

Efecto de diferentes formulaciones preparadas con cereales y leguminosas sobre el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Effect of different formulations prepared with cereals and legumes on the growth of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Yasmina Barboza^{1*}, Nibia Novillo², Dolores Zambrano³

¹Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición y Dietética. Maracaibo, Venezuela.

²Universidad Estatal de Milagro, Facultad de Salud y Servicios Sociales. Milagro, Guayas, Ecuador.

³Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Manta, Ecuador.

*Autor para correspondencia: barbozayasmina@gmail.com

RESUMEN

Los efectos beneficiosos de los microorganismos probióticos cuando se ingieren en cantidad suficiente tienen una influencia positiva para la salud de los seres humanos y animales. Los probióticos, especialmente los *Lactobacillus*, pueden inhibir el crecimiento de patógenos y mejorar la inmunología y las funciones metabólicas del hospedador. Las cepas de *Lactobacillus reuteri* son habitantes comunes del intestino de los mamíferos y exhiben propiedades que promueven la salud. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes formulaciones preparadas con cereales y leguminosas sobre el crecimiento de *L. reuteri* DSM 17938. Para esto, en el presente trabajo, sustratos solos o mezclas de cereales y leguminosas fueron fermentados con *L. reuteri* DSM 17938 para estudiar y comparar el efecto de la formulación de los medios sobre su crecimiento. Los medios se formularon utilizando dos harinas de cereales y dos de leguminosas: cebada, avena, quinchoncho y soja y mezclas de cereales y leguminosas (soja-avena, cebada-soja, quinchoncho-avena y quinchoncho-cebada). Se prepararon dos tratamientos un medio sólido (T1) y otro medio líquido (T2). Los resultados mostraron que hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) en el crecimiento de *L. reuteri* entre los medios de cereales y leguminosas y sus mezclas. No hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los medios sólidos y líquido. El medio de cebada ($8,87 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) soportó significativamente mejor crecimiento en comparación con los medios de avena, soja y quinchoncho. La población de células de *L. reuteri* en los medios con mezclas de cereales y leguminosas varió de $9,01$ a $7,32 \log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$. La combinación de soja y avena fue la más eficiente en mantener la viabilidad. Los valores de pH estuvieron entre 4 y 5.

Palabras clave: *Lactobacillus reuteri*; cereales; leguminosas; probiótico; alimento funcional

ABSTRACT

The beneficial effects of probiotic microorganisms when ingested in sufficient quantity have a positive influence on the health of humans and animals. Probiotics, especially lactobacilli, can inhibit the growth of pathogens and improve host immunology and metabolic functions. *Lactobacillus reuteri* strains are common inhabitants of the mammalian gut and exhibit health-promoting properties. For this reason, the objective of this work was to determine the effect of different formulations prepared with cereals and legumes on the growth of *L. reuteri* DSM 17938. For this, in the present work, substrates alone or mixtures of cereals and legumes were fermented with *L. reuteri* DSM 17938 to study and compare the effect of the formulation of the media on their growth. Two cereal and two legume flours namely barley, oats, pigeon pea, soybean, and mixtures of cereal and legume (soybean-oat, soybean-barley, pigeon pea-oats and pigeon pea-barley) were selected and fermented with the probiotic strain. Two treatments, one solid medium (T1) and other liquid medium (T2) were prepared and were analyzed. Results showed that there were significant differences ($P < 0.05$) in the growth of *L. reuteri* between media of cereals and legumes and their mixture. There were no significant differences ($P > 0.05$) between solid and liquid medium. The barley media ($8.87 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$) supported significantly better cell growth compared to oats, soybean and pigeon pea media. The cell population of *L. reuteri* in the media with mixtures of cereals plus legume ranging from 7.32 to $9.01 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$. The combination of soybean and oat was the most efficient in sustaining the viability of the organism. The pH values were between 4 and 5.16.

Key words: *Lactobacillus reuteri*; cereals; legumes; probiotic; functional foods

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el concepto de utilizar los alimentos para promover un estado de bienestar, mejorar la salud y reducir el riesgo de enfermedades se ha convertido en la nueva frontera en la ciencia de la nutrición y campos relacionados [1]. En este sentido, la creciente búsqueda de una dieta saludable ha impulsado el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades funcionales, particularmente fuente de compuestos bioactivos [2]. En este contexto, se encuentran los probióticos. Los probióticos son microorganismos viables que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud del hospedador [3].

