



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

GRADO DE NUTRICIÓN HUMANA Y DIETÉTICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES
PREBIÓTICAS DE LA FIBRA DIETÉTICA
EXTRAÍDA DE RESÍDUOS DE
MANZANA**

Autora: Marta Villagarcía García

Tutoras: Dra. Irma Caro Canales, Dra. Rebeca Pérez Fernández

Curso académico: 2024/2025

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

FD: Fibra Dietética

FS: Fibra Soluble

FI: Fibra Insoluble

HCO: hidratos de carbono

GalA: ácido d- galacturónico

HG: HomogalacturonanO

RG-1: Ramnogalacturonano tipo 1

RG-II: Ramnogalacturonano tipo II

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

BAL: bacterias ácido- lácticas

FOS: Fructooligosacáridos

XOS: Xilooligosacáridos

GOS: Galacto-oligosacáridos

ISAPP: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

YE: extracto de levadura

TSB: Caldo Triptona Soja

MRS: Agar Man Rogosa y Sharpe (Labkem, Barcelona, España)

RCM: Reinforced Clostridial Medium

ISP: Instituto de Procesos Sostenibles

MRSmM: Medio MRS modificado con bagazo de zumo de manzana

MRSmS: Medio MRS modificado con bagazo de manzana de sidra

MRSmP: Medio MRS modificado con pectina comercial

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight

HCCA: alfa-ciano-4-hidroxicinámico

ufc: unidades formadoras de colonias

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1: microorganismos utilizados y sus condiciones de cultivo óptimas.

Tabla 2: interpretación de la puntuación para la asignación de especie y género generado por MALDI BioTyper

Tabla 3: viabilidad (TSB+YE) y actividad prebiótica (MRSmZ) de diversos microorganismos probióticos.

Tabla 4: identificación por MALDI-TOF y propiedades morfológicas de microorganismos probióticos.

Tabla 5: . Recuentos microbianos de diversos microorganismos probióticos en medio MRS modificado con pectina comercial (MRSmP), medio MRS modificado con bagazo de zumo de manzana (MRSmZ) y medio MRS modificado con bagazo de sidra de manzana (MRSmS).

Figura 1: condiciones de recuperación de cepas bacterianas.

Figura 2: valores de pH del crecimiento de microorganismos probióticos usando distintos tipos de fibra (pectina comercial; sidra: fibra obtenida de bagazo de sidra de manzana; zumo: fibra obtenida de bagazo de zumo de manzana) en MRS modificado. Superíndices con distinto tipo de letra en la columna indica diferencias significativas de las medias ($p < 0,05$).

Figura 3: Crecimiento de *L. reuteri* en medio MRS modificado con bagazo de manzana de sidra. El modelado se hizo usando DMFit Web Edition (Baranyi & Roberts, 1994) ($R^2=0.985$).

RESUMEN

Las bacterias probióticas son ampliamente utilizadas para la elaboración de alimentos fermentados, pero también como suplementos probióticos. Estas bacterias bajo condiciones óptimas pueden contribuir a la funcionalidad del alimento mediante la metabolización de diferentes sustratos y la producción de metabolitos beneficiosos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la viabilidad y la actividad probiótica de diversas bacterias probióticas, utilizando como sustrato tres medios modificados con distintos tipos de fibra dietética, con el fin último de identificar posibles combinaciones simbióticas. Para ello se estudiaron cuatro cepas probióticas en medio de cultivo estándar y medios de cultivo modificados con fibra dietética proveniente de bagazo de manzana de zumo y de manzana de sidra, evaluando su crecimiento y viabilidad; además, se llevó a cabo un estudio de la cinética de crecimiento con la cepa *Limosilactobacillus reuteri*.

Los resultados indicaron que las BAL estudiadas (*Limosilactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis*, *Lactiseibacillus rhamnosus* GG y *Lactiplantibacillus plantarum*) pueden crecer utilizando únicamente como fuente de HCO las fibras procedentes de los bagazos de manzana. Además, *Limosilactobacillus reuteri* junto con la fibra dietética proveniente del bagazo de manzana de zumo podría usarse para elaborar un producto simbiótico.

En conclusión, la fibra dietética derivada del bagazo de manzana, tanto de sidra como de zumo, puede funcionar como un prebiótico eficaz para las cepas probióticas estudiadas, favoreciendo su crecimiento y abriendo nuevas posibilidades para el desarrollo de alimentos funcionales y suplementos con beneficios nutricionales y para la salud. Además, el uso de este tipo de residuos impulsa la economía circular al transformar desechos en nuevos productos.

Palabras clave: Probióticos; fibra dietética; bacterias ácido-lácticas; bagazo de manzana.

ABSTRACT

Probiotic bacteria are widely used in the production of fermented foods, as well as in probiotic supplements. Under optimal conditions, these bacteria can contribute to the functionality of food by metabolizing different substrates and producing beneficial metabolites. This study aimed to evaluate the viability and probiotic activity of various probiotic bacteria, using three modified media with different types of dietary fiber as substrates, with the ultimate goal of identifying potential synbiotic combinations.

To this end, four probiotic strains were studied in standard culture media and in media modified with dietary fiber derived from apple pomace from juice and cider production, assessing their growth and viability. Additionally, a growth kinetics study was conducted using the strain *Limosilactobacillus reuteri*.

The results indicated that the studied lactic acid bacteria (LAB) (*Limosilactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, and *Lactiplantibacillus plantarum*) can grow using only the fibers from apple pomace as their carbon source. Moreover, *Limosilactobacillus reuteri* combined with dietary fiber from juice-derived apple pomace could be used to develop a synbiotic product.

In conclusion, dietary fiber derived from apple pomace—both from cider and juice—can serve as an effective prebiotic for the probiotic strains studied, promoting their growth and opening new opportunities for the development of functional foods and supplements with nutritional and health benefits. Furthermore, the use of this type of waste supports the circular economy by transforming residues into new products.

Keywords: Probiotics; dietary fiber; lactic acid bacteria; apple pomace

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	6
1.1.	La fibra dietética.....	7
1.1.1.	Propiedades fisiológicas funcionales de la fibra dietética	9
1.2.	Bacterias ácido-lácticas y fermentación	10
1.3.	Oligosacáridos	11
1.4.	Probióticos, prebióticos y simbióticos.....	13
2.	JUSTIFICACIÓN	15
3.	OBJETIVOS	16
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1.	Materiales	17
4.1.1.	Cepas utilizadas	17
4.1.2.	Fibras dietéticas utilizadas.....	18
4.1.3.	Medios de cultivo.....	18
4.2.	Métodos	19
4.2.1.	Recuperación de las cepas	19
4.2.2.	Caracterización de las cepas por MALDI- TOF.....	20
4.2.3.	Crecimiento bacteriano en fibras dietéticas	21
4.2.4.	Recuento del crecimiento bacteriano.....	21
4.2.5.	Cinética de crecimiento	22
4.2.6.	Análisis estadístico del crecimiento bacteriano.....	22
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1.	Crecimiento bacteriano	23
5.2.	Caracterización de las cepas mediante MALDI-TOF.....	24
5.3.	Recuento microbiano de bacterias probióticas	26
5.4.	Cinética microbiana	29
6.	CONCLUSIONES.....	31
7.	BIBLIOGRAFÍA	32

1. INTRODUCCIÓN

El término “fibra dietética” (FD) fue acuñado por Hipsley in 1953 cuando descubrió la relación entre un bajo consumo de fibra dietética y un incremento de la toxemia en mujeres embarazadas, pero el reconocimiento de sus beneficios para la salud se aprecia desde la antigüedad cuando en 430 a.C. Hipócrates describió los efectos laxantes del trigo grueso en comparación con el trigo refinado; ya en la década de 1920 J.H.Kellogg publicitó los atributos de la fibra, reivindicando su beneficio tanto como laxante como en la prevención de enfermedades .

