

20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Actividad prebiótica de compuestos bioactivos producidos por el bioprocesamiento de salvado de trigo

Reque, Priscilla Magro; Pinilla, Cristian Mauricio Barreto; Brandelli, Adriano
priscilla.reque@ufrgs.br; christian_mao@hotmail.com; abrand@ufrgs.br

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Resumen

Los compuestos prebióticos son sustratos que no son metabolizados por las enzimas del hospedero, sino por su microbiota, los cuales proporcionan beneficios para la salud relacionados al tracto gastrointestinal, metabolismo cardíaco, la salud mental y ósea. Entre ellos encontramos los xilooligosacáridos (XOS), que son prebióticos emergentes derivados de arabinoxilanos, polisacáridos presentes en los cereales. Este estudio tuvo como objetivo realizar el bioprocesamiento del salvado de trigo, un subproducto de la producción de la harina de trigo, utilizando una cepa probiótica de *Bacillus subtilis*, para evaluar su actividad prebiótica. Para la determinación de la actividad prebiótica, se empleó un cultivo probiótico de *Lactobacillus acidophilus* LA-5[®]. Las pruebas se realizaron con muestras del cultivo de salvado de trigo bioprocesadas con *B. subtilis*. FTC01 a 37°C en los tiempos de 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas. La evaluación de sus propiedades prebióticas fue realizada colocando 1% (v/v) del cultivo 24 h de *L. acidophilus* LA-5 (10⁶ UFC/mL) en caldo MRS agregado con 10 mg/mL de xilosa (control) o muestras bioprocesadas. La actividad prebiótica se determinó por la diferencia entre la densidad óptica a 600 nm inmediatamente después de la inoculación y pasadas 24 h de incubación anaerobia a 37°C. La puntuación máxima se encontró para las muestras bioprocesadas por 24 y 72 horas (1.73 y 1.61, respectivamente), indicando el crecimiento de la cepa probiótica. Por lo tanto, el bioprocesamiento del salvado de trigo permitió la obtención de prebióticos, que son compuestos bioactivos promisoros para el desarrollo de productos funcionales y nuevos ingredientes para las industrias de alimentos y piensos.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, bioprocesamiento, salvado de trigo, XOS, actividad prebiótica.

Introducción

Los prebióticos fueron definidos previamente por Roberfroid et al. (2010) como sustancias que estimulan el crecimiento y/o la actividad de los microorganismos probióticos, mejorando la microbiota intestinal y beneficiando las funciones intestinales. Recientemente, un panel de expertos promovido por la Asociación Internacional de Prebióticos y Probióticos Científicos (ISAPP) actualizó el concepto prebiótico de "un sustrato que es utilizado selectivamente por microorganismos huéspedes que confieren un beneficio para la salud", no debiendo ser degradado por las enzimas del organismo huésped (Gibson et al., 2017).

La fermentación prebiótica aumenta la diversidad y la actividad de la microbiota intestinal a través de mecanismos de alimentación cruzada que promueven el crecimiento de microorganismos probióticos (Valcheva & Dieleman, 2016). Las propiedades benéficas para la salud de los prebióticos se relacionan especialmente con la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación por microbiota intestinal (Florowska et al., 2016), generando una disminución del pH, mejora de la biodisponibilidad de los minerales e la inhibición de bacterias patógenas (Broekaert et al., 2011). La

mayoría de estos beneficios de salud de los prebióticos están relacionados con el tracto gastrointestinal, el metabolismo cardíaco, la salud mental y ósea (Gibson et al., 2017).

Los fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y la inulina son los principales compuestos con efectos prebióticos establecidos, mientras que los lactobacilos y las bifidobacterias son las especies más importantes de microorganismos probióticos (Roberfroid et al., 2010). Algunas de las fuentes dietéticas de prebióticos son el ajo, cebolla, plátano, alcachofa, achicoria, salvado de trigo y cebada (Florowska et al., 2016).