Los probióticos han sido ampliamente estudiados debido a su capacidad para modular la microbiota intestinal y los sistemas inmunológicos, tanto en humanos como en ganado. Se han utilizado para aumentar la producción de leche y reducir la diarrea, tanto en bovinos (*Bos taurus*) como en cerdos (*Sus scrofa domestica*), y para controlar la colonización del tracto intestinal por bacterias patógenas [4].

Los más conocidos por su amplia aplicación son los microorganismos del género *Lactobacillus*. Los lactobacilos son microorganismos que tienen ciertos requerimientos especiales para crecer, como carbohidratos fermentables, aminoácidos, vitaminas del complejo B y minerales, además de otras necesidades específicas de la cepa. Así, la composición del sustrato y los requerimientos nutricionales de la cepa afectan considerablemente la fermentación del producto [5].

Uno de los principales probióticos a nivel industrial es *Lactobacillus reuteri*, el cual además de controlar infecciones gastrointestinales, posee otros efectos beneficiosos como son sus propiedades hipocolesterolémicas, antimutagénicas, disminución de la intolerancia a la lactosa, propiedades inmunomoduladoras, inhibición de patógenos intestinales, propiedad protectora de la mucosa gástrica, entre otras [6]. El potencial de los cultivos probióticos depende de varios factores, pero el más importante es su supervivencia durante la elaboración del producto, su almacenamiento, su tránsito a través del tracto gastrointestinal, y la capacidad de proliferar en el intestino grueso [7].

Tradicionalmente, los probióticos han sido utilizados en yogures y otros productos lácteos fermentados [8]. La intolerancia a la lactosa, el contenido de grasa saturada, las reacciones alérgicas debido a las proteínas de la leche son los principales inconvenientes relacionados con la ingesta de productos lácteos [9]. Debido a esto, surge la idea de desarrollar alimentos probióticos con cereales, frutas o leguminosas [10, 11, 12].

Al respecto, los cereales y las leguminosas ofrecen otra alternativa para la producción de alimentos funcionales debido a su amplia distribución y valor nutritivo [13]. Las legumbres son un alimento que se incluye en la dieta de varias culturas alrededor del mundo. Su alto valor nutritivo y bajo costo la hacen una fuente importante de proteínas, carbohidratos, fibra dietética, compuestos bioactivos y fitoquímicos, son fuente de vitaminas como folatos, tiamina, riboflavina, niacina y de minerales como potasio, magnesio y hierro [14].

Los cereales son deficientes en lisina, pero son ricos en cisteína y metionina. Las leguminosas por otro lado, son ricas en lisina pero deficientes en aminoácidos azufrados [15]. Así, combinando cereales con leguminosas, se mejora la calidad de la proteína total ya que sus aminoácidos se complementan.

Los principales parámetros que tienen que ser considerados en la utilización de cereales y leguminosas para el crecimiento de

microorganismos probióticos son la composición y el procesamiento de los granos, la formulación del sustrato, la capacidad de crecimiento y estabilidad de la cepa probiótica durante el almacenamiento [13]. Por lo tanto, la selección de sistemas alimentarios adecuados para administrar probióticos, tanto en humanos como en animales es un factor vital que debe considerarse en el desarrollo de alimentos probióticos funcionales. En virtud de las ideas expuestas, el propósito de este estudio fue investigar el efecto de diferentes formulaciones preparadas con cereales y leguminosas sobre el crecimiento de *L. reuteri* DSM 17938.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Un total de 8 tratamientos fueron desarrollados para determinar la factibilidad de utilizar *L. reuteri* DSM 17938 como ingrediente funcional en medios sólidos (T1) y medios líquidos (T2) a base de cereales y leguminosas. Un total de 96 muestras (12 de cada tratamiento) fueron preparadas durante tres meses utilizando soya (*Glycine max*), quinchoncho (*Cajanus cajan*), cebada (*Hordeum vulgare*) y avena (*Avena sativa*) y mezcla de soya + avena, soya + cebada, quinchoncho + avena y quinchoncho + cebada. El tratamiento 1 (medio sólido) se preparó utilizando 10 % de cada cereal (10 % de harina de cebada y 90 % agua, 10 % harina de avena y 90 % agua) o leguminosa (10 % harina de soya y 90 % agua, 10 % harina de quinchoncho y 90 % agua). Las mezclas fueron preparadas utilizando 5 % de cereal y 5 % de la leguminosa (5 % harina de soya + 5 % cebada + 90 % agua, 5 % harina de soya + 5 % harina de avena + 90 % agua, 5 % harina de quinchoncho + 5 % harina de cebada + 90 % agua, 5 % harina de quinchoncho + 5 % harina de avena + 90 % agua). El tratamiento 2 (medio líquido) se preparó utilizando los mismos porcentajes (TABLA I).