Numerosas enfermedades crónicas no transmisibles, como la obesidad, la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares; se encuentran estrechamente relacionadas con los hábitos alimentarios; en las últimas décadas, la prevalencia de estas patologías ha aumentado de forma significativa, lo que ha despertado un creciente interés por el papel de la dieta como herramienta preventiva en el ámbito de la salud pública; es por ello, que la FD ha adquirido una especial importancia, ya que puede modular positivamente la microbiota intestinal y ejercer efectos beneficiosos sobre la salud metabólica, digestiva e inmunitaria (Lichtenstein AH, 2021). El consumo de fibra dietética, proveniente principalmente de alimentos de origen vegetal, se asocia con una mejora de la función intestinal y una reducción del riesgo de padecer enfermedades crónicas. El intestino grueso, que tan solo representa una quinta parte de la longitud del tracto gastrointestinal, desempeña un papel clave en este proceso; en él se concentra la mayor parte del proceso de digestión, ya que en esta parte del intestino el proceso de digestión puede alcanzar hasta 10 h en personas sanas (Fallingborg J, 2004). Esto permite una interacción prolongada entre la fibra dietética y la microbiota intestinal, promoviendo la fermentación de la fibra dietética, y así, la producción de metabolitos bioactivos, que desempeñan un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal y la salud del individuo. (Saloni Gill P. I., 2018)

1.1. La fibra dietética

Según la definición de la FAO, la fibra dietética es cualquier material comestible de origen vegetal o animal que no sea hidrolizado por las enzimas endógenas del tracto digestivo humano y pueda ser fermentada en el intestino grueso (Slavin, 2013). Recientemente, a esta definición se han incluido los análogos de los vegetales que pueden ser extraídos de las plantas o sintéticos que resistan la digestión del intestino delgado y puedan ser fermentados en el intestino grueso (Philippa Stribling, 2023). La FD incluye componentes estructurales de la pared de las células vegetales como celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina, así como componentes no estructurales como gomas, mucílagos, polisacáridos de algas y celulosa modificada (OMS, 2025 (Deepak Mudgil, 2013) (Johnson W McRorie Jr, 2017).

Desde el punto de vista funcional, la fibra puede clasificarse en dos grandes grupos en función de su solubilidad en agua:

- a. La fibra insoluble (FI) que tiene como función principal en el organismo aumentar el peristaltismo, aumentar la masa fecal, y como consecuencia reducir la formación y actuación de sustancias carcinógenas en el colon (Christo Opperman, 2025); está formada por:
 - **Celulosa:** es un polímero de glucosa unida en posición β (1-4), es insoluble y sin cadenas laterales (Slavin, Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits, 2013)
 - **Hemicelulosas:** son polímeros de pentosas y hexosas, con cadenas laterales en las que se presentan diferentes azúcares y ácidos glucurónicos (existen alrededor de 250 diferentes tipos de hemicelulosas) (Slavin, 2013).
 - **Lignina:** es un polímero no polisacárido que contiene unidades de fenilpropano derivados de los alcoholes sinapílico, coniferílico y cumarílico (Slavin, 2013).
- b. La fibra soluble (FS) es capaz de retener agua en su matriz, generando una mezcla viscosa que es responsable de retener nutrientes como los hidratos de carbono (HCO), materia grasa e incluso sustancias carcinógenas. La FS está formada principalmente por:
 - **Gomas:** son exudados formados en el sitio de injuria de las plantas, constituyen un grupo complejo de polisacáridos que contienen ácido glucurónico y galacturónico, así como xilosa, galactosa y manosa (Christo Opperman, 2025).

- **Mucílagos:** están generalmente dispersos en el endosperma y se mezclan con los polisacáridos digeribles, la utilidad que le prestan a la planta es de reserva energética y proveer de humedad a la semilla (Christo Opperman, 2025).
- **Pectinas:** son heteropolímeros ramificados, formados por una estructura lineal de unidades de ácido d- galacturónico (GalA) con enlaces α (1-4) que pueden acetilar y/o metilarse aleatoriamente. Estas estructuras lineales forman parte de la “región lisa” de las pectinas, que ocasionalmente se ve interrumpida por “regiones pilosas” caracterizadas por ramificaciones compuestas por azúcares neutros: Homogalacturonano (HG), Ramnogalacturonano tipo 1 (RG-I) y Ramnogalacturonano tipo II (RG-II) (Christo Opperman, 2025).

Organismos internacionales como la EFSA y la Academia Nacional de Medicina de EE. UU recomiendan una ingesta diaria de fibra dietética entre 28-30 g/día en adultos, preferiblemente a partir de una combinación de fibras solubles e insolubles. Esta cantidad ha demostrado efectos beneficiosos en humanos sobre patologías metabólicas, como la diabetes tipo 2; digestivas, como la diverticulosis; y cardiovasculares, como la enfermedad coronaria (Johnson W. McRorie Jr. PhD N. M., 2017); además, ayuda a un mantenimiento más efectivo del peso corporal (Baltasar Ruiz-Roso Calvo de Mora, 2010). Sin embargo, en España se ha visto una notable disminución del consumo de fibra en los últimos años, encontrando una ingesta media de fibra entre los 18-20 g/día. Esta disminución en el consumo de fibra no solo se observa en España, sino que existe una tendencia decreciente de forma lenta y progresiva; por ejemplo, tan solo el 9% de los adultos del Reino Unido llega al consumo recomendado (Philippa Strabbling, 2023). Aunque en los últimos años se ha promovido el enriquecimiento de alimentos con fibras añadidas -como inulina u oligosacáridos-, para aumentar la ingesta diaria de fibra; esta estrategia resulta insuficiente por sí sola, ya que, para lograr un impacto real sobre la salud pública, es fundamental complementar el consumo de alimentos fortificados con productos naturalmente ricos en fibra, como frutas, verduras, legumbres o cereales integrales.

1.1.1. *Propiedades fisiológicas funcionales de la fibra dietética*

Las propiedades fisiológicas funcionales de la fibra son las capacidades específicas que tiene la fibra dietética para ejercer efectos que beneficien al organismo. Estas propiedades dependen del tipo de fibra, así como de su estructura química o su capacidad para interactuar con la microbiota.

a) Fibra insoluble: gracias a su capacidad para aumentar el volumen fecal, su principal propiedad funcional, como previamente se ha indicado, es estimular el peristaltismo (aumentan las contracciones musculares coordinadas que impulsan el contenido del tracto digestivo) debido a la producción de metabolitos que irritan el intestino, como ácidos grasos de cadena corta, lo que reduce el tiempo de tránsito intestinal, previniendo y tratando el estreñimiento. La FI, también ayuda a disminuir el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal al disminuir el tiempo de contacto de las sustancias carcinógenas (como aminas heterocíclicas) con la mucosa intestinal, evitando su absorción (Johnson W. McRorie Jr. PhD N. M., 2017). Destacar también la propiedad de intercambio iónico entre la fibra y las células intestinales. Otra función que se ha visto de la FI es que tiene la capacidad de adsorber colesterol y ácidos biliares, lo que contribuye a reducir la absorción intestinal de lípidos y colesterol, aunque no sería su función principal (Cheickna Daou, 2013) (Deepak Mudgil, 2013). Por otra parte, se han encontrado propiedades antioxidantes en la FI, ya que los polisacáridos conjugados con compuestos fenólicos mejoran la actividad antioxidante captando radicales libres, en especial compuestos carbonílicos. Además, es posible que la FI pueda estar implicada en otras acciones biológicas en beneficio de la salud, como un mayor aporte de antioxidantes no fenólicos (vitamina E, magnesio) y fitoesteroles, que pueden contribuir no solo a mejorar el perfil lipídico, sino también a disminuir las concentraciones de fibrinógeno y la función endotelial.

b) Fibra soluble: este tipo de fibra tiene la capacidad de formar soluciones viscosas en el tracto gastrointestinal, retrasando el vaciamiento gástrico, así como la absorción de nutrientes. Esto contribuye a mejorar el control glucémico postprandial, además de reducir los niveles de colesterol sérico al inhibir la reabsorción de ácidos biliares (Johnson W McRorie Jr, 2017) (Perspectives, 2022). Otra de las propiedades funcionales de la FS es modular la abundancia y la diversidad de la microbiota intestinal al ser

metabolizada por esta. En esta fermentación se producen productos beneficiosos, como son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que reducen el riesgo de desarrollar síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad diverticular, estreñimiento funcional, incontinencia fecal o cáncer colorrectal (Zhi-Wei Guan, 2021).