Los xilooligosacáridos (XOS) son prebióticos emergentes derivados de la hidrólisis de arabinosilanos (AX), polisacáridos no amiláceos que están presentes en los cereales (Manisseri & Gudipati, 2010). De acuerdo con Samanta et al. (2015), XOS son oligómeros de azúcar (2 a 10) de xilosa unidos a través de enlaces β -1,4, que son resistentes al calor y estables en condiciones ácidas. Los arabinosilooligosacáridos feruloilados (AXOS) son el único compuesto prebiótico con propiedades antioxidantes y prebióticas (Broekaert et al., 2011).

Objetivos

El objetivo del presente estudio fue

investigar el efecto del bioprocesamiento de salvado de trigo, un subproducto de la molienda de trigo, en la producción de compuestos prebióticos. Este subproducto agroindustrial se utilizó como sustrato para el cultivo de una cepa probiótica, *Bacillus subtilis* FTC01, y se examinó la actividad prebiótica de los cultivos resultantes.

Materiales y Métodos

Preparación de muestras y procedimiento de bioprocesamiento

El salvado de trigo se obtuvo de una empresa de molienda local (Moinho Estrela, Porto Alegre, Brasil) y tuvieron un tamaño medio de partícula de 257 μm y 88,4 g/100 g de materia seca. La composición de la muestra se determinó como (g/100 g, base seca): proteína (17,9), ceniza (3,5), fibra cruda (5,4), fibra detergente neutra (24,9) y fibra detergente ácida (5,9) (Van Soest, Robertson, & Lewis, 1991). La muestra se separó en alícuotas de aproximadamente 250 g cada una y luego se almacenó en bolsas de polipropileno a -20°C .

B. subtilis FTC01 se aisló del producto probiótico Biotop (Fatec, Arujá, Brasil) y luego se mantuvo a -20°C en medio caldo corazón de cerebro (BHI, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) donde fue adicionado 20% (v/v) de glicerol. La cepa se inoculó en caldo BHI y se incubó a 37°C durante 24 horas bajo agitación (125

rpm), luego se mantuvo a 4°C en placas de agar BHI y se subcultivó periódicamente.

Recipientes que contenían 10 g de salvado de trigo y 200 mL de solución fosfato-salina pH 7,4 se autoclavaron y luego se inocularon con 1 mL de la cepa bacteriana a una concentración de 10^8 UFC/mL en solución de NaCl 8,5 g/L, con 1 mL de solución salina como control.

Después, las muestras se incubaron a 37°C durante 72 h en un agitador orbital (modelo MA410, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 125 rpm. Se recogieron alícuotas asepticamente inmediatamente después de la inoculación (tiempo 0) y a las 12, 24, 36, 48 y 72 horas de cultivo, luego se centrifugaron a 10000 g (Megafuge 16R, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) por 15 min a 4°C , para posteriormente ser filtradas por membranas de 0.22 μm (Sartorius, São Bernardo do Campo, Brasil) y congeladas a -20°C . Este experimento se llevó a cabo tres veces. El pH se midió usando un medidor de pH (PHtek, Curitiba, Brasil) justo después de la recolección de las alícuotas de cada muestra. Los azúcares reductores liberados se midieron como fue descrito por Miller (1959), usando reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y xilosa como estándar. Para la verificación del crecimiento bacteriano, los recuentos se estimaron en los puntos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 28, 32, 48, 52 y 72 horas de cultivo. La

cuantificación de células viables se realizó a través del método de micro dilución como se describió anteriormente por Naghili et al. (2013). Las placas BHI se incubaron a 37°C y las colonias se enumeraron después de 18 horas de cultivo.

