

Ensayos de simulación de digestión gástrica de pulpa de frambuesa fermentada con diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum*

María Isabel Luján¹; Santiago Rafael Coria¹; Victoria Kleinjan¹; Mónica Roselva Ochoa¹; Antonio De Michelis²

¹Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos - Universidad Nacional del Comahue. Villa Regina, Río Negro. Argentina.

²INTA AER El Bolsón - CONICET. El Bolsón, Río Negro. Argentina



El objetivo de este trabajo es determinar la capacidad de la pulpa de frambuesa para ser fermentada y/o constituirse en vehículo para cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum*. Se usó pulpa de frambuesa, de frutas cosechadas en El Bolsón, Patagonia Argentina. Se utilizaron dos cepas de *L. plantarum* (INLAIN 813 y 998). Las experiencias de fermentación se realizaron con 40 g de pulpa, previamente esterilizadas a 121°C durante 15 min, las cuales fueron inoculadas al 2% con los cultivos de *L. plantarum* e incubadas a 37°C en estufa de cultivo durante 24 h. La simulación gástrica se realizó a tiempo cero y luego de las 24 h de fermentación. Los resultados obtenidos permiten indicar que las pulpas utilizadas constituyen buenas matrices para la elaboración de un nuevo alimento funcional en base no láctea por fermentación con cepas de *L. plantarum*.

Resumen

Las frambuesas (*Rubus idaeus*) pertenecen al grupo de las frutas pequeñas (berries), son frutos de reducido tamaño, coloración que va del rojo oscuro al amarillo, sabor agrídulce y rápida perecibilidad. Son ricos en vitaminas C y E, carbohidratos, fibras y azúcares, siendo la Patagonia Argentina una de las zonas de producción más importante del país en este tipo de cultivares. Se consumen en fresco, como mermeladas o conservas y poseen actividad antioxidante, lo que confiere importantes efectos benéficos sobre la salud.

Algunos jugos de fruta han sido utilizados como vehículos de bacterias probióticas, por un lado para ampliar la oferta de alimentos funcionales y por otro lado para satisfacer la demanda de consumidores que no consumen lácteos (vegetarianos, lactosa intolerantes, alérgicos a proteínas lácteas o por la percepción negativa del contenido de colesterol en leche). En el país no existen antecedentes publicados sobre la factibilidad del empleo de la fruta propuesta para vehicular microorganismos probióticos.

Palabras clave: alimentos funcionales, frutas, bacterias probióticas, fermentación.

Introducción

En las últimas décadas se ha producido un cambio sustancial en la actitud frente a la alimentación. Los consumidores son conscientes de la influencia de la dieta en la modulación del riesgo de desarrollo de enfermedades y de la relación entre dieta y calidad de vida (Barrio Merino A., 2006). Los alimentos funcionales son consumidos como parte de la dieta. Además de la función nutritiva básica, se ha demostrado que presentan propiedades fisiológicas o que disminuyen el riesgo de contraer ciertas enfermedades. De forma general, se puede decir que un alimento funcional es aquel que confiere al consumidor una determinada propiedad beneficiosa para la salud, independientemente de sus propiedades nutritivas. Son alimentos convencionales, que poseen naturalmente componentes bioactivos, o a los que se le ha añadido (incrementado su contenido) o eliminado un determinado componente. Deben presentarse como un alimento propiamente dicho y sus efectos deben obser-

vase cuando el alimento se consume dentro de una dieta equilibrada diaria, es decir, dentro del modelo alimentario habitual (Aranceta J., Gil A., 2010).

Las frambuesas (*Rubus idaeus*) pertenecen al grupo de las frutas pequeñas (berries), son frutos de reducido tamaño, con coloración que va del rojo oscuro al amarillo, sabor agridulce y rápida percibibilidad. Son ricos en vitaminas C y E, carbohidratos, fibras y azúcares, siendo la Patagonia Argentina una de las zonas de producción más importante del país en este tipo de cultivos. Las formas de consumo más difundidas son en fresco, mermeladas o conservas. Estas frutas poseen naturalmente actividad antioxidante, lo que les confiere importantes efectos benéficos sobre la salud, pudiendo considerarse como alimento funcional per se o por el agregado de otras propiedades para ampliar su posible funcionalidad.