TABLA I
Ingredientes utilizados para formular los medios T1 y T2 (g·100 g⁻¹)

Ingredientes	Formulaciones	
	Harina	Agua
Quinchoncho	10	90
Avena	10	90
Soya	10	90
Cebada	10	90
Quinchoncho + Avena	5 + 5	90
Quinchoncho + Cebada	5 + 5	90
Soya + Cebada	5 + 5	90
Soya + Avena	5 + 5	90

Materia prima

El quinchoncho, la avena en hojuelas, la cebada y la soya, se obtuvieron en un mercado de la localidad, y fueron transportadas al laboratorio en bolsas herméticas de polietileno y colocados en un lugar seco a temperatura ambiente antes de utilizarlos. La composición nutricional de los cereales y leguminosas utilizados se presentan en la TABLA II. La cepa de *L. reuteri* DSM 17938 fue suministrada por el Laboratorio Biogaia Biologics, INC, EUA.

TABLA II
Composición nutricional de la soya, quinchoncho, cebada y avena (g·100 g⁻¹)*

Parámetro	Soya	Quinchoncho	Cebada	Avena
Humedad	7,7	11,2	8,2	8,7
Proteína	35,4	20,9	8,3	14,7
Grasa	20,1	1,0	2,2	8,6
Carbohidratos	32,2	63,1	80,4	66,1
Fibra	1,0	23,8	4,6	4,2
Cenizas	4,6	3,8	0,9	1,9

*Fuente: Tabla de Composición de Alimentos. Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Instituto Nacional de Nutrición, Dirección Técnica. Caracas, Venezuela

Elaboración de las harinas

Los granos de quinchoncho, cebada, soya y hojuelas de avena, fueron seleccionados, lavados, y secados para luego ser sometidos por separado, a un procesador de alimentos (Cuisinart Modelo DLC-2007N, EUA) y a una licuadora (Oster™ BLST4655, EUA) durante 5 min, posteriormente se pasaron a través de un tamiz de laboratorio marca Tyler (70 mm, 50 mm, 35 mm y 25 mm), hasta obtener harinas finas.

Preparación de los medios a base de cereales y leguminosas

Las harinas resultantes fueron suspendidas en agua destilada a una concentración del 10 %, mezcladas suavemente hasta homogenizar, luego de ajustar su pH a 7, las mezclas fueron colocadas en porciones de 15 mL de cada medio y esterilizadas a 121°C durante 15 min (T1). Para el (T2), las harinas fueron suspendidas en agua destilada al 10 % y mezcladas suavemente a temperatura ambiente durante 15 min.

Las suspensiones resultantes fueron centrifugadas (Centrifuga SMO412S-Science Med, EUA) a 1,11 G por 15 min y el sobrenadante de cada una de ellas recolectado; luego de ajustar su pH a 7 y colocadas en porciones de 15 mL en tubos de ensayo, para luego ser esterilizados (Autoclave Yx-280B Wincom, China) a 121°C durante 15 min (T2). Los medios de ambos tratamientos T1 y T2 fueron inoculados con el cultivo probiótico y luego incubados a 37°C de 24 a 48 h en jarra de anaerobiosis (Gas Pack Jars, System BBL Microbiology Systems Sparks, MD, EUA).

Condiciones de cultivo

La cepa de *L. reuteri* DSM 17938 se mantuvo refrigerada (White-Westinghouse, WRT143DBH, EUA) a 4°C. Para propagarla se inoculó en caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) y se incubó durante 18-24 horas a 37°C en condiciones microaerofílicas en jarra de anaerobiosis (Gas Pack, Jars, EUA) con 10 % CO₂, para luego sembrarla en agar MRS y contrastar su pureza. Las colonias aisladas fueron precultivadas dos veces en caldo durante aproximadamente 12 h a 37°C. Posteriormente se centrifugaron (5000 × g, 10 min a 4°C) y se lavaron 2 veces con solución fisiológica estéril. La suspensión bacteriana fue entonces utilizada para inocular los diferentes medios de los tratamientos sólidos (T1) y líquido (T2) utilizando 1% (v/v). La concentración microbiana inicial fue aproximadamente de 7 log UFC·mL⁻¹.

