



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE POTENCIAL PREBIÓTICO DE EXTRACTOS DE
GARBANZOS RICOS EN OLIGOSACÁRIDOS**

Tesinista: Germán Frágola Ramos

Director: Dr. Emiliano Jesús Salvucci

Co-director: Dr. Guillermo Emilio Marcial

Instituto de Ciencia y Tecnología en Alimentos ICyTAC

CONICET - UNC



INSTITUTO DE
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS CÓRDOBA



AÑO 2024

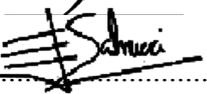
Tesina para optar por el título de Biólogo

**EVALUACIÓN DE POTENCIAL PREBIÓTICO DE EXTRACTOS DE
GARBANZOS RICOS EN OLIGOSACÁRIDOS**

Alumno: Germán Frágola Ramos

Firma: 

Director: Dr. Emiliano J Salvucci

Firma: 

Co-director: Dr. Guillermo Emilio Marcial

Firma: 

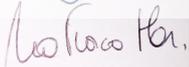
TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Abel Gerardo López

Firma: 

Dr. Abel Gerardo López

Dra. María Verónica Nolan

Firma: 

Dra Verónica Nolan

Mgter. Ing. Nancy Beatriz Larrosa

Firma: 

Calificación: 10 (diez)

Fecha: 27 de marzo de 2024

Agradecimientos

A la universidad pública por brindarme la oportunidad de realizar esta carrera.

A mi director y co-director, Emiliano y Guillermo, por su guía y paciencia durante esta última etapa de mi carrera, y a todo el grupo del ICyTAC por su ayuda en cada paso tomado y por recibirme cálidamente desde el primer día.

Al Team Bagazo y al LAPOx en Santiago del Estero, por otorgarme una primera experiencia en investigación, incluirme en un excelente grupo y mostrarme la belleza de esta profesión.

A mis amigos, los que me dió esta carrera y los que me acompañan desde mucho antes, por toda la diversión, contención, cariño, apoyo y recuerdos durante todos estos años, que fueron maravillosos gracias a ustedes.

A mis hermanitos de cuatro patas, Pepo, Loki y Sheyko, por ser una fuente de alegría y empatía inagotable.

A toda mi familia en Santiago, por ser un lugar donde siempre puedo volver.

A mis padres, Mónica y Mario, por darme la oportunidad de estudiar y de vivir, a quienes les debo todo, gracias a ellos soy la persona que soy hoy.

ÍNDICE

Resumen	5
Summary	6
Introducción	7
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
Materiales y métodos	14
Materiales.....	14
Extracción de oligosacáridos.....	15
Análisis cromatográfico.....	16
Capacidad prebiótica.....	16
Determinación de AGCC.....	21
Cálculos estadísticos.....	21
Resultados	22
Caracterización del extracto.....	22
Actividad prebiótica.....	23
Crecimiento microbiano. Turbidez.....	24
pH.....	25
Crecimiento relativo y puntuación prebiótica.....	26
Índice prebiótico.....	29
Determinación de AGCC.....	30
Discusión	32
Conclusión	38
Bibliografía	40

Resumen

El microbioma intestinal humano es un ecosistema complejo y dinámico, que es modulado por la alimentación del huésped. El mantenimiento de una microbiota funcional y del equilibrio en los microorganismos que la componen es de importancia para la salud y bienestar humano, debido a la influencia que estos tienen sobre procesos fundamentales. Las dietas occidentales, con alto contenido de azúcares simples y grasas, producen una alteración en la composición de la microbiota o “disbiosis”, lo cual es perjudicial para el huésped. Los prebióticos son fibras que pueden atravesar la digestión del intestino delgado y ser fermentados por bacterias colónicas, resultando en beneficios ecológicos o funcionales para el huésped, como lo son la inulina o los α -galactooligosacáridos. El garbanzo (*Cicer arietinum L.*) es un alimento funcional que contiene oligosacáridos con efecto prebiótico, y es una de las leguminosas con mayor producción a nivel global. Existen dos tipos de garbanzo, los Kabuli, consumidos normalmente en occidente, y los Desi, de color oscuro, mayormente consumidos en Asia y África, los cuales presentan ventajas ante condiciones adversas de cultivo, y requieren menor cantidad de agua para su óptimo crecimiento. Se planteó como objetivo evaluar el efecto prebiótico de extractos de diferentes tipos de garbanzos, a través del crecimiento relativo de cepas bacterianas de *Bifidobacterium longum subsp longum* DSM 20219, *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Para ello se realizaron fermentaciones *in vitro* con inulina, glucosa o extractos de garbanzo desi o kabuli, a partir de las cuales se determinó diferencias en crecimiento bacteriano, puntuación de actividad prebiótica, índice prebiótico, pH y producción de metabolitos de fermentación. Se determinó un perfil de azúcares en los extractos de garbanzo, se observó un efecto prebiótico positivo de estos, indicado por la promoción del crecimiento de cepas probióticas, la acidificación del medio y la producción de ácido acético, entre otros metabolitos. Se determinó por primera vez el potencial prebiótico de extracto de garbanzo para las cepas mencionadas, por lo que este trabajo constituye un aporte a la valorización del garbanzo como alimento funcional.

