

EXTRACTOS DE AMARANTO
COMO SUBSTRATO PARA EL
CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS*
PLANTARUM UNA BACTERIA ÁCIDO
LÁCTICA CON CARACTERÍSTICAS
PROBIÓTICAS

—

Leobardo Isaí Vargas Martínez
leo_m7789@hotmail.com

Miguel Ángel García Alvarado
miguelg@itver.edu.mx

Víctor José Robles Olvera
vrobles@itver.edu.mx

Madeleine Hidalgo Morales
mhidalgo@itver.edu.mx

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ, MÉXICO
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO, MÉXICO

Para citar este artículo:

Vargas, L., et al. (2019). Extractos de amaranto como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* una bacteria ácido láctica con características probióticas. *Espacio I+D, Innovación más Desarrollo*. Vol. VIII, (19). doi: 10.31644/IMASD.19.2019.a04

RESUMEN

El amaranto, debido a su composición nutrimental (carbohidratos 50-66%, lípidos 1.9-9.7% y proteínas 12-22%) ha sido seleccionado por la FAO como el mejor alimento de origen vegetal. El amaranto ejerce efectos benéficos sobre la salud, destacándose la disminución del nivel de colesterol en sangre, reforzamiento del sistema inmune, actividad antioxidante y protección contra el cáncer. Sin embargo, en algunas investigaciones ha sido encontrado que los pretratamientos térmicos como tostado, extrusión y explosión, aplicados al grano de amaranto antes de la elaboración de la harina, repercuten en el contenido nutrimental y la biodisponibilidad de los nutrientes. El alto contenido de proteínas, hacen del amaranto un sustrato atractivo para el crecimiento de bacterias lácticas probióticas, lo que complementaría los beneficios brindados por los nutrientes del amaranto y sería una alternativa de consumo de probióticos para aquellas personas que no pueden consumirlos de manera habitual (intolerantes a la lactosa, alérgicos a la proteína de leche, al gluten o a la soya). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de pretratamientos sobre la funcionalidad de extractos de semillas de amaranto como sustrato para el crecimiento de bacterias lácticas probióticas. Para alcanzar este objetivo se prepararon extractos de harina de amaranto a partir de semillas: sin tratamiento, lavadas, cocidas y reventadas. Se determinó el contenido de proteína, azúcares reductores y carbohidratos totales en los extractos y se desarrollaron cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* por vaciado en placa. Los resultados muestran que los extractos son funcionales para el cultivo de *L. plantarum* y que únicamente el reventado de las semillas parece afectar la disponibilidad de los nutrientes ya que fue en el único extracto en donde se observó un crecimiento celular máximo significativamente menor (1.44 ± 0.04 ciclos logarítmicos), sin embargo, la tasa de crecimiento no se vio afectada.

Palabras clave

Amaranto, bacteria ácido láctica, probióticos.

AMARANTH EXTRACTS AS A SUBSTRATE FOR THE GROWTH OF
LACTOBACILLUS PLANTARUM A LACTIC ACID BACTERIA WITH
PROBIOTIC CHARACTERISTICS

— Abstract—

Amaranth, due to its nutritional composition (carbohydrates 50-66%, lipids 1.9-9.7% and proteins 12-22%) has been selected by FAO as the best food of vegetable origin, it has also been reported that amaranth exerts beneficial effects on health such as lowering the blood cholesterol level, stimulating the immune system, having antioxidant activity as well as protecting against cancer. In some researches, it has been mentioned that thermal pre-treatments such as roasting, extrusion and explosion, applied to amaranth grain before flour processing, have an impact on nutrient content and bioavailability of nutrients. The high content of proteins makes amaranth an attractive substrate for the growth of probiotic lactic acid bacteria, which would complement the benefits provided by the nutrients of amaranth and would be an alternative of probiotic consumption for those people who cannot consume them regularly (lactose intolerant, allergic to milk protein, gluten or soy). Therefore, the objective of this research was to evaluate the effect of pretreatments on the functionality of amaranth seed extracts as a substrate for the growth of probiotic lactic acid bacteria. To achieve this goal, extracts of amaranth flour were prepared from: without treatment, washed, cooked and burst seeds. The protein content, reducing sugars and total carbohydrates were determined to the extracts. Growth kinetics of *Lactobacillus plantarum* were developed by the pouring plate method. The results show that amaranth extracts are functional for the culture of *L. plantarum* and that only the explosion of the seeds seems to affect the availability of nutrients since it was in the only extract where a significantly lower maximum cell growth was observed (1.44 ± 0.04 Log UFC/UFC₀), Nevertheless the rate of growth was not affected.