Enumeración bacteriana

Para determinar el crecimiento de *L. reuteri*, once g de cada muestra fueron pesados (Norpro digital 8633, EUA) asépticamente

en jarra estéril. Las muestras fueron homogeneizadas (Oster™ BLST4655, EUA) por 2 min después de la adición de 99 mL de agua peptonada al 0,1 % (Oxoid). Del homogeneizado se prepararon las siguientes diluciones seriadas con el mismo diluyente. Alícuotas de 1 mL, de cada muestra fueron serialmente diluidas en 9 mL de agua peptonada al 0,1 %. Cada dilución fue sembrada en profundidad por duplicado en agar MRS (Merck) e incubadas a 37°C durante 24-48 h en las condiciones mencionadas anteriormente. Se realizó el recuento de colonias y los resultados fueron expresados como log UFC·g⁻¹.

Determinación de pH

Los valores de pH fueron determinados utilizando un potenciómetro (ORION modelo 410^a, EUA), calibrado con soluciones buffer suministradas por el mismo proveedor comercial.

Análisis estadístico

El método estadístico aplicado fue análisis de varianza de una vía (ANOVA) utilizando el procedimiento Proc Mixed del paquete estadístico SAS (versión 9.0. 2001, SAS Institute Inc., Cary, NC). Cuando los efectos resultaron significativos ($P < 0,05$) se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de *L. reuteri* DSM 17938

El análisis estadístico muestra, que hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los medios de cereales y leguminosas solos y las mezclas de cereales + leguminosas. Los resultados del crecimiento de *L. reuteri* DSM 17938 observado en los diferentes medios sólidos (T1) de cereales y leguminosas y sus mezclas son presentados en la FIG. 1. El medio de cebada significativamente ($P < 0,05$), soporta un mejor crecimiento celular ($8,87 \pm 1,44$) comparado con el medio de avena, ($7,26$ log UFC·g⁻¹). Mientras que para la soya y el quinchoncho los valores fueron de $8,67 \pm 1,73$ log UFC·g⁻¹ y $7,54 \pm 0,69$ log UFC·g⁻¹, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con estudios previos, los cuales han mostrado la habilidad de medios de cereales para soportar el crecimiento de cepas de Lactobacilos y bifidobacterias de origen humano o animal en concentraciones que van entre 7 y 10 log UFC·g⁻¹ [16, 17, 18]. Por otro lado, cepas de *L. reuteri*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* fueron cultivadas en extracto de malta, cebada y trigo

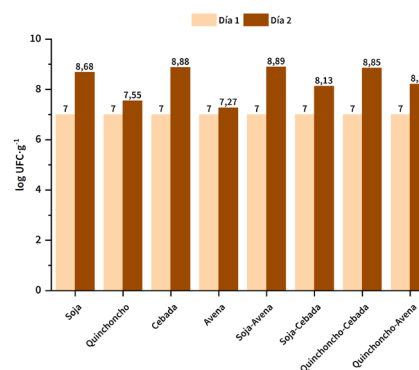


FIGURA 1. Crecimiento de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 en medio sólido. Diferencias significativas en el crecimiento con $P < 0,05$

(*Triticum aestivum*). En este estudio, se observó que el extracto de malta fue el que mejor soportó el crecimiento de los lactobacilos comparado con otros cereales, debido probablemente al elevado contenido de azúcares fermentables y a los compuestos nitrogenados de la malta [19].

En relación, al crecimiento de *L. reuteri* en los medios preparados con mezclas de cereales + leguminosas del T1 (sólido) no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) entre ellos y los valores promedios encontrados oscilaron entre $8,96 \pm 0,87$ y $8,21 \pm 0,10$ log UFC·g⁻¹. Estos resultados pueden deberse a que la combinación de cereales como avena y cebada y leguminosas como soya y quinchoncho resultó muy provechosa, pues los aminoácidos de ambos tipos de alimentos se complementan para formar una proteína completa.

Estos valores coinciden con los obtenidos en el desarrollo de un alimento funcional preparado con quinchoncho (*Cajanus cajan*), avena y *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 con resultados de 8,16 log UFC·g⁻¹ [20]. Asimismo, resultados similares han sido reportados por Kyereh y Sathivel [21] que observaron recuentos de *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 mayores de 7 log UFC·g⁻¹ en un alimento preparado con una mezcla de cereal y leguminosa: maíz (*Zea mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*). Es importante destacar que independientemente de que se utilicen solos los cereales o leguminosas o combinados, el crecimiento siempre estuvo por encima de 7 log UFC·g⁻¹.