1.2. Bacterias ácido-lácticas y fermentación

Las bacterias ácido- lácticas (BAL) son un tipo de bacterias grampositivas, que incluyen cocos, cocobacilos y bacilos no esporuladas. Son microorganismos anaerobios microaerófilos, y presentan una notable diversidad tanto a nivel de especies como de cepas. Su principal característica es la capacidad de producir ácido láctico como metabolito principal en la fermentación de hidratos de carbono, lo que acidifica el medio e inhibe el crecimiento de microorganismos competidores. Esto favorece su aplicación en la conservación de alimentos (Council, 1999).

Según el tipo de fermentación que realizan, podemos clasificar las BAL en homofermentativas, aquellas que sólo producen ácido láctico, y heterofermentativas, aquellas que producen varios compuestos, como etanol, CO₂ o ácido acético (Huertas, 2021). Algunas BAL, como diversos géneros de la familia *Lactobacilli* y *Bifidobacterium*, metabolizan polisacáridos y oligosacáridos no digeribles, como pectinas y hemicelulosas, produciendo AGCC como acetato, propionato y butirato. Estos compuestos son fundamentales para la salud intestinal ya que se ha demostrado que los AGCC sirven como fuente de energía para los colonocitos sanos, promueven la motilidad gastrointestinal, modulan la inflamación a través de las células T reguladoras e inhiben la carcinogénesis del colon (Division of Gastroenterology & Hepatology, 2023). Además, la mayoría de las BAL han sido designadas como Generally Recognised as Safe (GRAS) para el consumo humano, es decir, se consideran seguras para su consumo humano. Esta designación fue otorgada por el "Panel de peligros biológicos" de la EFSA que excluye especies patógenas, como el género *Enterococci* (Council, 1999).

La actividad de las BAL en los productos fermentados puede considerarse como la transformación de materias primas en productos comestibles con características distintas. Gracias a su amplio uso como cultivos iniciadores en procesos de fermentación, contribuyen a la conservación y mejora del sabor en una gran variedad de alimentos, como productos lácteos, carne, vegetales y cereales . Esta mejora de

las características sensoriales se debe a tres procesos: la glucólisis, una vía que principalmente deriva en la fermentación de azúcares en ausencia de oxígeno; la lipólisis, proceso en el cual se rompen moléculas complejas de grasa; y la proteólisis, que consiste en la rotura de proteínas. En estos procesos se generan alcoholes, ácidos, ésteres, compuestos azufrados, aminoácidos y aldehídos, siendo todos ellos los responsables de los sabores específicos que se generan (Yi Wang, 2022).

Además de los cambios organolépticos que producen las BAL, también se les atribuye la capacidad de conservar alimentos por su capacidad de producir ácido láctico, lo que disminuye el pH del alimento, es por todo esto, que podemos encontrar distintas cepas de BAL en productos lácteos (yogures, quesos), vegetales (aceitunas), masas de pan o carnes fermentadas (salchichón, pepperoni) (Yi Wang, 2022).

Las BAL son capaces de modular la microbiota intestinal humana mediante la competición por nutrientes, y la producción de compuestos antimicrobianos, lo cual limita la disponibilidad de sustratos a microorganismos patógenos, lo que favorece el predominio de bacterias beneficiosas (Vanessa Liévin-Le Moal, 2014).

Por lo tanto, el papel que las BAL desempeñan en la fermentación de la fibra dietética, en concreto en la fermentación de oligosacáridos, es fundamental para la salud intestinal debido a la producción de diversos metabolitos como AGCC, ácido láctico, CO₂, entre otros.

1.3. Oligosacáridos

Los oligosacáridos son compuestos de bajo peso molecular derivados de los carbohidratos que contienen entre 3-9 monosacáridos, con excepción de la inulina que puede contener más de 60 moléculas de monosacáridos. Existe una amplia variedad de oligosacáridos según el tipo de monosacárido predominante en su cadena principal (Slavin, 2013):

- **Fructooligosacáridos (FOS):** son oligosacáridos de cadena corta con fructosa como monosacárido principal, que han demostrado aumentar la población de bifidobacterias fecales incluso con un consumo relativamente bajo (5-8 g por día). Se caracterizan por su rápida fermentación en el colon en comparación con otras fibras de cadena más larga. Los FOS durante este

proceso actúan como prebióticos, ya que favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas (*Bifidobacterium* y *B. longum*) y promueven la producción de AGCC. La velocidad de fermentación de los FOS está determinada por su longitud de cadena, siendo los FOS de cadena corta (3-5 carbonos) los que más rápidamente fermentan, lo cual podría tener implicaciones en la sensación de saciedad a corto plazo (Slavin, 2013).

- **Xilooligosacáridos (XOs):** son oligosacáridos derivados del xilano, producidos por hidrólisis enzimática. Son altamente resistentes a la hidrólisis de las enzimas gastrointestinales y a los ácidos gástricos, lo que les permite atravesar el tracto gastrointestinal superior sin ser degradados; así, llegan intactos al intestino grueso, donde son metabolizados por bacterias probióticas, principalmente del género *Bifidobacterium* y algunas especies de la familia *Lactobacilli*. Son usados por bacterias como *el Lactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium. longum* o *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*. Todos ellos utilizan los XOs en distintas proporciones, produciendo ácido láctico, acético y propiónico (Slavin, 2013).
- **Galacto-oligosacáridos (GOS):** son oligosacáridos no digeribles en el intestino delgado caracterizados por variar en su grado de polimerización y en los enlaces glucosídicos. Los GOS contienen galactosa, como resultado de la actividad de transgalactosilación de una β -galactosidasa. Se han descrito diversos efectos saludables asociados a los GOS, como el estímulo del crecimiento de bacterias beneficiosas (Bifidobacterias y Lactobacilos), la inhibición de la adhesión de patógenos y la mejora de la función de la barrera intestinal (Valentina Ambrogi 1 2, 2023)
- **La inulina** es un tipo de fibra dietética soluble, pertenece a la categoría de los fructanos, compuesta principalmente por cadenas de fructosa (entre 2 y 60 moléculas) unidas principalmente por enlaces β (2-1), aunque no exclusivamente. Este grado de polimerización está relacionado con su origen, por ejemplo, la inulina procedente de la achicoria tiene un grado de polimerización entre 10 y 20 moléculas, y a su vez, según su grado de polimerización puede ser o no digerible. Este oligosacárido es fermentado rápidamente en el colon proximal (Philippa Striblinga, 2023)

1.4. Probióticos, prebióticos y simbióticos

El término «**probiótico**» proviene del latín «pro», que significa «para», y del griego «bios», que en conjunto significan «para la vida». Los probióticos se definen como «microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, aportan un beneficio para la salud del huésped». Esta definición fue propuesta por un panel de expertos consensuado por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, 2020).