Keywords

Amaranth, lactic acid bacteria, probiotics.

El amaranto es considerado un pseudocereal debido a que presenta una composición química similar a la de los cereales. Tiene un contenido de proteínas relativamente alto (14-17%), y en algunas variedades llega a ser mayor que en los cereales (22%). El amaranto presenta un perfil de aminoácidos con más lisina, triptófano y aminoácidos azufrados que las proteínas de cereales (Escudero *et al.*, 2004), por lo cual es considerado como una fuente de proteínas de alto valor nutritivo. El aceite de amaranto presenta también un contenido de ácidos grasos similar al del maíz y al de otras oleaginosas, alrededor del 6% de los ácidos grasos del amaranto son insaturados, de los cuales un 40 % es ácido linoleico que es un ácido graso esencial en la nutrición humana (Saunders y Becker, 1984; Sánchez, 2007).

Se ha reportado que el amaranto puede ejercer efectos benéficos sobre la salud como disminuir el nivel de colesterol en sangre, reforzar el sistema inmune, tener actividad antioxidante, así como proteger contra el cáncer; estos efectos están promovidos por la presencia de péptidos activos, terpenoides y polifenoles (Venskutonis y Kraujalis, 2013). La fibra insoluble y soluble del amaranto actúa favorablemente reduciendo los niveles séricos y hepáticos de colesterol en animales (Danz y Lupton, 1992), esta fibra puede ser considerada prebiótica, ya que puede ser utilizada por microorganismos probióticos para mejorar su crecimiento (Charalampopoulos *et al.*, 2002).

El interés en utilizar el amaranto como sustrato para la elaboración de productos fermentados, radica entre otras características, en su alto contenido de proteínas con un buen patrón de aminoácidos esenciales y su elevado contenido de lisina (Pedersen, 1987). Por las características mencionadas el amaranto ha sido seleccionado por la FAO (1986) como el mejor alimento de origen vegetal. Su valor nutritivo hace del amaranto un sustrato atractivo para el crecimiento de bacterias lácticas con características probióticas, que actualmente se distribuyen principalmente en productos lácteos. La adición de bacterias potencialmente probióticas como *Lactobacillus plantarum* (Molin, 2001; Cebeci y Gürakan, 2003), complementaría los beneficios brindados por los nutrientes del amaranto y sería una alternativa de consumo de probióticos para todas aquellas personas que no pueden consumir los productos habituales (intolerantes a la lactosa, alérgicos a la proteína de leche, al gluten o a la soya) (Prado *et al.*, 2008). El amaranto, al ser un pseudocereal libre de gluten, también representa una opción de consumo para las personas celiacas (Pantanelli 2001; García 2008; Soteris 2011).

Se ha reportado que los diferentes procesos térmicos aplicados al grano de amaranto, como tostado, extrusión y explosión del grano, antes de la elaboración de la harina, repercuten en el contenido nutrimental y la

biodisponibilidad de los nutrientes, pero que, a pesar de la reducción en el contenido de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante se mantiene sin diferencias significativas con respecto al grano sin tratar (Bresani, 1992). Lo anterior remarca la importancia de procurar que el procesamiento de los granos de amaranto afecte en lo mínimo posible el contenido y la disponibilidad de sus nutrientes, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las condiciones de procesamiento sobre el contenido y biodisponibilidad de nutrientes en extractos de amaranto y su funcionalidad como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, una bacteria láctica potencialmente probiótica.