Según se ha citado, las legumbres están ganando interés porque son excelente fuente de compuestos bioactivos, tales como flavonoides, isoflavonas y ácidos fenólicos; por lo tanto, pueden ser utilizados como ingredientes para producir alimentos con valor agregado [22]. Ingredientes alimentarios prebióticos estimulan el crecimiento de bacterias probióticas así, la combinación adecuada de prebióticos y probióticos manifiestan mayor potencial para un efecto sinérgico [23].

En este sentido, se señala que los lactobacilos, tienen requerimientos nutricionales complejos, tales como carbohidratos, aminoácidos, péptidos y vitaminas, los cuales varían mucho de especie a especie [24]. Posiblemente, la presencia de elevados niveles de factores de crecimiento esenciales, tales como aminoácidos libres, carbohidratos, vitaminas del complejo B y minerales en los medios preparados con cereales y leguminosas deben haber promovido el crecimiento de *L. reuteri*. Asimismo, los resultados concuerdan con el estudio de Barboza y col. [25], los cuales midieron el efecto de la utilización de plasma de bovino como fuente de proteína y aminoácidos sobre el crecimiento de varias cepas de lactobacilos señalando que los lactobacilos necesitan un suministro exógeno de factores de crecimiento esenciales como minerales, vitaminas y aminoácidos.

La FIG. 2 muestra los valores promedios del crecimiento de *L. reuteri* obtenidos en los medios líquidos (T2) de cereales y leguminosas. Se observa que, a pesar de las diferencias significativas ($P<0,05$) entre los medios, los valores oscilaron entre $8,34 \pm 0,23$ para el quinchoncho y para la avena con $7,69 \pm 0,65$ log UFC·mL⁻¹. Todas las mezclas mostraron un crecimiento elevado del microorganismos reportando valores promedios para la soya, + avena de $8,97 \pm 0,06$, soya + cebada con $8,62 \pm 0,79$, quinchoncho +avena $8,70 \pm 0,12$ y quinchoncho + cebada con $8,63 \pm 0,21$ log UFC·mL⁻¹.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes con reportes previos, donde se evaluó el potencial de una leguminosa en estimular el crecimiento de bacterias probióticas en un yogurt con agregado de polvo de lenteja (*Lens culinaris*), este estudio muestra, que mejora selectivamente el número de bacterias probióticas en la etapa inicial [26].

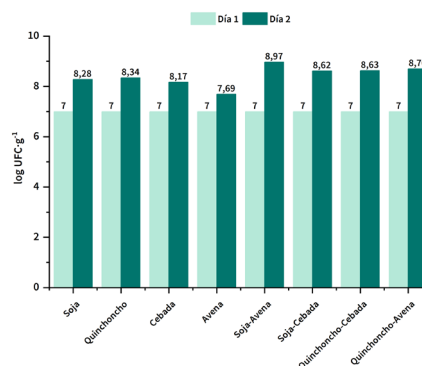


FIGURA 2. Crecimiento de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 en medio líquido. Diferencias significativas en el crecimiento con $P<0,05$

Resultados similares con una alta densidad celular (> 7 log UFC·g⁻¹) se han reportado con cepas de *Lactobacillus plantarum* DSM3326 y *Lactobacillus brevis* DSM33325 en un helado de origen vegetal preparado con harina de arroz (*Oryza sativa*), frijol y lentejas [27]. Asimismo, el crecimiento de cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* estuvo entre 7,9 y 8,5 log UFC·mL⁻¹ en bebidas preparadas con cebada y malta y mezcla de ambas. Los valores obtenidos utilizando los cereales sin mezclar fueron similares a los obtenidos en las mezclas [18].

Es importante señalar que ese estudio solo utilizó cereales y mezclas de ellos a diferencia del presente, donde las mezclas fueron de cereal + leguminosas, destacando que ciertas características de la composición del producto como contenido de aminoácidos, y oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa derivados de la soya y del quinchoncho, favorecen el crecimiento de *L. reuteri* DSM 17938.

No se mostraron diferencias significativas ($P>0,05$) entre los tratamientos utilizados (T1 medio sólido y T2 medio líquido), lo que se traduce en que ambos tratamientos son igualmente efectivos (FIG. 3). Estos resultados indican que este tipo de mezclas de cereales y leguminosas constituyen un vehículo adecuado para *L. reuteri* DSM 17938. Estas consideraciones concuerdan con la conclusión acerca de la cuidadosa selección de la matriz del alimento [28]. Es importante destacar, que la concentración de células viables después de 24 h en los medios del estudio estuvo por encima del mínimo recomendado para que un producto probiótico confiera efectos terapéuticos el cual es mínimo de 6 log UFC·mL⁻¹.