Actividad prebiótica

Para verificar la actividad prebiótica, se eligió un cultivo probiótico comercial, *Lactobacillus acidophilus* LA-5® (Chr. Hansen, Valinhos, Brasil), ya que se demostró en un estudio previo que esta cepa presentaba alta actividad cuando cultivada con productos de trigo bioprocesado con *B. subtilis* FTC01 como sustrato (Reque et al., 2017). Los análisis se realizaron siguiendo el método descrito previamente por Huebner, Wehling y Hutkins (2007), donde se activaron 100 µL de LA-5 (de material congelado a -20°C en leche) en 10 mL de caldo MRS (Himedia, Mumbai, India) después de 24 horas a 37°C bajo condiciones anaeróbicas (GasPak, BD Diagnostics, Sparks, USA). Posteriormente, 100 µL de este cultivo se transfirieron a 10 mL de caldo MRS fresco y se incubaron anaeróticamente durante 24 horas a 37°C.

Las pruebas se realizaron colocando 1% (v/v) de cultivo activado LA-5 a 10⁶ UFC/mL en viales estériles individuales que contienen caldo MRS, a uno de estos se les añadió xilosa 10 mg/mL como

control inicial separada de las muestras bioprocesadas. La puntuación de actividad prebiótica se calculó utilizando el valor de densidad celular (CD) inmediatamente después de la inoculación bacteriana (tiempo 0) y después de 24 horas de incubación a 37°C, de acuerdo con esta ecuación:

Puntuación de actividad prebiótica =

$$CD (24 h) - CD (0 h)$$

Donde la densidad celular se midió por densidad óptica (OD) a 600 nm en un espectrofotómetro UV-visible.

Análisis de los datos

Los resultados se analizaron mediante ANOVA one-way y test de Tukey como prueba de comparación al 5% de nivel de significación, utilizando el programa STATISTICA® (StatSoft. Inc., Tulsa, USA) versión 10.

Resultados y Discusión

XOS puede obtenerse a partir de la auto hidrólisis lignocelulósica e hidrólisis ácida, sin embargo, estos métodos tienen desventajas tales como la producción de subproductos no deseados, altas cantidades de monosacáridos, además de requerir una utilización de equipos especializados, siendo, por lo tanto, más ventajoso el uso de enzimas hidrolíticas (Broekaert et al., 2011). Por esto, se usó una cepa de *Bacillus subtilis* (FTC01) para el procesamiento del salvado de trigo, en

la medida en que se sabe que las especies de *Bacillus* producen enzimas xilanolíticas capaces de liberar XOS en el medio (Reddy & Krishnan, 2013). La curva de crecimiento del *B. subtilis* FTC01 utilizando salvado de trigo como sustrato se muestra en la Figura 1. En las primeras 12 h, se observó la fase exponencial, y luego una fase estacionaria con una tasa de multiplicación lenta de 12 a 72 h, y un incremento de 1 UFC/mL. Se alcanzó un recuento máximo de células de alrededor de 8 UFC/mL en 48h y se mantuvo hasta el final. El medio de cultivo presentó una ligera alcalinización, donde el valor de pH varió de 5.10 a las 12 h a 6.27 a las 48 h, y disminuyó nuevamente a 5.89 a las 72 h. Al analizar la producción de xilanasas por *B. subtilis* utilizando salvado de trigo como sustrato, Ho (2015) informó recuentos máximos de células de 2.50×10^9 células/mL, actividad máxima de xilanasas y el pH más alto (6.52) a las 48 h. La tendencia de pH similar fue verificada por Nawawi, Mohamad, Tahir y Saad (2017) utilizando una cepa de *Bacillus* aislada para la obtención de xilanasas extracelulares durante el cultivo en salvado de arroz. Estos autores observaron un incremento de la actividad enzimática en correlación directa con la alcalinización de los medios de cultivo durante el crecimiento de la bacteria por 144 h (Nawawi et al., 2017).