METODOLOGÍA

Preparación y caracterización de los extractos

Se utilizaron semillas no procesadas de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* cultivado de forma orgánica en los estados de Puebla, Oaxaca e Hidalgo; adquiridas en la tienda virtual del grupo Quali en empaques de 250 g. Se obtuvieron harinas a partir de semillas reventadas (240-270 °C, 35 s), de semillas lavadas con una solución de bicarbonato de sodio (NaCOH₃) al 5% durante 7 minutos con agitación, de semillas sometidas a cocción (agua a 100 °C, 25 min) y a partir de semilla sin tratar como testigo. Las semillas lavadas y cocidas fueron colocadas durante 15 minutos en bastidores para eliminar el exceso de agua y secadas en un horno al vacío a 60 °C durante 24 h previo a la molienda. Las semillas de amaranto tratadas y no tratadas fueron molidas en un molino pulvex 200 con una criba de 0.5 mm, el producto molido fue tamizado (malla No. 80) para homogeneizar el tamaño de partícula. Se elaboraron cuatro extractos diferentes de acuerdo a las harinas de semillas de amaranto (harina de amaranto reventado, harina de amaranto lavado, harina de amaranto cocido y harina de amaranto sin tratamiento), mezclando 10 g de harina con 100 ml de agua destilada, las mezclas fueron dejadas en reposo durante 20 min y sometidas a un proceso de homogeneización y filtración, posteriormente los extractos fueron parcialmente caracterizados por su contenido de proteína (método Kjeldahl), azúcares reductores (Miller 1959) y carbohidratos totales (Dubois, 1956). Una vez caracterizados, los extractos fueron sometidos a tratamiento térmico (121 °C, 10 min.) para la eliminación de la carga microbiana.

Desarrollo de las cinéticas de crecimiento

La cepa bacteriana de *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 (aislada de col en vinagre), donada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

(USDA, Peoria, Illinois, USA), fue preadaptada a los extractos cultivándola en una mezcla 50:50 de extracto de amaranto-caldo MRS. Se tomó el inóculo cuando las cepas alcanzaron su máximo crecimiento al final de la fase exponencial (7.55×10^8 UFC/mL) para el desarrollo de las cinéticas de crecimiento en los extractos de amaranto. Los extractos de amaranto fueron inoculados con 0.5% de inóculo previamente estandarizado. Durante la fermentación se realizaron muestreos cada hora durante las primeras 6 horas y después cada 2 horas hasta las 24 horas, para evaluar la concentración celular (unidades formadoras de colonias por mililitro, UFC/mL) por el método de vaciado en placa, la evolución del pH, la acidez titulable (AOAC, 1990), la concentración de azúcares reductores (Miller 1959) y los carbohidratos totales (Dubois, 1956).

Modelación matemática y análisis estadístico

Los parámetros de crecimiento fueron calculados por ajuste del modelo logístico a los datos de UFC obtenidos durante el desarrollo de las cinéticas y la significancia entre ellos fue evaluada por análisis de varianza con un nivel de significancia ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Caracterización parcial de los extractos obtenidos

Los tratamientos térmicos aplicados a una matriz vegetal son una etapa importante para la obtención de extractos ya que influyen en su contenido nutrimental. La evaluación del efecto de los tratamientos térmicos aplicados a la semilla de amaranto sobre el contenido nutrimental ha sido reportado únicamente para la harina de amaranto (Bressani, 1983); sin embargo, este efecto no ha sido reportado en extractos. Por este motivo y para definir el extracto a fermentar, en este trabajo se consideró evaluar el efecto del lavado, reventado y cocción de la semilla sobre el contenido nutrimental de los extractos, así como su capacidad para ser utilizado como medio de cultivo para bacterias lácticas.

En la Tabla 1 se presenta el efecto de los tratamientos aplicados a la semilla de amaranto sobre el contenido proteico, de azúcares reductores y de azúcares totales en los extractos. Como puede observarse el extracto de amaranto reventado presentó el contenido de proteína más alto, pero uno de los contenidos de azúcares reductores más bajos, solo por arriba del contenido en extracto de amaranto cocido y ambos inferiores comparados con el contenido de azúcares reductores en el extracto de semillas sin tratamiento térmico.