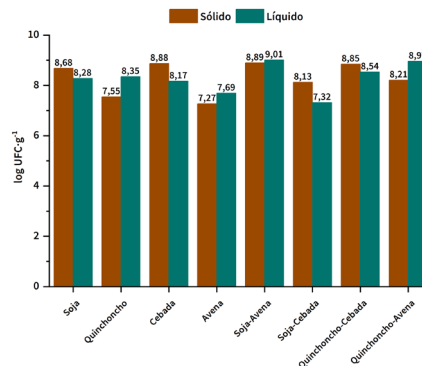


FIGURA 3. Crecimiento de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 en medio sólido y líquido. Diferencias significativas en el crecimiento con $P<0,05$

Evolución del pH

El impacto de la adición de cultivos probióticos en la acidez (pH) de los productos puede verse influenciado por el tipo de alimento y la cepa probiótica. La FIG.4 muestra los valores promedios de pH obtenidos de los medios de cereales y leguminosas T1 (medio sólido), se observa que el valor de pH obtenido en el medio de cebada fue significativamente ($P < 0,05$) menor ($3,96 \pm 0,13$) que el resto de los cereales y leguminosas.

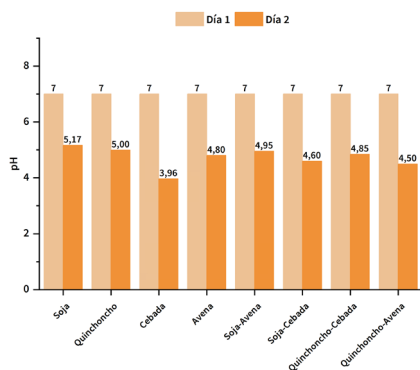


FIGURA 4. Valores de pH obtenidos en medio sólido. Diferencias significativas en los valores de pH $P < 0,05$

La reducción del pH en el medio de soja y la mezcla de soja y avena se mantuvo con valores de $5,16 \pm 0,75$ y $4,95 \pm 0,91$, respectivamente, estos valores de pH posiblemente se deben a la mayor capacidad buffer de la soja [29]. Según Charalampopoulos [19], la presencia de azúcares en los cereales podría influir en la supervivencia de las células bacterianas a pH bajo. A valores de pH bajos, los lactobacilos translocan protones de su citoplasma al medio ambiente utilizando una ATPasa a expensas de ATP

Los valores de pH obtenidos en los medios líquidos (T2) se muestran en la FIG. 5. Al igual, que en el medio sólido, el medio líquido de soja obtuvo un valor de pH mayor comparado con los demás. Por otro lado, los resultados muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) en ambos tratamientos T1 y T2 (FIG. 6). Resultados similares se han encontrado en los valores de pH de bebidas preparadas con avena, cebada y malta inoculadas con *L. reuteri* las cuales estuvieron entre 4,1 y 4,2 [30]. Al igual que los resultados obtenidos en este trabajo, estos estudios demuestran que los lactobacilos probióticos sobreviven en alimentos fermentados a valores de pH entre 3,4 y 4. Durante la fermentación, el pH disminuye con un aumento simultáneo de ácido láctico y otros ácidos orgánicos que se acumulan debido a la actividad microbiana [16].

Las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, tales como capacidad buffer y pH, son factores importantes que influyen en la supervivencia de los probióticos durante el tránsito gastrointestinal, por lo tanto, aumentan los posibles efectos probióticos. En efecto, la formulación de alimentos con rangos de pH apropiados y alta capacidad buffer aumentaría el pH del tracto gástrico y así, mejoraría la estabilidad de los probióticos, tanto en animales como en humanos [31].

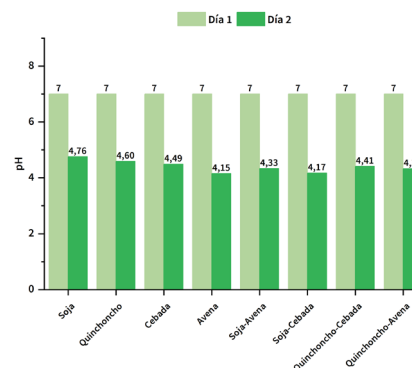


FIGURA 5. Valores de pH obtenidos en medio líquido. Diferencias significativas en los valores de pH $P < 0,05$