Los probióticos pueden ser administrados por distintas vías (oral, intravaginal, tópica); aunque lo más común es a través de los alimentos, como el yogur, o como suplementos nutricionales. Estos compuestos forman parte de diversas categorías regulatorias (alimentos, suplementos dietéticos, fórmulas infantiles, medicamentos y dispositivos médicos) y se dirigen a diferentes huéspedes (humanos, animales y peces), presentando múltiples mecanismos de acción. Los fármacos probióticos, también conocidos como agentes bioterapéuticos vivos, también están disponibles en algunas regiones geográficas, conocidos también como farmabióticos (ISAPP, 2020).

Las especies más utilizadas como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces*, aunque también se emplean otras como *Streptococcus* (Fijan, 2014).

Por otra parte, los **prebióticos** son sustratos que son utilizados, selectivamente, por microorganismos del hospedador, confiriendo un efecto beneficioso para la salud; mejoran la función digestiva al regularizar el tránsito intestinal, promueven el sistema inmune, mejoran la absorción de minerales y contribuyen a regular el apetito, el balance energético y el metabolismo de la glucosa (ISAPP, 2020). Se caracterizan por:

- Ejercer efectos beneficiosos mediante la alteración específica de la composición o de la función de la microbiota intestinal.
- Pueden encontrarse de modo natural en los alimentos, y son agregados a algunos suplementos dietéticos y alimentos, incluyendo alimentos infantiles.
- La mayoría de ellos son fibras alimentarias (ISAPP, 2020).

Se ha visto que los oligosacáridos, disacáridos, polisacáridos, almidones resistentes y polioles de azúcar tienen potencial prebiótico, ya que cumplen los criterios necesarios para considerarse prebióticos: son resistentes a la acidez gástrica y a las

enzimas, son susceptibles de ser fermentados por las bacterias intestinales y tienen la capacidad de mejorar la viabilidad o la actividad de microorganismos beneficiosos (Malaiporn Wongkaew, 2022).

Además de los probióticos y prebióticos, debemos tener en cuenta los compuestos **simbióticos**, que se definen según la ISAPP como «mezcla de microorganismos vivos y sustratos utilizados selectivamente por los microorganismos del hospedador, al que le confiere un beneficio para la salud».

Los simbióticos se pueden formular de dos maneras:

- Simbióticos complementarios: son una mezcla de probióticos y prebióticos. Cada uno de ellos actúa de forma independiente para conseguir uno o varios beneficios para la salud.
- Simbióticos sinérgicos: son una mezcla de un sustrato utilizado selectivamente y un microorganismo vivo, elegidos por su capacidad de proporcionar un efecto saludable. Los componentes que comprenden los simbióticos sinérgicos trabajan juntos para otorgar uno o varios beneficios para la salud (ISAPP, 2020).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el consumo de fibra dietética en la población general es significativamente inferior a las recomendaciones nutricionales, y esto está asociado con diversas enfermedades crónicas, es necesario buscar vías para obtener nuevos aportes de fibra dietética. Este trabajo se enfoca en el estudio del potencial simbiótico entre fibras dietéticas obtenidas a partir de bagazo de manzana, tanto manzanas de sidra como manzanas de zumo, y bacterias probióticas.

El aprovechamiento de estos subproductos permite elaborar alimentos funcionales que aumentan la gama de este tipo de alimentos vegetales que son demandados por la población, ya que se percibe que el consumo de este tipo de alimentos puede mejorar la salud.

Además, estos subproductos también promueven la economía circular, reduciendo la producción de desechos y los costes de producción.

3. OBJETIVOS

El Objetivo general de este trabajo es evaluar el bagazo de manzana, tanto de sidra como de zumo, como sustrato para el crecimiento de bacterias probióticas.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Evaluar el crecimiento de distintas cepas probióticas en un medio convencional (TSB+YE) y un medio experimental modificado con distas fibras.
2. Determinar la idoneidad del bagazo de manzana como única fuente de HCO para el crecimiento de las cepas probióticas estudiadas.
3. Llevar a cabo estudios de cinéticas de crecimiento para evaluar la posible producción de productos simbióticos con el bagazo de manzana.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Cepas utilizadas

Las bacterias lácticas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares DSMZ, y de la colección de cepas de la Dra. Irma Caro Canales, aisladas de quesos mexicanos; todas las cepas que se van a utilizar son consideradas probióticas.

Las bacterias fueron conservadas en caldo triptona soja (TSB) con 0,5 % de extracto de levadura (YE) (Oxoid) en 50% de glicerol (VWRÒ chemicals) y mantenidas a -80°C. Las cepas fueron recuperadas usando el medio de cultivo apropiado (ver Tabla 1).

Tabla 1: microorganismos utilizados y sus condiciones de cultivo óptimas.

“*” bacterias consideradas probióticas por la ISAPP

Microorganismo	Temperatura (°C)	Medio de cultivo	Atmósfera	Tiempo de incubación (h)
<i>Lactocaseibacillus casei</i> *	37°C	MRS	Aerobia	24
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> *	37°C	MRS	Aerobia	24
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> *	37°C	MRS	Aerobia	24
<i>Lactococcus lactis</i>	37°C	M17	Aerobia	24
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> *	37°C	MRS	Aerobia	48
<i>Bifidobacterium longum</i>	37°C	RCM	Anaerobia	24
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG	37°C	MRS	Aerobia	24
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> *	37°C	MRS	Aerobia	24

4.1.2. Fibras dietéticas utilizadas

El proceso de obtención de las dos fibras dietéticas empleadas en este trabajo (fibra de bagazo de zumo de manzana y fibra de bagazo de sidra de manzana) se realizó en colaboración con el grupo de Tecnología de Procesos Químicos y Bioquímicos del Instituto de Procesos Sostenibles (ISP) de la Universidad de Valladolid (UVa) en sus laboratorios ubicados en el Escuela de Ingenieros Industriales Sede Mergelina.

El primer paso para obtener las fibras de manzana de sidra y de manzana de zumo fue el prensado de las manzanas, posteriormente, este prensado se molió con una licuadora eléctrica hasta obtener un tamaño de partículas uniforme. Tras el secado y la molienda, se preparó una mezcla combinando 5,45 g de pulpa de manzana en 50 mL de agua destilada (10% p/v). Este material fue sometido a un proceso de extracción asistido por microondas, utilizando un reactor cerrado (reactor Multiwave PRO SOLV de ANTON PAAR). Después se realizó un calentamiento, incrementando 6°C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 139°C, durante el proceso se controlaron tanto la presión como la temperatura. Al finalizar todo el proceso, la mezcla se enfrió hasta los 55°C. El residuo sólido y el líquido fueron separados mediante filtraciones al vacío. Con la fracción líquida se hace un proceso de extracción por membrana en la que se mezclan dos partes de agua con una parte de residuo líquido, se filtra la mezcla por diferentes filtra finalizando con un filtro de 0.22 µM. Este último filtrado se concentra cuatro veces a través de una membrana (Cytiva Minimate de Cytiva OAPMPUNV). Posteriormente este concentrado se conservó 48 h a -20°C, y después se introdujo en el liofilizador durante 3 días. Estas fibras obtenidas fueron conservadas a temperatura ambiente hasta su uso en el crecimiento microbiano.

La tercera fibra utilizada en este experimento fue pectina comercial, que fue distribuida por Special *Ingredients de Garlenda* (Italia).

4.1.3. Medios de cultivo

En los ensayos se utilizaron tres tipos de medios de cultivo según se indica en la Tabla 1: MRS (Labkem, Barcelona, España), RCM (Acros Organics, Geel, Bélgica) y M17 (Oxoid, Hampshire, Reino Unido). Para la preparación de los medios de cultivo se siguieron las instrucciones del fabricante.