Tabla 1. Contenido de proteínas, azúcares reductores y carbohidratos totales en extractos de amaranto

Muestras	Proteínas (%)	Azúcares reductores (mg/mL)	Carbohidratos totales (mg/mL)
Extracto de amaranto sin tratamiento (ST)	0.690±0.003 ^c	10.953±0.300 ^a	35.96±2.60 ^a
Extracto de amaranto lavado (LA)	0.670±0.028 ^c	9.330±0.212 ^b	18.05±1.69 ^b
Extracto de amaranto cocido (CO)	0.815±0.007 ^b	3.135±0.503 ^c	23.93±1.67 ^c
Extracto de amaranto reventado (RE)	1.130±0.014 ^a	3.325±0.106 ^c	43.57±8.42 ^a

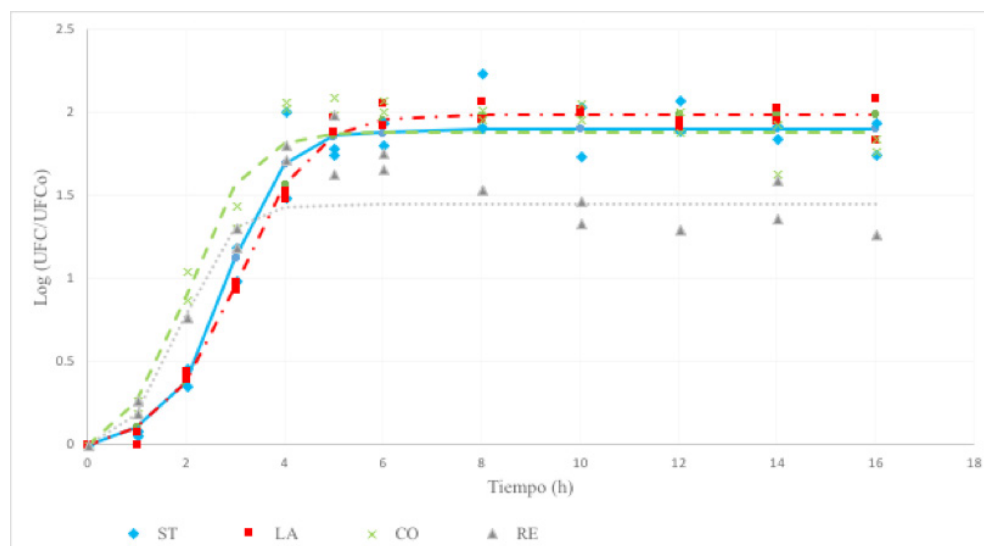
Nota: Los resultados se presentan como la media ± desviación estándar. ($p \leq 0.05$)

Los contenidos de proteína de ST y LA concuerdan con el reportado por Soterias (2011) para extractos de amaranto. De acuerdo con el contenido nutricional de los extractos reportado en la Tabla 1, el extracto obtenido a partir de semillas sin tratamiento presentó el mayor contenido de azúcares reductores, un buen contenido de proteína y azúcares totales por lo que fue seleccionado para adaptar a *L. plantarum* al nuevo sustrato durante la estandarización del inóculo.

Evaluación del crecimiento de L. plantarum en extractos de amaranto

El crecimiento de *L. plantarum* en los cuatro extractos (extracto de amaranto sin tratamiento (ST), extracto de amaranto lavado (LA), extracto de amaranto cocido (CO) y extracto de amaranto reventado (RE) se muestra en la Figura 1. En esta figura se aprecia que el crecimiento máximo se alcanza alrededor de las 4 y 5 horas de cultivo; en el extracto de amaranto reventado, el crecimiento máximo fue menor (1.4 ciclos log) comparado con el crecimiento máximo alcanzado en los otros extractos (1.9 ciclos log), cabe mencionar que se observa un crecimiento máximo de únicamente de 1.9 ciclos logarítmicos debido a que la concentración celular inicial fue de 10^7 UFC/mL y se alcanza una concentración final de 10^9 UFC/mL. En la Tabla 2 se muestran los parámetros de crecimiento obtenidos por el ajuste del modelo logístico a los datos de crecimiento.

Figura 1. Crecimiento de *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 en extracto de amaranto sin tratamiento (ST), amaranto lavado (LA), amaranto cocido (CO) y amaranto reventado (RE)



En la Tabla 2 se puede observar que, en lo que concierne al crecimiento máximo, el único tratamiento significativamente diferente fue el del extracto de amaranto reventado. En cuanto a la velocidad de crecimiento no se encontró diferencia significativa; y, con respecto al tiempo de latencia, se observó que éste fue similar en los extractos de amaranto sin tratamiento y de amaranto lavado, pero fue diferente al obtenido en los extractos de amaranto reventado y de amaranto cocido, los que a su vez, no mostraron diferencias significativas entre ellos. El tiempo de latencia fue más corto en los extractos realizados con amaranto reventado y amaranto cocido.