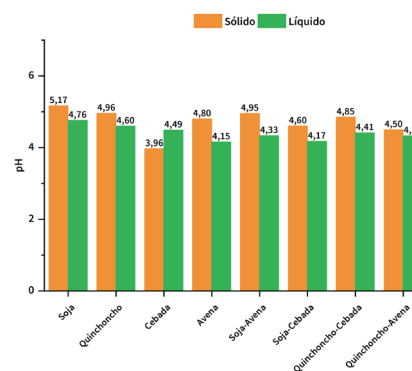


FIGURA 6. Valores de pH obtenidos en medio sólido y líquido. Diferencias significativas en los valores de pH $P < 0,05$

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación muestran que la cepa de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 es capaz de crecer significativamente en medios sólidos (T1) y líquidos (T2) a base de cereales y leguminosas, alcanzando una concentración de células viables después de 24 h por encima del mínimo recomendado ($6 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) para que un producto probiótico confiera efectos terapéuticos, tanto en humanos como en animales.

De igual forma, se muestra que la composición de las harinas utilizadas favoreció el crecimiento de la bacteria independientemente del tratamiento aplicado. La combinación de soja y avena fue la más eficiente en mantener la viabilidad reportando valores de $8,89 \pm 0,06 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. En tal sentido, la selección de ingredientes adecuados a sistemas para suministrar probióticos es un factor vital que debe ser considerado en el desarrollo de alimentos funcionales probióticos.