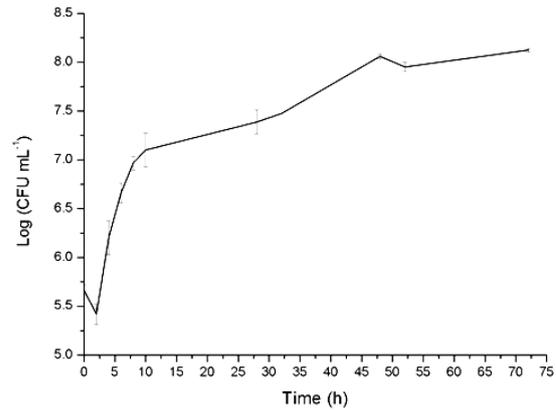


Figura 1. Patrón de crecimiento de *Bacillus subtilis* FTC01 en salvado de trigo durante 72 h a 37°C. Los valores son las medias \pm desviación estándar de dos experimentos independientes.

En esta biotransformación los azúcares reductores (Figura 2) de los medios, presentaron cambios continuamente, debido a las diferencias durante la hidrólisis enzimática. Las bacterias consumen carbohidratos, en un proceso dinámico en el que el microorganismo utiliza un grupo de enzimas, cada una con una función específica en el proceso que proporciona una hidrólisis eficiente del salvado de trigo y permite una disponibilidad continua de carbohidratos para su crecimiento.

Se ha reportado que el salvado de trigo contiene arabinosa y xilosa como componentes principales de azúcar, y también ramnosa, manosa, galactosa y glucosa en cantidades menores (Manisseri & Gudipati, 2010).

El material lignocelulósico, incluido el salvado de trigo, está formado por celulosa, hemicelulosa y lignina, en el que

la fracción de hemicelulosa está compuesta básicamente por xilano (Reddy & Krishnan, 2016), que está formado por xilopiranosilo unidos por ligaciones β -D-(1,4) en el salvado de trigo (Immerzeel et al., 2014), por lo que es una rica fuente de biopolímeros con alto valor agregado, como los compuestos prebióticos XOS.

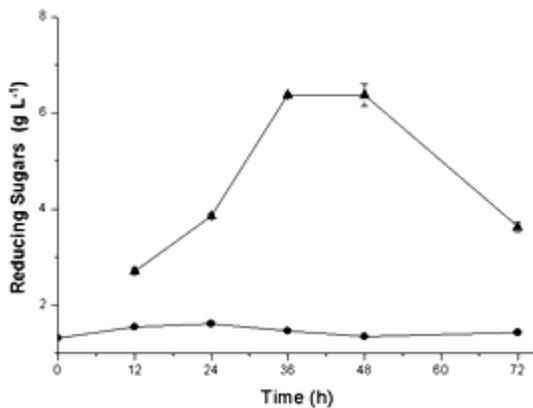


Figura 2. Concentración de azúcares reductores en el control (●) y en las muestras bioprocesadas (▲) a lo largo del tiempo. Las barras son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En cuanto a la actividad prebiótica, ésta se evaluó por el aumento en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, una cepa probiótica comercial, utilizando como sustrato las muestras de bioprocesos del salvado trigo. La actividad prebiótica refleja la capacidad de un sustrato dado para mejorar el crecimiento de un microorganismo beneficioso en relación con un sustrato no prebiótico (Huebner et al., 2007).

La puntuación de la actividad prebiótica de

las muestras de salvado de trigo bioprocesado están descritas en la Figura 3. Entre las muestras de trigo y control (xilosa) analizadas, los valores de actividad prebiótica máxima fueron 1.73 y 1.61, obtenidos por las fracciones B24 y B72, respectivamente, que representan la mezcla de XOS y otros compuestos producidos por el *Bacillus* a las 24 y 72 h de bioproceso. Thitiratsakul y Anprung (2014) informaron puntajes de actividad prebiótica de 1.69 y 1.44 para *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Bifidobacterium lactis* BB-12, respectivamente, utilizando hidrolizado de fruta longan, y valores de 1.20 y 1.69, respectivamente, usando inulina como sustrato, que son resultados muy similares a los encontrados en nuestro estudio, demostrando que los XOS formados por el bioprocesamiento del salvado de trigo presenta un potencial prebiótico.