Summary

The human gut microbiome is a complex and dynamic ecosystem, which is modulated by the host's diet. The maintenance of a functional microbiota and balance between their composing microorganisms is important for human health and well-being, due to the influence they have in fundamental processes. Western diets, with a high simple sugar and fat contents produce "dysbiosis", or alteration of the microbiota's composition, which might be harmful to the host. Prebiotics, like inulin or α -galactooligosaccharides, are dietary fibers resistant to the small intestine digestion and are fermented by colonic bacteria, resulting in functional or ecologic benefits for the host. Chickpea (*Cicer arietinum L.*) is one of the most produced legumes in the world and contains prebiotic oligosaccharides. There are two varieties of chickpea, Kabuli, commonly eaten in western diets, and Desi, darker skinned, mostly consumed in Asia and Africa, which presents an advantage in non-optimal growing conditions and require less water. The aim of this work was to evaluate the prebiotic effect of both chickpea extracts, through the relative growth of bacterial strains *Bifidobacterium longum subsp longum* DSM 20219, *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 and *Escherichia coli*. To achieve this, *in vitro* batch fermentations were made with inulin, glucose or either desi or kabuli chickpea extracts, where differences in bacterial growth, prebiotic activity score, prebiotic index, pH and production of fermentation metabolites was determined. Sugar profile of both chickpea extracts was described and confirmed their positive prebiotic effect, by the promotion of probiotic bacteria growth, acidification and acetic acid production, alongside other metabolites. For the first time, the prebiotic potential of chickpea extract for the mentioned bacterial strain was determined, making this study a contribution to the valorization of chickpea as a functional food.

Introducción

Microbiota intestinal

El microbioma humano es el conjunto de microorganismos que viven en asociación al ser humano. En el intestino, la microbiota forma un ecosistema complejo y dinámico, originado a lo largo de la historia evolutiva conjunta de microorganismos con seres humanos, y que es modulada por la alimentación del huésped. Debido al avance tecnológico y cultural, el cambio en la dieta occidental, ha afectado la cantidad de fibra consumida, disminuyendo su ingesta y aumentando el consumo de azúcares simples, han afectado la composición de la microbiota, lo cual impacta en el equilibrio salud - enfermedad (Salvucci 2014, 2019a, 2019b).

El microbioma intestinal humano es un ecosistema complejo, formado por interacciones entre componentes de la dieta y microorganismos. El estudio minucioso de la dieta y otros factores que actúan sobre el establecimiento de la microbiota intestinal, y sus interrelaciones, es de vital importancia para el diseño y la producción de alimentos funcionales para el cuidado de la salud humana.

La microbiota del intestino grueso o colon conforma un ecosistema peculiar en el que conviven millares de especies diferentes de microorganismos. En el intestino grueso de los mamíferos la cifra de microorganismos se eleva a 10^{12} - 10^{14} . Este número es mayor, incluso, que el de células del cuerpo humano (Sender et al., 2016). De la diversa población de microorganismos que alberga el intestino, la población bacteriana es actualmente la mejor caracterizada (Eckburg et al., 2005; Gaci et al., 2014; Scarpellini et al., 2015; Williamson et al., 2016). Los phylum dominantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. (Bahktiar et al., 2013).

El microbioma conforma una unidad evolutiva con el ser humano que se ha denominado “holobionte” o “superorganismo” (Salvucci, 2016). Constituye una parte integral de los procesos fundamentales como la producción de vitaminas, la digestión, homeostasis energética, integridad de la barrera intestinal, angiogénesis, define y modula la homeostasis general y participa del equilibrio nutricional, inmunológico y neuroendócrino (Salvucci, 2019a; Laukens et al., 2016) (**Figura 1**). Un rol clave de ciertos microorganismos del microbioma es el mantenimiento de la función de barrera de la mucosa intestinal, lo que representa un mecanismo defensivo importante contra la colonización y translocación bacteriana.