Tabla 2. Efecto del tipo de extracto de amaranto sobre los parámetros de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* NRRL-B4496

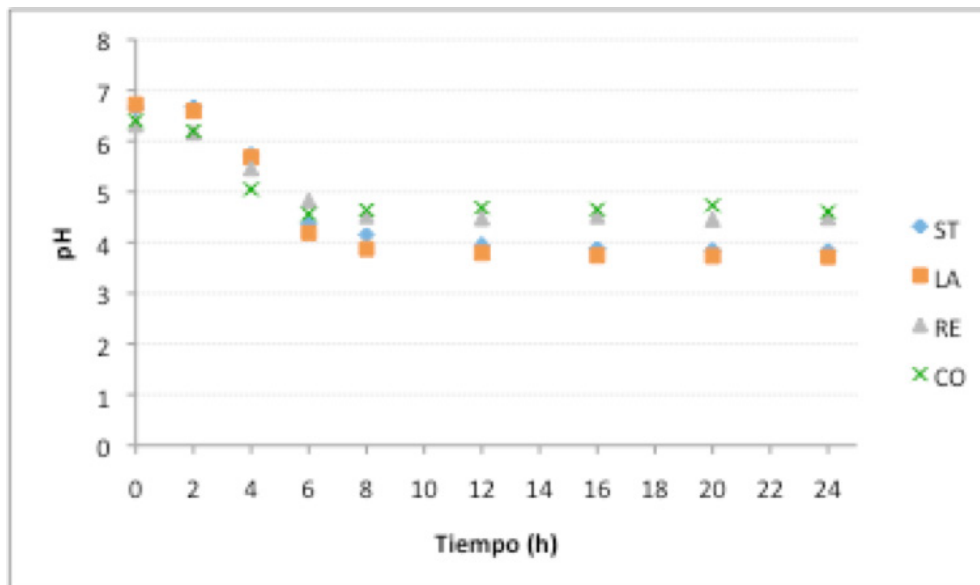
Extracto	Crecimiento máximo (Log (UFC/UFCo))	Tasa máxima de crecimiento (h ⁻¹)	Tiempo de latencia (h)
ST	1.90 ± 0.03 ^a	0.81 ± 0.12 ^a	1.63 ± 0.20 ^a
LA	1.99 ± 0.02 ^a	0.69 ± 0.04 ^a	1.63 ± 0.10 ^a
RE	1.44 ± 0.04 ^b	0.75 ± 0.24 ^a	0.97 ± 0.34 ^c
CO	1.88 ± 0.03 ^a	0.81 ± 0.14 ^a	0.91 ± 0.23 ^c

Nota: ST: extracto de amaranto sin tratamiento; LA: extracto de amaranto lavado; CO: extracto de amaranto cocido; y RE: extracto de amaranto reventado. (p ≤ 0.05)

Durante el crecimiento de *L. plantarum* en los extractos se evaluó la evolución del pH, de la acidez titulable y de los azúcares reductores. La Figura 2 muestra la evolución del pH, el cual descendió desde aproximadamente 6.6 hasta aproximadamente 3.8 en 6 h, tiempo en el cual el microorganismo ya se encontraba en fase estacionaria. El pH en los extractos de amaranto sin