En algunos ensayos se emplea medio MRS modificado (MRSm) en el que se sustituye la glucosa de medio MRS original por fibra alimentaria. Los componentes del medio MRS modificado son:

- 8 g/L de extracto de carne
- 10 g/L de peptona de caseína
- 0,2 g/L de sulfato de magnesio heptahidrato
- 2 g/l de dipotasio hidrógeno sulfato
- 0,04 g/L de sulfato de manganeso monohidratado
- 1 g/L de tween 80 (polisorbato)
- 2 g/L de triamonio de citrato
- 4 g/L de extracto de levadura
- 5 g/L de acetato de sodio
- 52.2 g/L de fibra alimentaria

La nomenclatura utilizada para estos medios fue:

- Medio MRS modificado con bagazo de zumo de manzana: MRSmZ
- Medio MRS modificado con bagazo de manzana de sidra: MRSmS
- Medio MRS modificado con pectina comercial: MRSmP

Para elaborar medio Agar MRS, M17 o RCM se añaden 16 g/L de agar bacteriológico (Oxoid) a los medios de cultivo anteriores.

4.2. Métodos

4.2.1. Recuperación de las cepas

Las cepas fueron recuperadas según la Figura 1. Se sembraron 10 µL de las cepas conservadas a -80°C en 950 µL de caldo TSB suplementado con 0,5% de YE. Tras la siembra se incubaron en una estufa a 37°C durante 24h. Algunas cepas requirieron un segundo pase de 24h. Posteriormente, las cepas se sembraron en su medio correspondiente (ver Tabla 1) usando la técnica de siembra de microgotas. Tras la siembra, las bacterias se incubaron a 37°C durante 24 h.

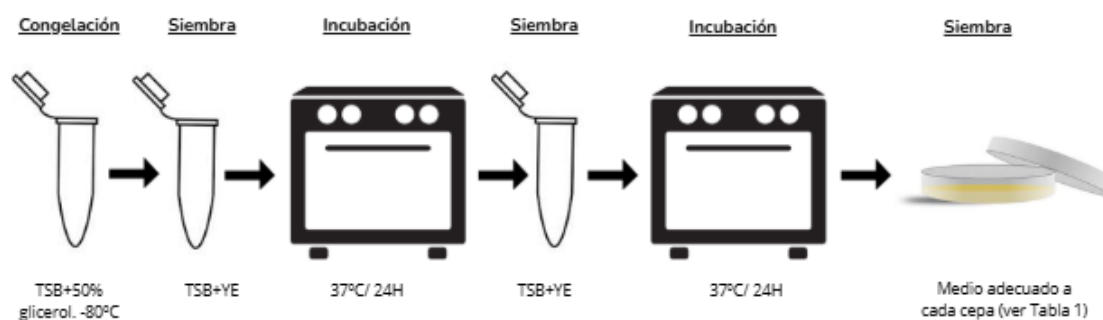


Figura 1. Condiciones de recuperación de cepas bacterianas. Fuente: elaboración propia.

4.2.2. Caracterización de las cepas por MALDI- TOF

Previo a la realización del estudio, para comprobar que las cepas estaban correctamente identificadas, se llevó a cabo un análisis con la ayuda de Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization- Time of Flight (MALDI-TOF) acoplado a un espectrómetro de masas, utilizando el método de transferencia extendida y siguiendo las recomendaciones de (Mirás Vázquez, 2019).

Brevemente se tomó una colonia de cada uno de los microorganismos descritos en la Tabla 1, que habían sido incubados durante 24 h en condiciones de crecimiento (ver Tabla 1), la colonia fue depositada en una placa de MALDI-TOF. Posteriormente se agregó 1 µL de ácido fórmico (80% v/v) y a continuación se agregó 1 µL de matriz HCCA (alfa-ciano-4-hidroxicinámico). La mezcla se dejó secar y se introdujo en el equipo antes mencionado. La medida de las masas y la identificación de los microorganismos se llevaron a cabo siguiendo las indicaciones de (Mirás Vázquez, 2019). Para la identificación microbiana se utilizó el programa BioTyper (Bruker) que se basa en la comparación de las masas de las proteínas de los microorganismos con las recogidas en la biblioteca de referencia de MALDI BioTyper, empleando un algoritmo de comparación integrado en el programa.

Dependiendo del grado de similitud entre el espectro analizado y los registros disponibles en la biblioteca de referencia, se asignó una puntuación (score). Según el valor obtenido se representó con un color y un símbolo (ver Tabla 2). Una puntuación entre 1,7 y 1,99 sugiere una probabilidad alta de identificación del género, pero se requiere una puntuación superior a 2,0 para considerar la identificación como segura (ver Tabla 2).

Tabla 2. Interpretación de la puntuación para la asignación de especie y género generado por MALDI BioTyper.

Score	Descripción	Símbolo	Color
2,300-3,000	Identificación de especie altamente probable	(+++)	Verde
2,000-2,299	Identificación segura de género y probable de especie	(++)	Verde
1,700-1,999	Identificación probable de género	(+)	Amarillo
0,000-1,699	Identificación no fiable	(-)	Rojo

Fuente: elaboración propia a partir de la información obtenida del proveedor (User Manual., 2012).

4.2.3. Crecimiento bacteriano en fibras dietéticas

Se evaluó el crecimiento de cuatro cepas bacterianas (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Limosilactobacillus reuteri*) en tres tipos de fibras dietéticas distintas, utilizando el medio MRS modificado ver apartado 3.1.3.

Brevemente, las cepas fueron sembradas en TSB + 0,05% YE e incubadas en las condiciones óptimas de crecimiento durante 24 h (ver Tabla 1), 60 µL del cultivo de 24 horas fueron inoculados en el medio MRS modificado (con distintas de fibras dietéticas) lo que permite alcanzar una concentración inicial de 10^6 ufc/mL, posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después de 24 h de incubación se observó el crecimiento mediante turbidez y mediante la formación de un depósito en el fondo del tubo eppendorf. Se consideró que las cepas crecieron cuando el medio no estaba transparente y/o presentaba depósitos. La evaluación del crecimiento se realizó por duplicado.

4.2.4. Recuento del crecimiento bacteriano

El recuento microbiano se realizó en Agar MRS (Labkem, Barcelona, España). Para ello se realizaron diluciones seriadas apropiadas en agua de peptona (0,65% de NaCL p/v y 0,01% peptona bacteriológica p/v), para poder contar entre 10-100 colonias por gota. La siembra se llevó a cabo por el método de recuento por microgota, siguiendo las recomendaciones de (Sabater, 2024). Las placas fueron incubadas en las condiciones óptimas para cada cepa (ver Tabla 1).

Tras la incubación, se realizó el recuento de las colonias formadas en cada una de las gotas sembradas en las placas de MRS Agar. El recuento se realizó por duplicado para asegurar la reproducibilidad de los datos.

4.2.5. Cinética de crecimiento

El estudio de la cinética de crecimiento se realizó únicamente con *L. reuteri* en medio MRS modificado con 52.2 g/L de fibra procedente de bagazo de sidra de manzana. *L. reuteri* se recuperó en caldo TSB+YE en las condiciones indicadas en la Tabla 1 realizando dos pases consecutivos de 24 h para su recuperación previa a la cinética de crecimiento. Después del segundo pase de 24 h, 250 µL de este medio de cultivo fueron inoculados en el medio MRS modificado con fibra de bagazo de sidra de manzana. Tras inocular el medio, éste se incubó a 37 °C y se realizó un control de crecimiento microbiano cada 2 h, y hasta 1h de incubación, y posteriormente se tomó un punto final a las 24 h. Para cada punto se tomó una alícuota de 1 mL, se realizaron diluciones seriadas para poder contar entre 10 y 100 colonias por gota, estas diluciones fueron sembradas en MRSA enriquecido con L- cisteína (0.05%), utilizando el método de recuento en gotas (3 gotas de 20 µL por dilución) (J Baranyi 1, 1994).

Posteriormente se realizó el recuento de colonias según lo descrito en el apartado 3.2.3.