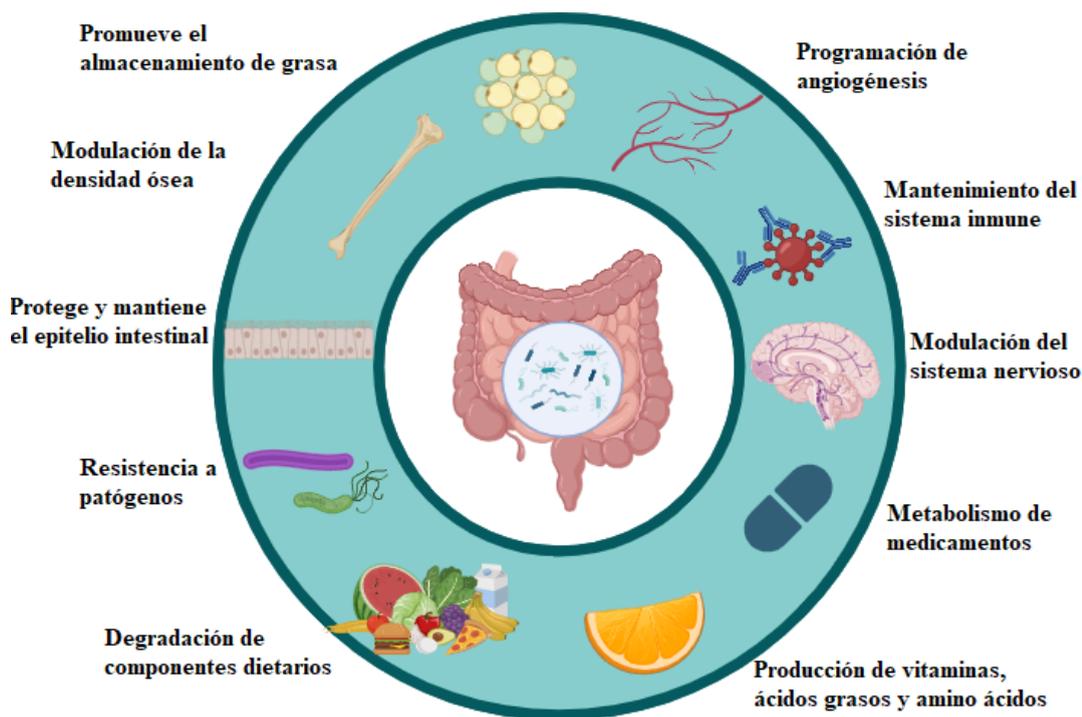


Fig. 1: Funciones de la microbiota intestinal humana. (Adaptado de Laukens et al., 2016)

Se denomina “disbiosis” a una alteración de la composición de la microbiota a un estado que es perjudicial para la salud del huésped, esta situación suele acompañar a enfermedades intestinales, inmunológicas, inflamatorias o que afectan el sistema nervioso central. Muchos factores ambientales diferentes pueden afectar la ecología microbiana intestinal; éstos incluyen dieta, medicamentos (antibióticos), estrés, edad y condiciones generales de calidad de vida (Van der Meulen et al., 2016).

La dieta es considerada un determinante crucial de la composición de la microbiota, una gran variedad de factores puede explicar por qué la dieta actúa como una fuerza ecológica que incluye la fuente de energía y confiere ventajas de crecimiento a ciertos microorganismos. Las dietas occidentales consisten, en general, de alto contenido de grasas, azúcares refinados y proteínas, y son muy diferentes a las llamadas dietas no occidentales, o dietas ancestrales, ricas en carbohidratos complejos y presentan ciclos de acuerdo a los ciclos propios de los cultivos. La dieta occidental se asocia a un estado inflamatorio general, mayor predisposición a desarrollar enfermedades inflamatorias intestinales, y un conjunto de enfermedades asociadas a disbiosis del microbioma (Salvucci, 2019b). A su vez, la diversidad de la microbiota es

menor en comparación con poblaciones que ingieren dietas no occidentales, con mayor contenido de fibra dietaria (Schnorr, 2014).

Probióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped (Hill et al., 2014). Entre los probióticos más conocidos se encuentran las bacterias lácticas y las bifidobacterias las cuales mantienen una citotoxicidad baja y su presencia produce beneficios en la salud y actividad antimicrobiana (Abdelhamid et al., 2019).