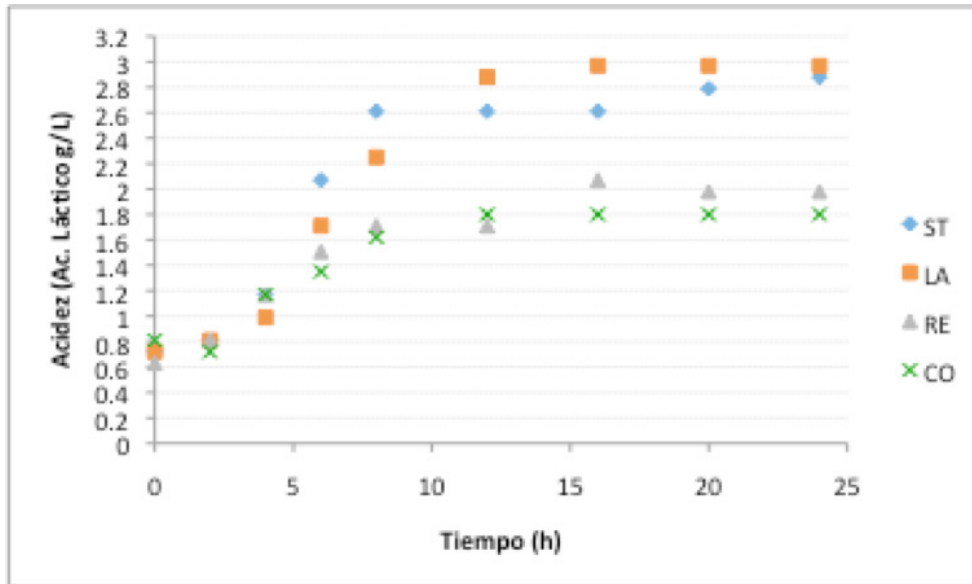
tratamiento y de amaranto lavado se mantuvo por debajo de 4 a partir de las 12 horas, mientras que, en los extractos de amaranto reventado y amaranto cocido, estuvo muy cerca de los valores mínimos de 4.4 – 4.5 indicados en las normas NOM-243-SSA1-2010 y NOM-185-SSA1-2002 para productos lácteos fermentados.

Figura 2. Evolución del pH durante el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 en extracto de amaranto sin tratamiento (ST), amaranto lavado (LA), amaranto cocido (CO) y amaranto reventado (RE)



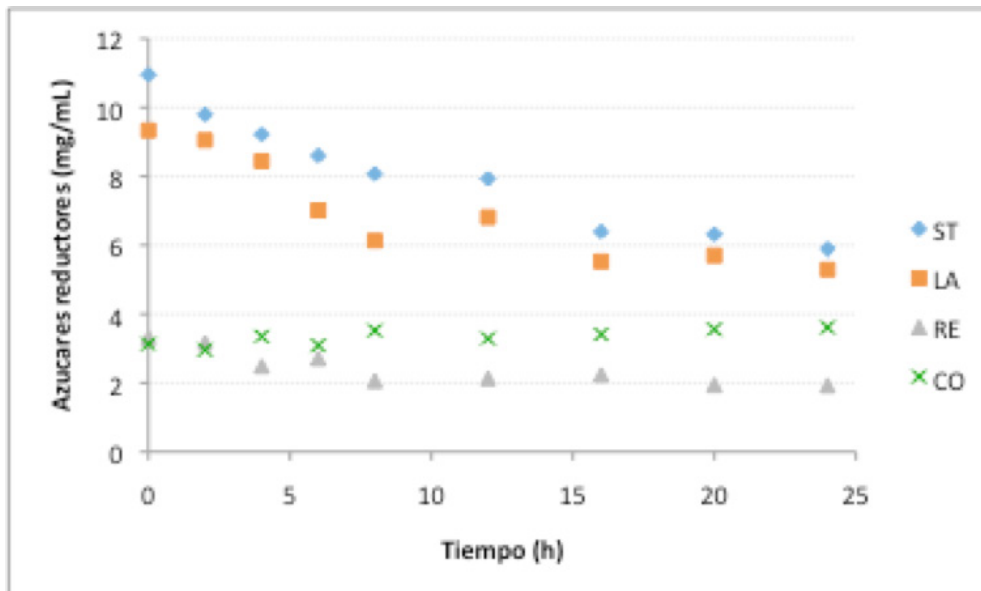
La Figura 3 muestra la evolución de la acidez titulable durante el crecimiento de *L. plantarum* en los cuatro extractos. En la Figura 3 se observa que la producción de acidez como ácido láctico empieza a detectarse a partir de las 4 h, y parece estabilizarse a las 12 h. La acidez titulable de los extractos de amaranto sin tratamiento y de amaranto lavado fue similar, y aproximadamente 1 g mayor que la obtenida en los extractos de amaranto reventado y de amaranto cocido. La acidez titulable expresada como ácido láctico, en todos los extractos, estuvo por abajo del valor mínimo de 0.5% indicado en las normas NOM-243-SSA1-2010 y NOM-185-SSA1-2002 para productos lácteos fermentados.