Dentro de esta línea, los alimentos probióticos se definen como un suplemento alimentario con contenido microbiano vivo que beneficia al huésped mejorando su equilibrio intestinal, siendo la probiotización uno de los métodos utilizados para producir alimentos funcionales fermentados. Adicionar microorganismos probióticos a alimentos proporciona beneficios a la salud, incluyendo la reducción del nivel de colesterol en suero

sanguíneo, mejora de la función gastrointestinal, el sistema inmune y reducción del riesgo de contraer cáncer de colon (Yoon K.Y., Woodams E.E. y Hang Y.D., 2007).

En dicha dirección, algunos jugos de fruta han sido utilizados como vehículos de bacterias probióticas (Nualkaekul S., Charalampopoulos D., 2011; Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D., 2005), por un lado para ampliar la oferta de alimentos funcionales y por otro lado para satisfacer la demanda de consumidores que no consumen lácteos (vegetarianos, lactosa intolerantes, alérgicos a proteínas lácteas o por la percepción negativa del contenido de colesterol en leche). En la Argentina no existen antecedentes publicados sobre la factibilidad del empleo de la frambuesa para vehicular microorganismos probióticos, lo que le sumaría importantes propiedades por sobre las que ya posee naturalmente.

Por ello, el objetivo de este trabajo es determinar la capacidad de la pulpa de frambuesa para ser fermentada y/o constituirse en vehículo para cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum*, con el propósito de generar nuevos alimentos funcionales y ampliar la cartera de productos elaborados de la frambuesa para la agroindustria regional.



Celebramos 30 años de trayectoria ofreciendo formulaciones de espesantes, estabilizantes y gelificantes para mejorar la industria de alimentos.



Goma Xántica, Goma Gellan, Alginatos, Medios de Cultivo, Recubrimiento para Quesos, Enzimas y Conservantes.
Lavalle 1125 (1048) Buenos Aires, Argentina Tel: +(5411) 4382-8332 e-mail: biotec@biotecsa.com.ar www.biotecsa.com.ar

Materiales y métodos

Materias primas

Se utilizó pulpa de frambuesa var. Tulameen de frutas cosechadas en El Bolsón, Patagonia Argentina. Para obtener la pulpa, las frambuesas se sometieron a la acción del mixer en frío. La pulpa se distribuyó en bolsitas de 40 gramos y congeló (-20°C) hasta su uso. Se trabajó en condiciones de asepsia para no contaminar la pulpa.

Cepas

Para la fermentación de la pulpa se utilizaron dos cepas de *L. plantarum* (INLAIN 813 y 998) cedidas por el equipo profesional del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), Universidad Nacional del Litoral, CONICET, Santa Fe, República Argentina. Las mismas tienen propiedades probióticas (aumento de defensas intestinales) demostradas en animales en estudios previos (Zago M. y col., 2011).

Para reactivar las cepas conservadas, se colocó 100 μL de la suspensión congelada con glicerol al 20% en 5 ml de caldo MRS. Se incubó 24 a 48 h a 37°C (hasta aparición de turbidez). Luego, se continuó con repiques overnight (ON) inoculando 100 μL de la suspensión del microorganismo en 5 ml de caldo MRS nuevo y posterior lavado con buffer fosfato salino de pH 7 (Reinheimer J., INLAIN, 2011).

Fermentación de la pulpa de frambuesa

Las experiencias de fermentación se realizaron por triplicado con 40 g de pulpa previamente esterilizada (121°C , 15 min). La pulpa fue inoculada al 2% con los cultivos de *L. plantarum* e incubadas a 37°C en estufa de cultivo durante 24 h.

Se realizaron los recuentos microbiológicos en agar MRS mediante la técnica de recuento en placa a tiempo cero y a las 24 h del inicio de la fermentación en las pulpas de frambuesa inoculadas con la cepa 813 y 998.