El género *Bifidobacterium* incluye microorganismos gram positivos, heterofermentativos, sin esporas y sin movilidad, pertenecen al grupo de bacterias anaerobias que habitan principalmente el intestino de animales y pueden cultivarse. Las bifidobacterias, como grupo, pueden fermentar una gran variedad de fuentes de carbono complejas, sin embargo, la capacidad de utilizar carbohidratos específicos depende de cada cepa (Pokusaeva et al., 2011). *Limosilactobacillus* (previamente género *Lactobacillus*) agrupa bacterias gram positivas, en forma de bastón o cocoide, anaerobias o aerotolerantes. Gran parte de las especies incluidas en este género son aisladas del tracto gastrointestinal de animales, y son capaces de fermentar varios tipos de carbohidratos. (Zheng et al., 2020). El principal producto de la fermentación de carbohidratos no digeribles por bacterias probióticas son los Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC), siendo los más importantes Butirato, Propionato y Acetato, con este último como el más abundante en el colon o en materia fecal de mamíferos. *B. longum* metaboliza carbohidrato a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), acetato y lactato.

Específicamente, la cepa *B. longum* DSM 20219 (ATCC 15707) es considerada probiótica (Chen et al., 2021; Zhang et al., 2019; Chen et al., 2013) al promover diversos efectos benéficos en el hospedador. En un modelo murino, esta cepa ha demostrado mejorar las defensas y proteger contra la infección con *Clostridium difficile* a través de la producción de acetato, y aliviar los síntomas (Yun et al., 2017), reducir la colitis severa en ratas (Celiberto et al., 2017), modular la producción de citoquinas contra la respuesta Th-1, lo que es favorable en pacientes con síndrome de colon

irritable (Medina et al., 2007) y promover mayor masa ósea (Parvaneh et al., 2015). Además posee factores de adhesión celular y efecto antiviral (Abdelhamid et al., 2019).

L. reuteri ATCC 23272 es una cepa probiótica de referencia muy utilizada en investigación relacionada al desarrollo de alimentos (Karimi et al., 2021; Al-Hadidi et al., 2021, Chen et al., 2013). Esta cepa tiene la capacidad de reducir los efectos del daño histopatológico en infecciones ocasionadas por *Citrobacter*, reducir la incidencia y severidad de enteritis necrotizante y estabilizar la barrera intestinal murina (Mackos et al. 2016).

Los AGCC son metabolitos secretados por las bacterias y dado que pueden ejercer un efecto benéfico para la salud humana, que pueden ser considerados postbióticos (Vallianou et al., 2020; Hernández-Granados & Franco-Robles, 2020). Los AGCC disminuyen el pH del lumen del intestino, y cumplen funciones importantes como fuente de energía para células epiteliales del colon, participa en la formación de mucina, mejorando la absorción en el intestino y regulando el sistema inmune (Makki et al., 2018). Poseen funciones en otros órganos, e incluso se han visto involucrados en la transcripción de genes relacionados a trastornos de espectro autista (TEA), enfermedades metabólicas e inmunológicas y pueden tener efecto en el comportamiento (Salvucci 2019b).

La fermentación de carbohidratos complejos por microorganismos como las bifidobacterias, proporciona carbohidratos más simples (monosacáridos y oligosacáridos) que pueden ser utilizados por otros componentes microbianos que habitan el intestino (Turroni et al., 2012). La fermentación y el metabolismo de estos carbohidratos producen entre otros metabolitos, acetato, que sirve como sustrato para productos de degradación microbiana secundaria, como las bacterias entéricas productoras de butirato (Falony, 2009). El butirato es crucial en la microbiota para mediar las respuestas inmunes, ejercer protección antiinflamatoria y mantener la barrera intestinal. Por lo tanto, se puede atribuir que las bifidobacterias ejercen un efecto beneficioso no solo por sus capacidades intrínsecas, sino que al producir metabolitos secundarios, como ácido acético, al metabolizar carbohidratos en el tracto gastrointestinal, promueven además el incremento de la abundancia de cepas productora de butirato.

Prebióticos

Se le llama fibra dietaria a los polímeros de carbohidratos resistentes a la digestión endógena que pueden atravesar el intestino delgado sin ser absorbidos por el hospedador. Cuando estos son susceptibles a ser fermentados por bacterias colónicas, y generar en consecuencia beneficios ecológicos o funcionales para el huésped, se los conoce como prebióticos. (Makki et al., 2018; Al-Sheraji et al., 2013).

Los prebióticos promueven la mejora en la salud del hospedero a través de efectos fisiológicos, alterando de forma positiva el número o actividad de microorganismos benéficos. Las fibras que componen ciertos alimentos deben cumplir tres criterios para ser considerados prebióticos: 1) Resistir la acidez gástrica, hidrólisis y absorción gastrointestinal; 2) Ser fermentables por microorganismos del colon y 3) Estimular selectivamente el crecimiento o actividad de bacterias intestinales.