AGRADECIMIENTO

La autora desea expresar su agradecimiento a la Fundación Carolina por el financiamiento de la estancia corta posdoctoral en la Universidad de Córdoba (España), donde se logró avanzar en esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Gur J, Mawuntu M, Martirosyan D. FFC's advancement of functional food definition. *Funct. Foods Health Dis.* [Internet]. 2018; 8(7):385–397. doi: <https://doi.org/k43b>
- [2] Banwo K, Olojede A, Dahunsi A, Verma D, Thakur M, Tripathy S, Singh S, Patel A, Gupta A, Aquilar C, Utama G. Functional importance of bioactive compounds of foods with potential health benefits: A review on recent trends. *Food Biosci.* [Internet]. 2021; 43:101320. doi: <https://doi.org/k43c>
- [3] Mansilla F, Miranda M, Uezen J, Maldonado N, Villar M, Merino L, Vignolo G, Nader M. Effect of probiotic lactobacilli supplementation on growth parameters, blood profile, productive performance, and fecal microbiology in feedlot cattle. *Res. Vet. Sci.* [Internet]. 2023; 55:76–87. doi: <https://doi.org/k43d>
- [4] Rashid M, Sultan M. Role of Probiotics in human and animal health. *Review. J. Probiot. Health.* [Internet]. 2016; 4:1–4. doi: <https://doi.org/k43f>
- [5] Gomes A, Malaca F. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* [Internet]. 1999; 10:139–157. doi: <https://doi.org/dpdj24>
- [6] Kołodziej M, Szajewska H. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized clinical trial. *Clin. Microbiol. Infect.* [Internet]. 2019; 25:699–704. doi: <https://doi.org/gnwzzh>
- [7] Fiocco D, Longo A, Arena M, Russo P, Spano G, Capozzi V. How probiotics face food stress: They get by with a little help. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* [Internet]. 2019; 60(9):1549–7852. doi: <https://doi.org/gf5mx3>
- [8] García F, Martínez S, Franco I, Carballo J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *Intern. Dairy J.* [Internet]. 2006; 16:762–767. doi: <https://doi.org/cp2drb>
- [9] Nguyen B, Bujna E, Fekete N, Tran A, Rezessy J, Prasad R, Nguyen Q. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Front. Nutr.* [Internet]. 2019; 6:54. doi: <https://doi.org/ghgghh>
- [10] Parra K, Ferrer M, Piñero M, Barboza Y, Medina L. Use of *lactobacillus acidophilus* and *lactobacillus casei* for a potential probiotic legume-based fermented product using pigeon pea (*Cajanus cajan*). *J. Food Prot.* [Internet]. 2013; 76(2):265–271. doi: <https://doi.org/f4nnsc>
- [11] Chavan M, Mugdha Y, Waghmare R. Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. *LWT – Food Sci. Technol.* [Internet]. 2018; 91:339–344. doi: <https://doi.org/gdbwqd>
- [12] Panghal A, Virkar K, Kumar V, Dhull S, Gat Y, Chhikara N. Development of probiotic beetroot drink. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.* [Internet]. 2017; 5(3):257–262. doi: <https://doi.org/k43g>
- [13] Chakraborty M, Savita B, Kumar S. Development of fermented products with enriched fiber and micronutrients by using underutilized cereal–legume milling by-products as novel food ingredients. *Intern. J. Gastronomy Food Sci.* [Internet]. 2022; 27:100493. doi: <https://doi.org/k43h>
- [14] Venkidasamy B, Selvaraj D, Shivraj A, Ramalingam S, Ka G, Shivraj N. Indian pulses: A review on nutritional, functional and biochemical properties with future perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* [Internet]. 2019; 88:228–242. doi: <https://doi.org/gj33g9>
- [15] Havemeier S, Erickson J, Slavin, J. Dietary guidance for pulses: The challenge and opportunity to be part of both the vegetable and protein food groups. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* [Internet]. 2017; 1392(1):58–66. doi: <https://doi.org/k43j>
- [16] Charalampopoulos D, Wang R, Pandiella S, Webb C. Application of cereals and cereal components in functional foods: A review. *Intern. J. Food Microbiol.* [Internet]. 2002; 79:131–141. doi: <https://doi.org/c7kt97>
- [17] Charalampopoulos D, Pandiella S, Webb C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *Intern. J. Food Microbiol.* [Internet]. 2003; 82(2):133–141. doi: <https://doi.org/d9ndkf>
- [18] Kabeir B, Abd-Aziz S, Muhammad K, Shuhaimi M, Yazid A. Growth of *Bifidobacterium longum* BB536 in medida (fermented cereal porridge) and their survival during refrigerated storage. *Lett. Appl. Microbiol.* [Internet]. 2005; 41:125–131. doi: <https://doi.org/dst9pz>
- [19] Charalampopoulos D, Pandiella S. Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. *Lebensmittel Wissenschaft und – Technologie– Food Sci. Technol.* [Internet]. 2010; 43(3):431–435. doi: <https://doi.org/c7q335>
- [20] Barboza Y, Márquez E, Parra K, Piñero M, Medina L. Development of a potential functional food prepared with pigeon pea (*Cajanus cajan*), oats and *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Intern. J. Food Sci. Nutr.* [Internet]. 2012; 63(7):813–820. doi: <https://doi.org/k43k>
- [21] Kyereh E, Sathivel S. Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 immobilized in a cereal–legume complementary food “weanimix” with simulated gastrointestinal conditions. *BioSci.* [Internet]. 2021; 40:e100848. doi: <https://doi.org/k43m>
- [22] Turco I, Bacchetti T, Bender C, Oboh G, Zimmermann B, Ferretti G. Polyphenol content and glycemic load of pasta enriched with faba bean flour. *Funct. Food Health Dis.* [Internet]. 2016; 6: 291–305. doi: <https://doi.org/k43n>
- [23] Ranadheera R, Baines S, Adams M. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Intern.* [Internet]. 2010; 43:1–7. doi: <https://doi.org/cwcsx8>
- [24] Morishita T, Deguchi Y, Yanima M, Sakurai T, Yura T. Multiple nutritional requirements of *lactobacilli*: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* [Internet]. 1981; 148:64–71. doi: <https://doi.org/gsqzq53>
- [25] Barboza Y, Marquez E, Benitez B, Izquierdo P. Further studies on a bovine plasma medium that can be sterilized for Lactobacilli. *Rev. Cientif. FCV–LUZ.* [Internet]. 2002 [Consultado 14 May 2023]; 12(6):707–711. Disponible en: <https://bit.ly/3OuYUeM>.
- [26] Agil R, Gaget A, Gliwa J, Avis T, Hosseinian F. Lentils enhance probiotic growth in yogurt and provide added benefit of antioxidant protection. *LWT– Food Sci. Technol.* [Internet]. 2013; 50:45–49. doi: <https://doi.org/k43p>

- [27] Pontonio E, Montemurro M, Dingeo C, Rotolo M, Centrone D, Carofiglio V, Rizzello C. Design and characterization of a plant-based ice cream obtained from a cereal/legume yogurt-like. *LWT – Food Sci. Technol.* [Internet]. 2022; 161:113327. doi: <https://doi.org/k43q>
- [28] Rivera Y, Gallardo Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol.* [Internet]. 2010; 27:1–11. doi: <https://doi.org/b44s9g>
- [29] Palmfeldt J, Hahn-Hägendal B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *Intern. J. Food Microbiol.* [Internet]. 2000; 55:235–238. doi: <https://doi.org/czw2zs>
- [30] Salmerón, I., Thomas, K., Pandiella, S.S. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulations, *LWT – Food Sci. Technol.* [Internet]. 2013; 55(1):240–247. doi: <https://doi.org/f5k34b>
- [31] Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. *Immun. Cell Biol.* [Internet]. 2000; 78:80–88. doi: <https://doi.org/ff5h72>