterization of pectin from guava fruit peel. *International Journal of Research in Engineering and Advanced Technology* 2 (3): 1-7.
- Boehm G., Fanaro S., Jelinek J., Stahl B., Kock R., Vigi V. (2005). Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41: 186-190.
- Bottger I. (1990). Pectin application-Some practical problems. En: *Gums and stabilisers for the food industry*. Phillips G.O., Wedlock D.J., Williams P.A. (Eds.). IRL Press Oxford. Reino Unido. Pp. 247-256.
- Braverman J.B.S. (1952). *Los Agrios y sus derivados*. Aguilar S. A., España.
- Chatterjee E., Manuel S.G.A., Hassan S. (2016). Effect of fruit pectin on growth of lactic acid bacteria. *Journal of Probiotic and Health* 4: 2.
- Ciriminna R., Fidalgo A., Delisi R., Tamburino A., Carnaroglio D., Cravotto G., Ilharco L.M., Pagliaro M. (2017). Controlling the degree of esterification of citrus pectin for demanding applications by selection of the source. *American Chemical Society Omega* 2 (11): 7991-7995.
- Devia Pineda J.E. (2003). Proceso para producir pectinas cítricas. Universidad EAFIT 129: 21-29.
- Farahnaky A., Mesbahia G., Jamaliana J. (2005). A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. *Food Hydrocolloids* 19: 731-738.
- Gao X.Z., Qiao X.L., Song W.C., Wang X.F., Liu F. (2010). Standard triple, bismuth pectin quadruple and sequential therapies for *Helicobacter pylori* eradication. *World Journal of Gastroenterology* 16 (34): 4357-4362.
- Gopal K.P., Sullivan P.A., Smart J.B. (2001). Utilization of galacto oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *International Dairy Journal* 11: 19-25.
- Grimoud J., Durand H., Courtin C., Monsan P., Ouarné F., Theodorou F., Roques C. (2010). In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. *Anaerobe* 16: 493-500.
- Gülseren I., Fang Y., Corredig M. (2012). Complexation of high methoxyl pectin with ethanol desolvated whey protein nanoparticles: physico-chemical properties and encapsulation behavior. *Food and Function* 3: 859-866.
- Gundlach Hayward M.L. (2012). El limón en Tucumán, Argentina y el mundo. Instituto de Desarrollo Productivo de Tucumán (IDEP), Argentina.
- Heyman M., Ménard S. (2002). Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59 (7): 1151.
- Ho Y.Y., Lin C.M., Wu M.C. (2017). Evaluation of the prebiotic effects of citrus pectin hydrolysate. *Journal of Food and Drug Analysis* 25: 550-558.
- Meléndez Rentería N.P., Aguilar C.N., Nevárez Moorrillón G.V., Rodríguez Herrera R. (2011). Compuestos prebióticos: de las moléculas al ser humano. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 31: 6-12.
- Míguez B., Gómez B., Gullón P., Gullón B., Alonso J.L. (2016). Pectic oligosaccharides and other emerging prebiotics. En: *Probiotics Prebiotics Human Nutrition Health*, IntechOpen. Gran Bretaña. Pp. 301-330.
- Ministerio de Desarrollo Productivo-Dirección de Programación. (2011). Tucumán centro de inversión productiva. Gobierno de Tucumán. República Argentina. En: http://www.producciontucuman.gov.ar/REVISTA%202011_web.pdf, consulta: junio 2020.
- Munarin F., Tanzi M.C., Petrini P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules* 51 (4): 681-689.
- Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genevois C., Granzella L., Montonati M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta* 25 (121): 20-33.
- Oliveira I.S., Morsyleide F.R., Cavalcante F., Pereira

- P.H.F., Graham K.M., Wellner N., Mazzetto S.E., Waldron K.W., Azeredo H.M.C. (2016). Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry* 198: 113-11.
- Pagán J., Ibarz A., Llorca M., Coll L. (1999). Quality of industrial pectin extracted from peach pomace at different pH and temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1038-1042.
- Pereira P.H.F., Oliveira T.I.S., Rosa M.F., Cavalcante F.L., Moates G.K., Wellner N., Waldron K.W., Azeredo H.M.C. (2016). Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 88: 373-379.
- Ptichkina N.M., Markina O.A., Rummyantseva G.N. (2008). Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids* 22 (1): 192-195.
- Rastall R.A., Olano-Martin E., Gibson G.R. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 93: 505-511.
- Rivas F.P., Garro O. (2006). Preparación de cultivos iniciadores. Optimización del sustrato de crecimiento. Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Noroeste, Chaco, Argentina.
- Ross G.R., Gusils C., Oliszewski R., Colombo de Holgado S., González S.N. (2010). Effects of probiotic administration in swine. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109 (6): 545-549.
- Sayah M.Y., Chabir R., El Madani N., Rodi El Kandri Y., Ouazzani Chahdi F., Touzani H., Errachidi F. (2014). Comparative study on pectin yield according to the state of the orange peels and acids used. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* 3 (8): 15658-15665.
- Schultz T. (1965). *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, EEUU.
- Shim S. (2005). Effects of prebiotics, probiotics and synbiotics in the diet of young pigs. Tesis doctoral, Wageningen University, Wageningen, Holanda. En: <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/121655>, consulta: junio 2016.
- Tako M., Tamaki Y., Konishi T., Fukuta M. (2008). Isolation and structural characterization of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. *Food Chemistry* 107: 352-361.
- Venzon S.S., Canteri M.H.G., Granato D., Junior B.D., Maciel G.M., Stafussa A.P., Haminiuk C.W.I. (2015). Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. *Journal of Food Science and Technology* 52 (7): 4102-4112.
- Voragen A.G.J., Pilnik W., Thibault J.F., Axelos M.A.V., Renart C.M.G. (1995). Pectins. En: *Food Polysaccharides and their Applications*. Stephen A.M. (Ed.). Marcel Dekker. EEUU. Pp. 287-369.
- Wikiera A., Mika M., Grabacka M. (2015). Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. *Food Hydrocolloids* 44: 156-161.
- Yapo B.M. (2009). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International* 42: 1197-1202.
- Yapo B.M. (2009a). Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57: 1572-1578.
- Zangeronimo M.G., De Souza Cantarelli V., Fialho E.T., De Oliveira Amaral N., Silveira H., De Melo Pereira L., Pereira L.J. (2011). Herbal extracts and symbiotic mixture replacing antibiotics in piglets at the initial phase. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40 (5): 1045-1051.