Un ejemplo de prebiótico es la inulina, un fructano lineal, un polisacárido de reserva que se encuentra en ciertas plantas, como dalia (*Dahlia spp.*) y achicoria (*Cichorium intybus*) cuya estructura consiste en una molécula de fructosas unidas por enlace β (2 \rightarrow 1) con una glucosa terminal unida por un enlace (1 \rightarrow 2) (Kays & Nottingham, 2007). Es usada como ingrediente funcional dado que ofrece la combinación de propiedades interesantes nutricionalmente y beneficios tecnológicos utilizándose como reemplazo de la grasa para mejorar la textura, sensación en boca y flavour de diversos productos (Tsatsarakou et al., 2021). Fructanos como la inulina son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado y llegan al colon donde son fermentadas por bacterias como de los géneros *Limosilactobacillus* y *Bifidobacterium*.

De la misma manera, otros polímeros como los α -galactooligosacáridos (α -GOS) son capaces de promover el crecimiento de ciertos grupos bacterianos. Los α -GOS son oligosacáridos con enlaces α -galactosídicos comúnmente encontrados en plantas, principalmente en legumbres. El intestino humano no cuenta con la enzima α -galactosidasa, por lo que estos compuestos atraviesan el aparato digestivo hasta llegar al colon, donde son fermentados por bacterias de la microbiota, y han sido descritos como prebióticos en otros estudios *in vitro* e *in vivo* (Xiaoli et al., 2008; Lamsal, 2012; Torres et al., 2010).

En la figura 2 se puede observar la composición química de las diferentes moléculas poliméricas encontradas en legumbres con grado de polimerización de 2 a 6.

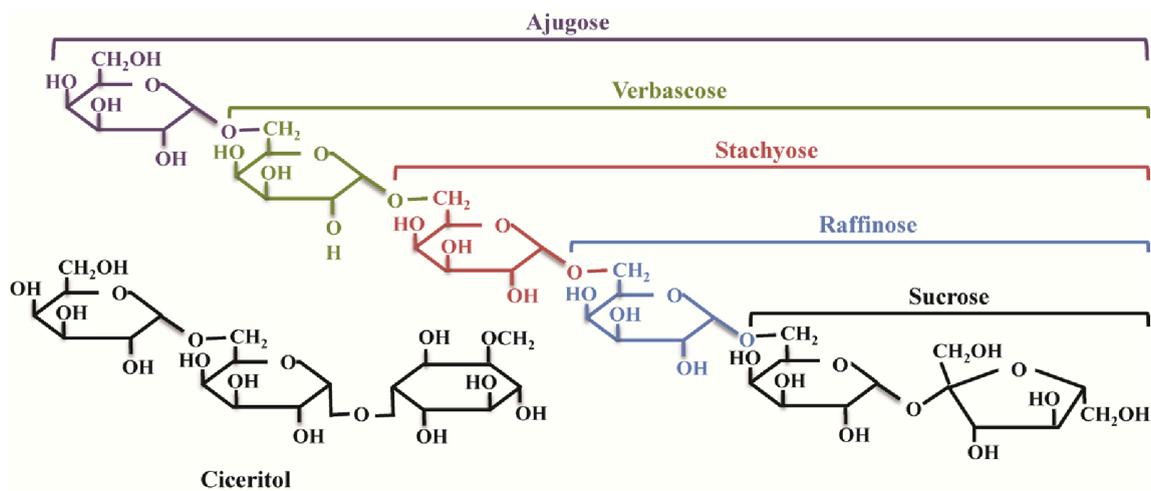


Figura 2: Estructura química de los diferentes azúcares usualmente encontrados en legumbres.

La asociación científica internacional de probióticos y prebióticos (ISAPP) define a los sinbióticos como una mezcla que consta de microorganismos vivos y sustrato(s) que son selectivamente aprovechados por microorganismos del huésped, y confieren un beneficio en la salud del huésped. Los sinbióticos pueden ser aprovechados para aumentar la supervivencia de bacterias probióticas en la producción de alimentos, y además, la combinación de prebióticos y probióticos produce un efecto sinérgico en cuanto a los beneficios de ambos elementos por separado. Las combinaciones más utilizadas para los sinbióticos incluyen a bacterias lácticas y bifidobacterias, junto con distintos oligosacáridos como fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS). (Swanson et al., 2020; Pahri et al., 2022; Martyniak et al., 2021).

Garbanzo

El garbanzo (*Cicer arietinum L.*) es la segunda leguminosa más cultivada a nivel global, domesticada hace aproximadamente 10.000 años y desde entonces seleccionado para aumentar su producción y tolerancia a enfermedades (Redden, 2007). Existen dos variedades de garbanzo altamente consumidos a nivel global, los tipo Kabuli y los tipo Desi. Los primeros, de color cremoso, son consumidos y producidos en la mayor parte de países del globo. Los tipo Desi, con semillas más pequeñas y

oscuras, poseen un gran consumo en el sur de Asia, Este de África y en Australia. (Gaur, 2015).