Figura 3. Evolución de la acidez titulable durante el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 en extracto de amaranto sin tratamiento (ST), amaranto lavado (LA), amaranto cocido (CO) y amaranto reventado (RE)



Como puede observarse en la Figura 4, el contenido de azúcares reductores en los extractos de amaranto sin tratamiento y amaranto lavado presentó una disminución constante hasta alrededor de las 8 h de cultivo, este tiempo corresponde aproximadamente con el inicio de la fase estacionaria, posteriormente el contenido de azúcares reductores permaneció constante.

Figura 4. Evolución de los azúcares reductores durante el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 en extracto de amaranto sin tratamiento (ST), amaranto lavado (LA), amaranto cocido (CO) y amaranto reventado (RE)



CONCLUSIONES

Los resultados muestran que todos los extractos de amaranto pueden ser funcionales para el crecimiento de bacterias lácticas, ya que no se observó diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) entre las tasas de crecimiento máximo y se observó un crecimiento máximo de alrededor de 2 ciclos logarítmicos al inicio de la fase estacionaria, aunque en el extracto obtenido a partir de semillas de amaranto reventadas se observó una concentración celular ligeramente inferior al avanzar la fase estacionaria. Estos resultados son la base de partida para el desarrollo de productos simbióticos (prebióticos + probióticos) a partir del amaranto, con contenido de proteína de buena calidad como alternativa al consumo de probióticos para las personas que no pueden consumir productos a base de leche, ya sea por sensibilidad a la lactosa o por alergias a la proteína de la leche, así como una alternativa para los celíacos. Referencias

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al PRODEP el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo a través del proyecto ITVER-PTC-006.

BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C.** (1990). *Official method of analysis*. Association of Official Analytical Chemistry. 16th edición, Ed. By Hoorwitz, N., Chialo, P. & Reynold, H. Washington, USA.
- Bressani, R.** (1983). Calidad proteínica de la semilla de amaranto cruda y procesada. En: *Arch Latinoam Nutr (ed) El amaranto y su potencial*. Bol, 3.
- Bressani, R., Sanchez-Marroquin, A., & Morales, E.** (1992). Chemical Composition of grain amaranth cultivars and effects of processing on their nutritional quality. *Foods Reviews International*, 8(1), 23-49.
- Cebeci, A., & Gürakan, C.** (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, 20(5), 511-518.
- Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S. S., & Webb, C.** (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), 131-141.
- Danz, R. A., & Lupton, J. R.** (1992). Physiological effects of dietary amaranth (*Amaranthus cruentus*) on rats. *Cereal foods world (USA)*.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Escudero, N. L., De Arellano, M. L., Luco, J. M., Giménez, M. S., & Mucciarelli, S. I.** (2004). Comparison of the chemical composition and nutritional value of *Amaranthus cruentus* flour and its protein concentrate. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(1), 15-21.
- FAO/WHO/UNU** (1986) Special Report. Energy and Protein requirements. *Cereal Foods World* 3, 694-695.
- García, M. S.** (2008). La bebida de amaranto, esencial para la salud. *Gaceta UNAM*, 4(053), 10-11.
- NOM-185-SSA1-2002.** Norma Oficial Mexicana, Productos y servicios. *Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.*
- NOM-243-SSA1-2010.** Norma Oficial Mexicana, Productos y servicios. *Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.*
- Miller, G. L.** (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Molin, G.** (2001). Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v-. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 380s-385s.
- Pantaneli, A.** (2001). Los Mayas ya lo sabían: prometedora resurrección del amaranto. *Alimentos Argentinos*. Argentina.

- Pedersen, B., Kalinowski, L. S., & Eggum, B. O. (1987).** The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*). *Plant foods for human nutrition*, 36(4), 309-324.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008).** Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111-123.
- Silva Sánchez, C. (2007).** *Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (Amaranthus hypochondriacus) cultivado en San Luis Potosí.* Disponible en <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/3052>
- Saunders, R. M., & Becker, R. (1984).** Amaranthus: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology (USA)*. 5, 3.
- Soteras, E. M. (2012).** *Obtención y formulación de una bebida en base de granos de amaranto* (Doctoral dissertation).
- Venskutonis, P. R., & Kraujalis, P. (2013).** Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(4), 381-412.