Por otro lado, los valores más bajos de puntaje de actividad prebiótica se encontraron para la xilosa, utilizada como control, y en las muestras cultivadas por 36 y 48 h (0.93, 0.89 y 0.82, respectivamente). De acuerdo con Immerzeel et al. (2014), tanto el grado de polimerización como el tipo y grado de sustituyentes de los XOS pueden influir en la tasa de fermentación in vitro.

El crecimiento de algunas cepas de bifidobacterias y lactobacilos y su capacidad para metabolizar XOS a partir

de fracciones auto hidrolizadas de maíz fueron analizadas por Moura et al. (2007). *B. adolescentis* y *L. brevis* fueron los que crecieron mejor en los hidrolizados y los XOS comerciales. *L. brevis* mostró una tendencia a preferir los medios que contienen pentosa sobre la glucosa, mientras que *L. fermentum* creció eficientemente solo en glucosa y xilosa (Moura et al., 2007).

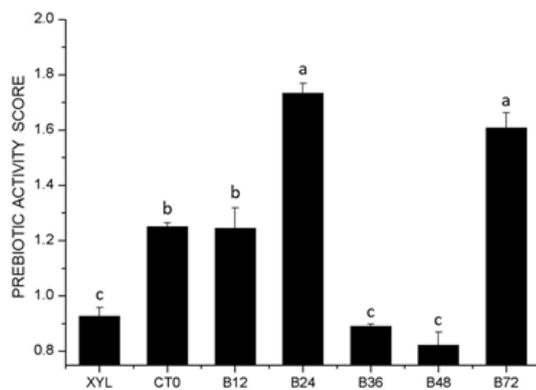


Figura 3. Puntuación de la actividad prebiótica del salvado de trigo bioprocesado con *B. subtilis* en comparación con el control de xilosa. Las muestras se incubaron a 37°C durante 24 h con *L. acidophilus*. Las barras son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$). XYL, CT0, B12, B24, B36, B48 y B72 son muestras de xilosa, control en el momento inicial y muestras de salvado de trigo después de 12, 24, 36, 48 y 72 h de bioprocesamiento bacteriano, respectivamente.

Se cree que los patrones de crecimiento de microorganismos en un oligosacárido particular son específicos para cada cepa debido a las diferencias en sus sistemas de transporte (Wang, Suna, Caoa, &

Wang, 2010). Según Madhukumar y Muralikrishna (2012), los mecanismos implicados pueden ser (a) el transporte y el metabolismo de los monosacáridos después de la acción de las enzimas extracelulares en los oligosacáridos, o (b) la hidrólisis de los oligosacáridos que se transportaron específicamente a la célula mediante enzimas intracelulares.

En un estudio con varias cepas de bifidobacterias y lactobacilos, Li, Summanen, Komoriya, y Finegold (2015) no observaron ningún crecimiento para *Lactobacillus acidophilus*, ATCC o aislado de heces, en un sustrato con diferentes concentraciones de XOS. Pero, encontraron que todas las cepas de *Bifidobacterium* eran capaces de crecer en el medio con XOS frente a solo el 69% de los lactobacilos. De ellos, 91% de bifidobacterias y 28% de lactobacilos presentaron una fuerte estimulación del crecimiento por XOS, siendo que la especie *Bifidobacterium bifidum* mostró una débil estimulación de crecimiento, como se observó en nuestro trabajo anterior (Reque et al., 2017).

Conclusiones

El salvado de trigo puede ser un buen sustrato para la producción de compuestos prebióticos como XOS. El perfil y la concentración de esos oligosacáridos variaron considerablemente entre muestras de

control y bioprocadas y entre éstas en diferentes tiempos de cultivo. *B. subtilis* FTC01 parece ser una gran fuente de enzimas xilanolíticas, y su uso para el bioprocamiento de salvado de trigo fue capaz de incrementar el valor agregado este material con posibles propiedades prebióticas. Por lo tanto, el salvado de trigo procesado podría considerarse un material prometedor para el desarrollo de alimentos de cereales optimizados y nuevos ingredientes, así como para mejorar formulaciones de alimentación animal.