Los garbanzos son un alimento funcional que aporta una variedad de carbohidratos complejos, fibra dietaria y ácidos grasos poliinsaturados, además de poseer actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos, y antocianinas en el caso de los pigmentados tipo Desi. (Losano Richard 2021, Pasqualone 2021). Al igual que el resto de las legumbres, los garbanzos contienen oligosacáridos de la familia de las rafinosas, un tipo de a-GOS, en los cuales se encontraron propiedades prebióticas (Farias, 2019).

En Argentina, el garbanzo es la tercera legumbre en importancia y el país se encuentra entre los 10 principales exportadores de esta leguminosa, exportando entre 40 y 80 toneladas/año. En el año 2020 la superficie cultivada de esta leguminosa en nuestro país fue de 112547 hectáreas, la producción fue de 177061 toneladas y el rendimiento fue de 1,5732 (tn/ha) (FAO, 2020). Argentina es un importante productor de garbanzos tipo Kabuli pero la expansión ha impulsado la necesidad de desarrollar nuevos genotipos que satisfagan mejor las necesidades del mercado local y global de abastecimiento para el consumo humano. Los garbanzos tipo Desi tienen mayor tolerancia a condiciones no ideales, y su crecimiento se ve menos afectado por la falta de agua. En un contexto de calentamiento global y el agua convirtiéndose en un recurso cada vez más escaso, la incorporación de cultivos resistentes a temporadas secas es de suma importancia. (Farooq, 2018).

El garbanzo, así como otras legumbres, son fuente de GOS que pueden ser evaluados solos o en combinaciones con distintas cepas de interés para formular alimentos sinbióticos capaces de modular la microbiota intestinal de manera que ejerza un efectos beneficiosos sobre la salud humana.

Objetivo General

El objetivo de este estudio es determinar la capacidad prebiótica *in vitro* de diferentes extractos de garbanzos ricos en galactooligosacáridos utilizando cepas bacterianas representativas del microbioma intestinal.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto prebiótico de extractos ricos en GOS de diferentes tipos de garbanzos, a través del crecimiento relativo de cepas bacterianas de *Bifidobacterium longum subsp longum* DSM 20219, *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Evaluar la producción de ácido acético y compuestos volátiles en cultivos con extractos de garbanzos ricos en GOS.

Materiales y Métodos

Materiales

Se utilizaron genotipos de garbanzos correspondientes a dos tipos de garbanzo, Desi y Kabuli. Estos granos proceden del banco de germoplasma “Alpa Sumaj” localizado en la Universidad Nacional de Córdoba. El programa contribución al mejoramiento genético del garbanzo, con sede en la FCA posee una colección de germoplasma de poblaciones locales, cultivares de diferentes países, líneas en selección y cultivares de garbanzo nacional.

Los cultivares utilizados fueron Chañarito Negro UNC (Desi) y Norteño (Kabuli) sembrados en la localidad de Chañaritos, departamento Cruz del Eje, Córdoba. Este germoplasma es producto de numerosos proyectos de mejora genética llevados a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) UNC.



Fig. 3: Dos variedades de garbanzos con su coloración distinta: Kabuli (izquierda) y Desi (derecha).

Extracción de oligosacáridos

Los granos fueron molidos en un molino Cyclotec con malla de 0.5 mm. Se extrajeron los lípidos mediante Soxhlet. 4 g de harina, fueron mezclados con 20mL de etanol-agua 50% v/v dentro de un tubo cerrado. El tubo fue colocado en un baño de agua a 70°C por 30 min, agitando con un vortex antes de iniciar el baño y cada 15 minutos. Luego se centrifugó el tubo a 8000 g durante 30 min a T° ambiente, y se extrajo el sobrenadante. Este procedimiento (etanol-agua, baño caliente + vortex y centrifugar) se realizó por duplicado.

El sobrenadante fue llevado a pH 4 (punto isoeléctrico de proteínas) utilizando HCl 2M. Luego fue centrifugado a 10000 g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, fue llevado a pH 7 con NaOH 2M, secado a horno en 55°C con circulación de aire durante 16 hs. Las muestras fueron congeladas a -80°C y para luego ser finalmente liofilizadas durante 48hs (Losano Richard et al., 2021).