Durante la cinética de crecimiento se realizó un control del pH similar al llevado a cabo en la cinética de crecimiento. Para ello se toma 1mL, el pH se midió con un pH-metro (Basic 20, Crison). Este análisis se realizó por triplicado.

4.2.6. Análisis estadístico del crecimiento bacteriano

Se empleó el programa Excel para realizar medias y desviación estándar. La comparación de medias se realizó con ayuda del programa *SPSS Statistics* versión 26.0.0.1 (IBM®). La cinética de crecimiento fue modelada con ayuda del programa en Combace (Combace, 2024).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Crecimiento bacteriano

El estudio de viabilidad bacteriana se llevó a cabo en 8 bacterias que, de acuerdo con la literatura (ISAPP, 2020) son consideradas probióticas. Este estudio de viabilidad fue necesario porque las cepas provenían de diferentes colecciones de cultivo.

En la Tabla 2 se puede observar el resultado de este estudio de viabilidad en dos medios de cultivo (TSB + YE), a 24 h y 48 h. Se consideró que la bacteria fue capaz de crecer cuando formaba depósitos o el medio dejaba de ser transparente.

Tabla 3: viabilidad (TSB+YE) y actividad prebiótica (MRSmZ) de diversos microorganismos probióticos.

Microorganismo	TSB+YE		MRSmZ	
	Siembra 1	Siembra 2	Siembra 1	Siembra 2
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	+	++	+	+
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	-/+	-/+	-	-
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	-/+	-/+	-	-
<i>Lactococcus lactis</i>	+	++	+	+
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+	++	+	+
<i>Bifidobacterium longum</i>	+	++	+	+
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus GG</i>	+	++	+	+
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+	++	+	+

(-/+), el microorganismo presenta bajo crecimiento; (+), el microorganismo presenta crecimiento; (++) , el microorganismo presenta crecimiento abundante y/o precipita de forma visible en el medio; negativo (-), el microorganismo no presenta crecimiento en el medio.

Se descartaron las cepas (*Lacticaseibacillus paracasei* y *Lacticaseibacillus rhamnosus*) por no presentar actividad probiótica en MRSmZ, y esta actividad es necesaria para realizar los posteriores análisis. Además, la viabilidad en medio TSB + YE tampoco fue óptima en estas cepas. Esto es debido a que las bacterias lácticas se adaptan a los distintos ambientes, en este estudio las dos bacterias anteriormente citadas fueron aisladas de quesos o leche, y es posible que estas bacterias probióticas se hubieran adaptado a esos ambientes. La adaptación metabólica de algunas BAL consiste en simplificar su metabolismo, por ejemplo, adaptan las proteínas involucradas en el transporte de carbohidratos al sustrato donde crecen. De esta manera las bacterias usan los transportadores de hidratos de carbono específicos para poder utilizar la fuente de hidratos de carbono a la que tienen acceso en ese momento (Aaron N. Brooks, 2011) (Maria De Angelis, 2016).

5.2. Caracterización de las cepas mediante MALDI-TOF

Una vez comprobada la viabilidad de las cepas y la actividad probiótica de las mismas en medio MRSmZ, estas se identificaron mediante MALDI-TOF. Las puntuaciones obtenidas mediante MALDI-TOF de las cepas *Lactococcus lactis*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, *Lactiplantibacillus plantarum* y *L. reuteri* estuvieron entre 2,12 y 2,40 (ver Tabla 4). Estas puntuaciones confirman el género y la especie de cada una de ellas. Sin embargo, las cepas *Bifidobacterium longum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum* presentan puntuaciones inferiores a 2,0 (datos no mostrados), por lo que al no poder confirmar su género y especie fueron descartadas. Las bacterias descartadas mostraron una puntuación menor a 2,0 porque tanto la calidad y/o la cantidad de los perfiles proteicos bacterianos no fue suficiente para hacer una identificación eficaz. Esto puede deberse a una baja concentración de biomasa, una incorrecta preparación de la muestra o una contaminación de las cepas (Natalija Topić Popović, 2023).

La Tabla 4 también muestra las características morfológicas de cada una de las bacterias probióticas seleccionadas para los ensayos.

Tabla 4: identificación por MALDI-TOF y propiedades morfológicas de microorganismos probióticos

Signo	Patrón correspondiente	Puntuación	Imagen	Descripción de las colonias
(++)	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2.172		Colonias pequeñas, redondas, de bordes regulares y elevación convexa. Superficie lisa, color blanco cremoso y opacidad translúcida a ligeramente opaca.
(++)	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus GG</i>	2.128		Colonias medianas, circulares, de bordes definidos, color crema amarillento, opacas, superficie plana.
(++)	<i>Lactotoccus lactis</i>	2.194		Colonias pequeñas, redondas, de borde regular y color blanquecino.
(+++)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	2.45		Colonias de tamaño pequeño a mediano, circulares, con bordes definidos y regulares, color beige, opacas, superficie lisa y brillante.

Aunque todas las bacterias presentaron colonias circulares y con bordes definidos, se observaron diferencias en tamaño, coloración y textura. *L. reuteri* y *L. lactis* formaron colonias más pequeñas y de color blanquecino, mientras que *L. rhamnosus* GG y *L. plantarum* formaron colonias más grandes, de colores crema o beige, y superficies más brillantes u opacas. Estas variaciones pueden estar relacionadas con el tipo de cepa, su metabolismo y adaptación al medio de cultivo.

5.3. Recuento microbiano de bacterias probióticas

Los recuentos microbianos de diversos microorganismos probióticos en medio MRS modificado con distintos tipos de fibra dietética se encuentran recogidos en la Tabla 5.

Como principal resultado podemos destacar que ambos bagazos, de manzana de sidra y manzana de zumo, son adecuados para el crecimiento de los cuatro microorganismos probióticos. En el caso del bagazo de manzana de zumo se ha producido un incremento con respecto a la concentración inicial de 2.46 ± 0.36 Log ufc/mL con respecto a la concentración inicial; y en el caso del bagazo de manzana de sidra el crecimiento ha sido de 2.48 ± 0.44 log ufc/ml con respecto a la concentración inicial.

Sin embargo, no se observa que haya ningún efecto significativo en el crecimiento de los distintos microorganismos probióticos ($p > 0.05$) debido al origen de la fibra (manzana de zumo, manzana de sidra o pectina comercial). Sin embargo, se advierte una tendencia a que los microorganismos aumenten su crecimiento cuando se utiliza como sustrato la fibra dietética procedente de bagazo tanto de manzana de zumo como de manzana de sidra con respecto a la pectina comercial, excepto en *Lactobacillus rhamnosus* GG.

El crecimiento de las bacterias probióticas que utilizan únicamente como fuente de HCO las diferentes fibras analizadas puede deberse a la versatilidad metabólica de estos microorganismos, ya que se pueden adaptar a diversas fuentes de HCO y nitrógeno (Giulia Bisson 1, 2021) (Ronit Suissa, 2022) (Maria De Angelis, 2016). Estos autores indican una flexibilidad metabólica derivada de la activación de enzimas y transportadores de HCO (Maria De Angelis, 2016), que puede variar entre especies y cepas de la misma especie. Asimismo, el estudio de Mesquita (Caroliny

Mesquita Araújo, 2024) encontró que *L. paracasei* crece adecuadamente utilizando como fuente de HCO bagazos de acerola, guayaba o anacardo; en nuestro trabajo no se observó un crecimiento del microorganismo mencionado que puede deberse a las necesidades nutricionales de lípidos u otros factores de crecimiento presentes en la acerola, guayaba y anacardo que no estaban presentes en la fibra procesada utilizada en nuestro trabajo.

Tabla 5. Recuentos microbianos de diversos microorganismos probióticos en medio MRS modificado con pectina comercial (MRSmP), medio MRS modificado con bagazo de zumo de manzana (MRSmZ) y medio MRS modificado con bagazo de sidra de manzana (MRSmS).