Bibliografía

Broekaert, W.F., Courtin, C.M., Verbeke, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W., & Delcour, J.A. (2011). Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 178-194.

Florowska, A., Krygier, K., Florowski, T., & Dłużewska, E. (2016). Prebiotics as functional food ingredients preventing diet-related diseases. *Food & Function*, 7, 2147-2155.

Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., ...Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and

Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews in Gastroenterology and Hepatology*, 14, 491-502.

Ho, H.L. (2015). Xylanase production by *Bacillus subtilis* using carbon source of inexpensive agricultural wastes in two different approaches of submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF). *Journal of Food Processing and Technology*, 6, 437.

Huebner, J., Wehling, R.L., & Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17, 770-775.

Immerzeel, P., Falck, P., Galbe, M., Adlercreutz, P., Karlsson, E.N., & Stålbrand, H. (2014). Extraction of water-soluble xylan from wheat bran and utilization of enzymatically produced xylooligosaccharides by *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Weissella* spp. *LWT Food Science and Technology*, 56, 321-327.

Li, Z., Summanen, P.H., Komoriya, T., & Finegold, S.M. (2015). *In vitro* study of the prebiotic xylooligosaccharide (XOS) on the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 66, 919-922.

- Madhukumar, M.S., & Muralikrishna, G. (2012). Fermentation of xylo-oligosaccharides obtained from wheat bran and bengal gram husk by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 745-752.
- Manisseri, C., & Gudipati, M. (2010). Bioactive xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. *LWT Food Science and Technology*, 43, 421-430.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426.
- Moura, P., Barata, R., Carvalheiro, F., Gírio, F., Loureiro-Dias, M.C., & Esteves, M.P. (2007). *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT Food Science and Technology*, 40, 963-972.
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Razavi Rouhani, S. M., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 4, 179-183.
- Nawawi, M.H., Mohamad, R., Tahir, P.M., & Saad, W.Z. (2017). Extracellular xylanopectinolytic enzymes by *Bacillus subtilis* AD11 from EFB's compost. *International Scholarly Research Notices*, 2017, 7831954.
- Reddy, S.S., & Krishnan, C. (2013). Characterization of enzyme released antioxidant phenolic acids and xylooligosaccharides from different *Graminaceae* or *Poaceae* members. *Food Biotechnology*, 27, 357-370.
- Reddy, S.S., & Krishnan, C. (2016). Production of xylooligosaccharides in SSF by *Bacillus subtilis* KCX006 producing β -xylosidase-free endo-xylanase and multiple xylan debranching enzymes. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46, 49-55.
- Reque, P.M., Werner, J.A.O., Correa, A.P.F., Pinilla, C.M.B., Rodrigues, E., & Brandelli, A. (2017). Biological activities of wheat middlings bioprocessed with *Bacillus* spp. *LWT Food Science and Technology*, 77, 525-531.
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., ...Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104, S1-S63.
- Samanta, A.K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A.P., Senani, S., & Sridhar,

M. (2015). Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5, 62-71.

Thitiratsakul, B., & Anprung, P. (2014). Prebiotic activity score and bioactive compounds in longan (*Dimocarpus longan* Lour.): influence of pectinase in enzyme-assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 1947-1955.

Van Soest, P.J., Robertson J.B., & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.

Valcheva, R., & Dieleman, L.A. (2016). Prebiotics: definition and protective mechanisms. *Best Practice in Research and Clinical Gastroenterology*, 30, 27-37.

Wang, J., Suna, B., Caoa, Y., & Wang, C. (2010). In vitro fermentation of xylooligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fiber by Bifidobacteria. *Carbohydrate Polymers*, 82, 419-423.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.