Análisis cromatográfico

La separación y cuantificación de los componentes identificados de las semillas de garbanzo se realizó mediante cromatografía líquida en un sistema HPLC-RI (Shimadzu, Japón), equipado con una Columna Luna Omega 3 µm SUGAR 100 A# (Phenomenex, EE. UU.). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo (ACN 75% v/v) con un caudal de 1,2 ml por min. La temperatura del horno fue de 35°C. El tiempo total de ejecución fue de 120 minutos/muestra con un intervalo de lavado de 10 minutos entre dos ejecuciones de muestra. Para limpiar la columna, se utilizó ACN al 20 % (v/v) cada tres series de muestras. La cuantificación se basó en una curva estándar generada utilizando estándares comerciales en cinco concentraciones diferentes.

Capacidad prebiótica

Cepas bacterianas y medios de cultivo

Para los ensayos de capacidad prebiótica se utilizaron las siguientes cepas de bacterias:

1. *Bifidobacterium longum subsp longum* ATCC 15707 (American Type Culture Collection) (*B. longum*)
2. *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 23272 (*L. reuteri*).
3. *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*).

Las cepas fueron preservadas a -20°C y -80°C, utilizando medio Leche-Extracto de levadura (LEL) (Leche descremada en polvo 100 g/L, extracto de levadura 5 g/L y glucosa 10 g/L) para *B. longum* y *L. reuteri*, y caldo cerebro corazón (BHI) para *E. coli*. Se utilizó glicerol 15% como crioprotector en todos los medios.

Para el uso de las bacterias, luego de descongelarse, pasaron por dos instancias de cultivo sucesivas (activación y repique) por 24 hs, con medios de cultivo adecuados para su crecimiento inoculados al 1%. Se utilizó medio MRS para ambas cepas probióticas y para *E. coli* se utilizó medio caldo cerebro corazón (Britania). *B. longum* fue incubada en condiciones de anaerobiosis utilizando una jarra y sobres generadores de anaerobiosis (AnaeroPak). Los medios de cultivo fueron esterilizados utilizando un autoclave, a 121°C durante 15 minutos, excepto para LEL que fueron esterilizados durante 10 minutos.

Efecto prebiótico

Para determinar el efecto prebiótico, se utilizaron los siguientes medios: MRS para *B. longum* y *L. reuteri* y medio mineral M9 para *E. coli*. (Ayad et al., 2020; Rubel et al., 2014). Ambos medios fueron preparados sin agregado de glucosa (Huebner et al., 2007; Sims et al., 2014).

La composición y preparación de los medios fue la siguiente:

Medio Mínimo M9

Fórmula g L-1

Fosfato disódico	6
Fosfato de potasio	3
Cloruro de sodio	0,5
Cloruro de amonio	1 mL

Sulfato de magnesio heptahidratado 1M	1 mL
Cloruro de calcio anhidro 0,01 M	10 mL
	pH final: 6,8 ± 0,2

Esterilizar en autoclave a 121 ° C, 15 minutos.

Caldo MRS

Fórmula en g L-1

Peptona de carne	10,0
Extracto de levadura	5,0
Extracto de carne	10,0
Glucosa	20,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Tween 80	1,0
	pH final: 6,5±0,2

Suspender 55,25 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y calentar a ebullición mezclando durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Para los medios agarizados se agregó agar-agar (Britania) al 1,5%.

Para evaluar la capacidad de estas distintas cepas de crecer con fuentes de carbono, se reemplazó la glucosa en la composición original de los medios por los siguientes tratamientos al 0,5% p/v:

1. Glucosa (G).
2. Extracto de garbanzos Desi (EGD).
3. Extractos de Garbanzos Kabuli (EGK).
4. Inulina comercial (Orafti) (IN).
5. Sin azúcares (SA).

Todos los tratamientos fueron cultivados durante 24 hs a 37°C en condiciones aeróbicas o utilizando una jarra de anaerobiosis si la cepa lo requiriese. Previo a la inoculación, las bacterias fueron centrifugadas, descartando su medio de activación y lavadas con solución salina (NaCl 0,9%). Cada tratamiento se realizó por duplicado. La glucosa agregada en los ensayos prebióticos fue esterilizada mediante filtración. Los extractos de oligosacáridos y la inulina fueron esterilizados mediante exposición a luz UV durante 15 minutos.

Inmediatamente luego de la inoculación (0h) y luego de 24hs, se realizaron siembras en placas con medio MRS Agar, y se incubaron durante 24 hs a 37 °C, en condiciones anaeróbicas en el caso de *B. longum*. Posteriormente, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Luego de las 24hs de crecimiento en cada tratamiento, se tomaron alícuotas de los medios para determinación de pH, turbidez (DO₆₀₀) y compuestos volátiles.