Simulación gástrica de la pulpa de frambuesa fermentada

La simulación gástrica se realizó en cada pulpa fermentada, frambuesa con *L. plantarum* 813 y frambuesa con *L. plantarum* 998 (tiempo 0 y 24 h) por triplicado, con el objetivo de estudiar la resistencia gastrointestinal de las cepas contenidas en las mismas.

Para la determinación in vitro de la resistencia de *L. plantarum* a la digestión gastrointestinal se procedió según Reinheimer J., INLAIN, 2011. Se tomó 15 gramos de pulpa y se agregó 15 ml de saliva más 0,6% de pepsina (punto A de la determinación). Se toma muestra, se incuba por 48 horas a 37°C y se hace el recuento del punto correspondiente. Luego, se acidificó a pH 2,5 con HCL e incubó la muestra 90 minutos en baño de agua termostático a 37°C (punto B, recuento). A continuación se tomó 1.4 ml en eppendorf, se centrifugó, descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con PBS (buffer fosfato salino de pH 7).



Después se realizó el shock duodenal de bilis (se resuspendió en 1,4 ml bilis bovina 1% en buffer pH 8 ó 7) y se incubó en baño de agua termostático a 37°C , 10 minutos (punto C, recuento). Se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se lavó. A continuación, se resuspendió en 1,4 ml bilis 0,3% + 0,1% pancreatina en buffer pH 8. Se incubó durante 90 min a 37°C (punto D, recuento).

Análisis químicos y microbiológicos

Se tomaron muestras de cada pulpa fermentada y se midió el pH e hizo el recuento de las unidades formadoras de colonias de células viables (UFC/g) a través del método estándar de recuento en placa con medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) después de 48 horas de incubación a 37°C (tiempo 0 y 24 h). Para realizar la simulación gástrica se tomaron muestras en los puntos A, B, C y D de la determinación.

Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestra el avance de la fermentación de las pulpas de frambuesa fermentadas con las cepas de *L. plantarum* 998 y 813, donde se puede observar que la pulpa no pudo ser utilizada por las cepas para crecer ya que los recuentos disminuyeron desde el inicio de la fermentación. La cepa *L. plantarum* 998 disminuyó 2,8 log a las 48 horas de fermentación, manteniendo una concentración de 1.10^5 UFC/g. Comportamiento similar presentó la cepa *L. plantarum* 813 (2,2 log), quedando a las 48 horas de fermentación similar concentración. Teniendo en cuenta estos recuentos, se decidió fermentar la pulpa 24 horas ya que si bien el cultivo de cepas ácido lácticas redujo su viabilidad celular durante la fermentación, los recuentos a las 24 horas de fermentación son iguales o mayores que 6,00 log UFC/g (1.10^6 UFC/g), concentraciones que son las requeridas para productos probióticos.

Tabla 1 - Avance de la fermentación (log UFC/g) de pulpa de frambuesa con las cepas de *L. plantarum* 998 y 813

Tiempo (horas)	pH	<i>L. plantarum</i> 998	pH	<i>L. plantarum</i> 813
0	2,8	7,8±0,15	2,85	7,60 ± 0,16
24	2,85	7,32±0,31	2,80	6,01 ± 0,26
48		5,00		5,40

Tabla 2 - Caracterización en frutos frescos de frambuesa

Determinación	Frambuesa
Humedad (%)	86,2 ± 0,1
SSR (°Bx)	11,67 ± 0,76
pH	2,83 ± 0,19
Cenizas (%)	2,71 ± 0,18
Acidez Titulable ^(a)	2,08 ± 0,10
Proteínas Totales (%)	1,14 ± 0,03
Grasas (%)	0,24 ± 0,01
Azúcares Reductores ^(b)	2,4 ± 0,1
Azúcares Totales ^(c)	11 ± 1

Los valores representan la media (n = 3) ± SD, ^(a)g de ácido cítrico anhidro/100 g de FF, ^(b)g de GLU/100 g FF, ^(c)g de GLU/100 g de FF Paulino, C.; Ochoa, M.; De Michelis, A., 2013