Microorganismo	MRSmP (Log ufc/mL)	MRSmZ (Log ufc/mL)	MRSmS (Log ufc/mL)
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	7,15±1,98 ^{a,1}	8.45±0.33 ^{a,1}	8.14 ± 0.59 ^{a,1}
<i>Lactococcus lactis</i>	7.98± 0.46 ^{a,1}	8.34±0.30 ^{a,1}	8.43±0.377 ^{a,1}
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG	8.52± 0.31 ^{a,1}	8.40±0.57 ^{a,1}	8.52±0.47 ^{a,1}
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	8.37±0.15 ^{a,1}	8.64±0.23 ^{a,1}	8.84±0.31 ^{a,1}

^(a) Superíndices con igual letra en la columna o ⁽¹⁾ mismo número en la fila indica que no se observan diferencias significativas entre las medias (p<0,05).

Los valores de pH obtenidos del crecimiento microbiano de los microorganismos probióticos estudiados se muestran en la Figura 2.

En la Figura 2 cuando se usó pectina como única fuente de HCO en MRS modificado, se observa que tanto *Lactococcus lactis* como *L. plantarum* fueron capaces de producir mayor cantidad de ácidos orgánicos y consecuentemente disminuir significativamente (p<0.05) el pH en comparación con *L.reuteri* y *L. rhamnosus* GG. Cuando se utilizó el medio de cultivo MRSmS se observa una mayor acidificación (p<0.05) en *L. plantarum* (pH 5.06) frente a *L. rhamnosus* GG que únicamente redujo 0.3 unidades de pH respecto al pH inicial del medio (datos no mostrados). Por último, observamos que en el medio MRSmZ no hay diferencias significativas entre los microorganismos estudiados.

Por lo tanto, la fibra obtenida del bagazo de manzana es buena fuente de hidratos de carbono para el crecimiento de los cuatro microorganismos estudiados en este trabajo.

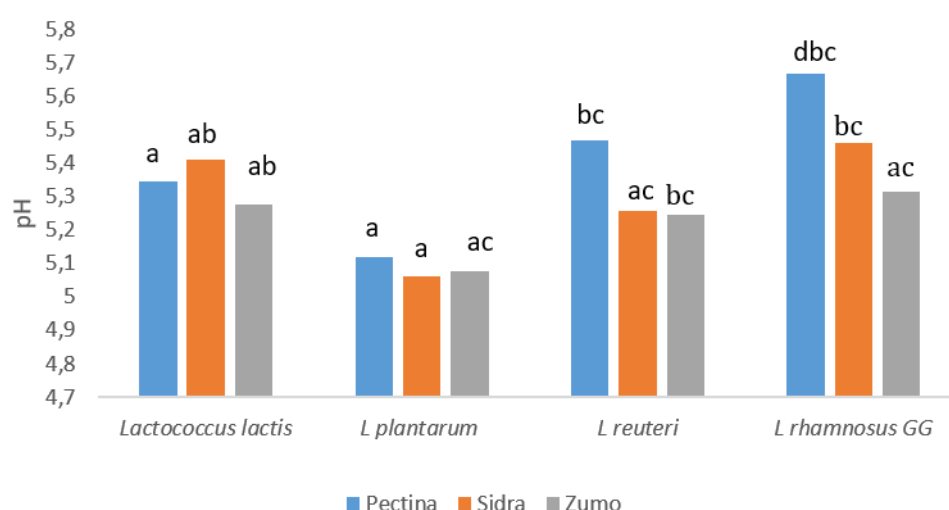


Figura 2: valores de pH del crecimiento de microorganismos probióticos usando distintos tipos de fibra (pectina comercial; sidra: fibra obtenida de bagazo de sidra de manzana; zumo: fibra obtenida de bagazo de zumo de manzana) en MRS modificado. Superíndices con distinto tipo de letra en la columna indica diferencias significativas de las medias ($p < 0,05$).

Por otro lado, si comparamos el crecimiento bacteriano (ver Tabla 5), con los pH recogidos en la Figura 2, teniendo en cuenta que no existe ningún efecto significativo en el crecimiento entre los distintos microorganismos probióticos, si analizamos el crecimiento en MRSmS frente a pectina comercial se observa una tendencia ascendente de los recuentos microbianos (ver Tabla 5) y un menor del pH del medio. Esto se produce porque a medida que el microorganismo crece produce metabolitos, como el ácido láctico, lo cual reduce el pH del medio. Sin embargo, si comparamos MRSmZ frente a pectina comercial, esta tendencia se cumple en el caso de *Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*, pero no se aprecia en *Lactococcus lactis* ni en *L. rhamnosus GG*. Es conocido que *L. rhamnosus* puede seguir una ruta heterofermentativa que no solo producen ácido láctico, sino otros compuestos como etanol, CO₂ o compuestos volátiles como acetoina, diacetilo (Calasso y Gobbetti 2011). Sin embargo, *Lactococcus lactis* es considerada una bacteria homofermentativa y produce cantidades importantes de ácido láctico a partir de la lactosa, aunque parece ser contradictorio algunos autores (Savoie et al, 2007) han encontrado que a pHs cercanos a 6 se produce una acumulación de microorganismos vivos sin que se reduzca el pH. Este hecho puede deberse a las bajas concentraciones de ácido láctico no dissociado, que evita el estrés celular y

provocando una mayor viabilidad de las células de este microorganismo (Hasen et al., 2016)

5.4. Cinética microbiana

A la hora de elegir el microorganismo probiótico con el que realizamos la cinética microbiana, se ha escogido *L. reuteri*, por ser uno de los probióticos más utilizados como suplemento dietético, presentar un crecimiento adecuado en los medios modificados con fibra dietética y porque sería posible combinar esta fibra y ese microorganismo para crear un suplemento dietético simbiótico.

Se hizo un modelado siguiendo el protocolo de Baranyi & Roberts (J Baranyi 1, 1994) con el que se obtuvo un valor de R^2 de 0.985 lo que indica que el crecimiento de *L. reuteri*, en medio con fibra dietética procedente de bagazo de manzana de sidra se ajusta al modelo sigmoideal propuesto por los autores.

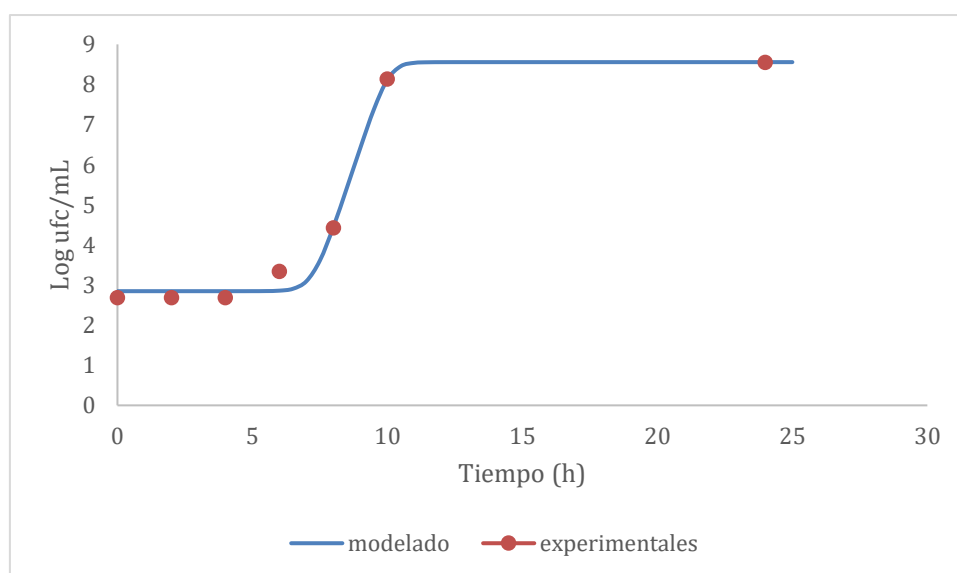


Figura 3: Crecimiento de *L. reuteri* en medio MRS modificado con bagazo de manzana de sidra. El modelado se hizo usando DMFit Web Edition (Baranyi & Roberts, 1994) ($R^2=0.985$).