Tabla 3 - Caracterización de principios activos

Determinación	Frambuesa
Carotenos ^(a)	576 ± 16
Fenoles Totales ^(b)	174 ± 16
Flavonoides ^(c)	38 ± 3
Vitamina C ^(d)	467 ± 0
Antocianinas ^(e)	40 ± 1
Fructanos Totales ^(f)	13 ± 0
Poder Antirradical ^(g)	0,48 ± 0,03
Poder Reductor ^(h)	34 ± 4

Los valores representan la media (n = 3) ± SD, ^(a)µg de luteína/100 gramos de FF, ^(b) mg GAE/100g de FF, ^(c)mg CE/100 g de FF, ^(d)mg ascórbico Total/ Kg FF, ^(e)mg cianidina-3-glu/100 g FF, ^(f)mg FRUC/100 g de FF, ^(g)mg⁻¹ de tejido fresco, ^(h)µg Fe+2/ g FF. Paulino, C.; Ochoa, M.; De Michelis, A., 2013.

Si bien estas cepas son ácido tolerantes, la disminución de los recuentos se puede deber al bajo pH de la matriz estudiada. Se sugirió ampliamente la fuerte influencia del pH sobre la supervivencia celular en varios productos alimenticios (Champagne C.P. y Gardner N.J, 2005).

Para que los microorganismos probióticos sobrevivan a las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y alcancen el intestino en número suficiente, es necesario que estén presentes en el producto en una concentración de al menos 10⁶ UFC/ml. Estudios in vivo e in vitro

BASF
The Chemical Company

Indupint S.r.l.
ALTA TECNOLOGIA EN PINTURAS

Henkel
Adhesive Technologies

François Frères
TONNELLERIE

TATE & LYLE
CONSISTENTLY PURE IN RENEWABLE INGREDIENTS

Rousselot
a Sobel Company

IVA
MATERIALES DE VIDRIO

SOLVAY



CERSA

CENTRO ENOLÓGICO RIVADAVIA S.A.

COMERCIALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN ARGENTINA Y LATINOAMÉRICA DE PRODUCTOS QUÍMICOS PARA LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

■ **MENDOZA**
Tels.: 54 (0261) 4932626 / 2666 / 2502 - mendoza@centro-enologico.com
Maza Norte 3237 Gutiérrez (5511) Maipú, Mendoza.

● CERSA atiende directamente las siguientes zonas en Argentina:
Neuquén, San Luis, San Juan, La Rioja, Salta, Tucumán, Catamarca y Jujuy.

CALIDAD DE PRODUCTO, SERVICIO, SEGURIDAD Y EXPERIENCIA

WWW.CENTROENOLOGICO.COM.AR

FERMITAN
TANINOS
Quebracho, Roble, Acacia, Uva...

DEXTROGUM Y LEVOGUM
GOMAS ARÁBIGAS

VINTAGE
• Bisulfito de Amonio
• Bisulfito de Potasio

CERSA
IMPORTACIÓN

- Acido Cítrico
- Carbón Activado
- Carbonato e Hidrox. de Potasio
- Metabisulfito de Potasio
- Metabisulfito de Sodio
- Sorbato de Potasio



Tabla 4 - Ensayo de resistencia gastrointestinal simulada (log UFC/g) de pulpa de frambuesa fermentada con la cepa de *L. plantarum* 998

Tiempo (horas)	A	B (Post acidificación pH 2,5)	C (Post shock bilis 1%)	D (Post bilis 0,3%-pancreatina 0,1%)
0	7,48±0,11	7,37±0,05	7,21±0,22	7,05±0,26
24	7,15±0,15	5,64±0,58	5,6±0,2	5,38±0,33

Tabla 5 - Ensayo de resistencia gastrointestinal simulada (log UFC/g) de pulpa de frambuesa fermentada con la cepa de *L. plantarum* 813

Tiempo (horas)	A	B (Post acidificación pH 2,5)	C (Post shock bilis 1%)	D (Post bilis 0,3%-pancreatina 0,1%)
0	7,72±0,32	5,87±0,28	5,87±0,08	5,75±0,02
24	6,55±0,08	4,98±0,29	4,99±0,13	4,86±0,12

(Reid G., 2008; Charteris W.P. y col., 1998) indicaron que algunas cepas de *Lactobacillus* sólo sobreviven parcialmente al pasaje a través del tracto gastrointestinal y, generalmente, debería estar presente una población de bacterias de 10^7 - 10^9 UFC/ml en los alimentos para colonizar, al menos temporalmente, el intestino (Lee Y.K. y Salminen S., 1995).

En las tablas 2 y 3, respectivamente, se informa el análisis composicional de los frutos frescos de frambuesa y la caracterización de principios activos.

En la tabla 4, al simular las condiciones gastrointestinales, se observa que a las 24 h de fermentación de la pulpa de frambuesa, la cepa Lp 998 disminuyó 1,77 log con respecto al valor log UFC/g de partida.

En la tabla 5 (también simulación de las condiciones gastrointestinales) se observa que a las 24 horas de fermentación de la pulpa de frambuesa, la cepa Lp 813 presentó similar reducción (1,69 log) con respecto al valor log UFC/g de partida.

Según la Organización Mundial de la Salud (FAO - OMS, 2002) dentro de las pruebas in vitro para evaluar el potencial probiótico de alguna cepa se encuentran: resistencia a pH ácido, sensibilidad a antibióticos, acción antimicrobiana, adherencia y resistencia a sales biliares. Adicionalmente, la OMS considera que para que un microorganismo sea denominado probiótico se debe demostrar que las bacterias son capaces de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal y llegar al intestino grueso en poblaciones de 10^6 - 10^7 UFC/ml con capacidad de aumentar la población dentro del mismo.

Conclusiones

Si bien la pulpa no fue utilizada por los microorganismos para crecer, mantuvo las células en un rango de 10^6 - 10^7 UFC/g. Este nivel corresponde a valores promedio usualmente encontrados en productos lácteos comerciales probióticos.

Con respecto a los ensayos de simulación gástrica, si bien la cepa disminuyó su resistencia gastrointestinal durante la fermentación, los valores obtenidos podrían mejorarse partiendo de un nivel más alto de inóculo al

comienzo de la fermentación. Estos estudios permiten determinar que la pulpa de frambuesas podría ser un vehículo para cepas de *L. plantarum*, lo cual permitiría desarrollar nuevos alimentos funcionales en base no láctea.

Bibliografía

- 1- Aranceta J., Gil A. (2010) "Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil". Editorial Médica PANAMERICANA.
- 2- Barrio Merino A. (2006) Probióticos, prebióticos y simbióticos. Definición, funciones y aplicación clínica en pediatría. Revista Pediatría Atención Primaria. Publicación Oficial de la Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria.
- 3- Champagne C.P., Gardner N.J. (2005) Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45, 61-84.
- 4- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. and Collins J.K. (1998) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 759-768.
- 5- FAO-OMS (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/OMS Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 1-52.
- 6- Lee Y.K., Salminen S. (1995) The coming of age of probiotics. Trends in Food Science & Technology 6, 241-245.
- 7- Nualkaekul S., Charalampopoulos D. (2011) Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. International Journal of Food Microbiology 146, 111-117.
- 8- Paulino, C.; Ochoa, M.; De Michelis, A. (2013) Componentes bioactivos en frutas pequeñas de la Comarca Andina del Paralelo 42. Revista Presencia N° 96, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Patagonia. Pág. 32-35.
- 9- Reid, G. (2008) Probiotics and Prebiotics - Progress and Challenges. International Dairy Journal, 969-975.
- 10- Reinheimer J. (2011) Pasantía en el Instituto de Lactología Industrial. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- 11- Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D. (2005) Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. Lebensm.- Wiss.u.- Technol. 38, 73-75.
- 12- Yoon K.Y., Woodams E.E., Hang Y.D. (2007) Jugo de tomate probiótico con bacterias ácido lácticas. Revista Mundo Alimentario. 7-11.
- 13- Zago M., Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J., Giraffa G. (2011) Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiology 28, 1033-1040.