En la cinética de crecimiento (ver Figura 3) se aprecia que este microorganismo necesita un tiempo de adaptación de 7.24 horas para utilizar la fibra dietética como fuente de hidratos de carbono, antes de iniciar un crecimiento ascendente y constante. La velocidad de crecimiento fue de 2.044 Log ufc. h⁻¹ y alcanzó la fase estacionaria a las 10,5 horas con una población máxima de 8.55 Log ufc/mL. Estos datos muestran un buen crecimiento de esta bacteria probiótica comparable con el crecimiento de otras bacterias BAL que utilizan otras matrices de alimentos. En Sigüenza et al. la población máxima alcanzada fue de 8.07 Log ufc/mL, mientras que en nuestros estudios fue algo mayor, llegando a 8.55 Log ufc/ml, y este mismo estudio la velocidad de crecimiento fue de 1.54 Log ufc. h⁻¹ frente a 2.044 Log ufc. h⁻¹ que se alcanzó en este ensayo (Teresa Sigüenza-Andrés, 2023).

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden sacar de la investigación realizada en este trabajo son:

1. Las bacterias *Lacticaseibacillus paracasei* y *Lacticaseibacillus rhamnosus* provenientes de leche y queso respectivamente, no presentan actividad probiótica en MRSmZ, esto confirmaría que las bacterias lácticas son capaces de adaptar las proteínas involucradas en el transporte de carbohidratos al sustrato donde crecen.
2. Tanto los ensayos de crecimiento como los del pH nos indican que las fibras procedentes de los bagazos de manzana de sidra y de manzana de zumo pueden ser la única fuente de HCO para el crecimiento de las bacterias probióticas estudiadas: *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG y *Lactiplantibacillus plantarum*.
3. Aunque no se observa un efecto significativo en el crecimiento de los distintos microorganismos probióticos debido al origen de la fibra (manzana de zumo, manzana de sidra o pectina comercial), se advierte una tendencia a que los microorganismos aumentan su crecimiento cuando se utiliza como sustrato la fibra dietética procedente de bagazo tanto de manzana de zumo como de manzana de sidra con respecto a la pectina comercial.
4. La bacteria *Limosilactobacillus reuteri* junto con la fibra dietética proveniente del bagazo de manzana de zumo se puede usar para elaborar un producto simbiótico porque muestra una buena velocidad de crecimiento y una población adecuada para alcanzar los rangos que requiere un microorganismo probiótico para mejorar la salud.

7. BIBLIOGRAFÍA

3.1, B. D. (2012). *User Manual*.

Aaron N. Brooks, S. T. (2011). Adaptation of cells to new environments.

Baltasar Ruiz-Roso Calvo de Mora, L. P.-O. (2010). Avance de resultados sobre consumo de fibra en España y beneficios asociados a la ingesta de fibra insoluble.

Caroliny Mesquita Araújo, K. B. (2024). Exploiting tropical fruit processing coproducts as circular resources to promote the growth and maintain the culturability and functionality of probiotic lactobacilli.

Cheickna Daou, H. Z. (2013). Functional and physiological properties of total, soluble, and insoluble dietary fibres derived from defatted rice bran.

Christo Opperman, M. M. (2025). Beyond soluble and insoluble: A comprehensive framework for classifying dietary fibre's health effects.

Combase. (2024). From Combase : <https://combase.errc.ars.usda.gov/>

Council, E. F. (1999). From Las bacterias ácido-lácticas y su uso en la alimentación : <https://www.eufic.org/es/produccion-de-alimentos/articulo/las-bacterias-acido-lacticas-y-su-uso-en-la-alimentacion>

Deepak Mudgil, S. B. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review.

Deepak Mudgil, S. B. (2013). Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review.

Division of Gastroenterology & Hepatology, D. o. (2023). *The america journal of Gastroenterology* . From https://journals.lww.com/ajg/fulltext/2024/01001/non_prescription_therapeutics.4.aspx

Fijan, S. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature.

Giulia Bisson 1, M. M. (2021). Turbidimetric definition of growth limits in probiotic Lactobacillus strains from the perspective of an adaptation strategy.

Huertas, R. A. (2021). Bacterias ácido-lácticas.

ISAPP. (2020). *ISAPP*. From <https://isappscience.org/>

J Baranyi 1, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food.

Johnson W McRorie Jr, N. M. (2017). Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber.

Johnson W. McRorie Jr. PhD, N. M. (2017). Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber.

Johnson W. McRorie Jr. PhD, N. M. (2017). Understanding the Physics of Functional Fibers in the Gastrointestinal Tract: An Evidence-Based Approach to Resolving Enduring Misconceptions about Insoluble and Soluble Fiber.

Lichtenstein AH, A. L.-E. (2021). *2021 dietary guidance to improve cardiovascular health: A scientific statement from the American heart association.*

Malaiporn Wongkaew, P. T. (2022). Mango Pectic Oligosaccharides: A Novel Prebiotic for Functional Food.

Maria De Angelis, M. C. (2016). Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*.

Mirás Vázquez, I. (2019). Estudio de la población de bacterias ácido lácticas en un embutido cárnico mediante MALDI TOF.

Natalija Topić Popović, S. P.-P.-R. (2023). Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review.

OMS. (2025). *FAO. From Codex Alimentarius, Normas internacionales de los alimentos* : [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/es/](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/es/Perspectives)

Perspectives, T. E. (2022). Eliana Bistriche Giuntini, Fabiana Andrea Hoffmann Sardá, Elizabete Wenzel de Menezes.

Philippa Stribling, F. I. (2023). Devisión de la definición de fibra dietética: El caso de carbohidratos de bajo peso molecular.

Philippa Stribling, F. I. (2023). Dietary fibre definition revisited - The case of low molecular weight.

Philippa Stribling, F. I. (2023). Dietary fibre definition revisited - The case of low molecular weight carbohydrates.

Philippa Stribling, F. I. (2023). Dietary fibre definition revisited - The case of low molecular weight carbohydrates.

Ronit Suissa, R. O.-G. (2022). Context-dependent differences in the functional responses of *Lactobacillaceae* strains to fermentable sugars.

Sabater, P. d. (2024). Viabilidad de células estresadas de *Cronobacter sakazakii* mediante citometría de flujo y espectrometría de masas .

Saloni Gill, P. I. (2018). The impact of dietary fibres on the physiological processes of the large intestine. *Elsevier*.

Saloni Gill, P. I. (n.d.). *The impact of dietary fibres on the physiological processes of the large intestine*. Elsevier.

Slavin, J. (2013). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits.

Slavin, J. (2013). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits.

Teresa Sigüenza-Andrés, M. G.-N. (2023). Development of a fermented plant-based beverage from discarded bread flour.

Valentina Ambrogi 1 2, F. B. (2023). Galacto-oligosaccharides as infant prebiotics: production, application, bioactive activities and future perspectives.

Vanessa Liévin-Le Moal, A. L. (2014). Anti-Infective Activities of Lactobacillus Strains in the Human Intestinal Microbiota: from Probiotics to Gastrointestinal Anti-Infectious Biotherapeutic Agents.

Yi Wang, J. H. (2022). Research Update on the Impact of Lactic Acid Bacteria on the Substance Metabolism, Flavor, and Quality Characteristics of Fermented Meat Products.

Zhi-Wei Guan, E.-Z. Y. (2021). Soluble Dietary Fiber, One of the Most Important Nutrients for the Gut Microbiota.