Crecimiento relativo y puntuación de actividad prebiótica

El crecimiento relativo (CR) se calculó comparando el crecimiento de una cepa en particular con alguna de las fibras prebióticas con el crecimiento de la misma cepa con glucosa. El cálculo se realizó para cada cepa teniendo en cuenta las 3 fibras prebióticas (EGD, EGK, IN), siguiendo la fórmula:

$$CR = \frac{(P24 - P0)}{(G24 - G0)}$$

Donde P0 y P24 son el logaritmo de UFC/mL en el medio con fibra prebiótica a tiempos 0 hs y 24 hs, y G0 y G24 son el logaritmo de UFC/mL en el medio con glucosa a los tiempos 0 hs y 24 hs.

La puntuación de la actividad prebiótica o **prebiotic activity score (PAS)** se calculó comparando el crecimiento relativo de cepas probióticas (*B. longum* y *L. reuteri*) en relación al crecimiento relativo de una cepa entérica (*E. coli*), utilizando la fórmula de Huebner et al. (2007):

$$PAS = \frac{(XP24 - XP0)}{(XG24 - XG0)} - \frac{(EP24 - EP0)}{(EG24 - EG0)}$$

Donde XP24 y XP0 representan el logaritmo de UFC/mL de la cepa probiótica en presencia del prebiótico a los tiempos 24 hs y 0 hs, XG24 y XG0 el logaritmo de UFC/mL de la cepa probiótica en presencia de glucosa a los tiempos 24 hs y 0 hs, EP24 y EP0 el logaritmo de UFC/mL de la cepa entérica en presencia del prebiótico a tiempos 24 hs y 0 hs, y EG0 y EG24 el logaritmo de UFC/mL de la cepa entérica en presencia de glucosa a los tiempos 0 y 24 hs.

Las sustancias consideradas prebióticas estimulan el crecimiento de ciertas cepas probióticas o beneficiosas, por lo tanto se espera un crecimiento (CFU/mL) comparable al obtenido con glucosa. Por el contrario, se espera que el crecimiento de cepas entéricas sea menor en presencia de compuestos prebióticos que en glucosa. La puntuación de actividad prebiótica refleja esta información, de manera relativa para un prebiótico y un probiótico en particular.

Índice prebiótico

Se determinó el índice prebiótico para Inulina y ambos extractos, calculado como:

$$IP = \left(\frac{B. Longum}{Total} \right) + \left(\frac{L. Reuteri}{Total} \right) - \left(\frac{E. coli}{Total} \right)$$

Donde **IP** es índice prebiótico. *B. longum*, *L. reuteri*, *E. coli* representa el número de viables (UFC/mL) a las 24 h de cada una de las cepas evaluadas dividido el recuento inicial (0h), y **Total** es la suma de todos los recuentos a las 24 h de cultivo dividido el total de los recuentos iniciales (0h).

La ecuación de Palframan et al. (2003) toma a las cepas probióticas como valores positivos, y las entéricas como negativas. Se coloca el número total de crecimiento en cada cepa, normalizado por su número inicial, y comparado con el total

de bacterias. Si una cepa en particular tiene un crecimiento relativo mayor que el total de cepas, se obtiene un valor >1 , lo opuesto da como resultado un valor <1 . Por último se colocan estos valores en la fórmula para obtener un resultado final que refleja el tipo de especies favorecido por el oligosacárido en cuestión. Siguiendo a estos autores, realizamos la determinación del IP, considerando como negativas a la cepa entérica.

Determinación de AGCC

Luego del cultivo durante 24 hs en los medios enriquecidos con distintas fuentes de carbono, los mismos fueron centrifugados, y su sobrenadante almacenado a -80°C hasta su uso. El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un sistema CP-3800 (Varian) con un detector Saturn 2200 (Varian), con una columna Agilent Agilent N° 122-7032 DB-Wax, 30m x 0,25 mm. Para la microextracción en fase sólida se utilizó una fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano 50/30 mm (Supelco). La temperatura de extracción fue de 35°C y el pH se ajustó a 2,5 con ácido sulfúrico. Se utilizaron estándares de grado GC (Paesani *et al.*, 2020) Se analizó la presencia de los AGCC y otros compuestos volátiles (Lancetti et al. 2020; Fiorini et al. 2016).

Cálculos estadísticos.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis lineal de la varianza (ANOVA), utilizando el programa Infostat (Di Rienzo, 2017) para determinar diferencias estadísticamente significativas (valor $p < 0,05$) entre distintos grupos.

Resultados

Caracterización del extracto

Mediante el análisis de las muestras se pudo determinar y cuantificar la presencia de cinco azúcares: fructosa, glucosa, sacarosa, rafinosa y estaquiosa. También se pudo estimar el contenido de ciceritol. En cuanto a los oligosacáridos el más abundante en los extractos fue ciceritol alcanzando $0,69 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$ en EGK y $0,76 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$ en EGD por cada 100 g de garbanzo, seguido de rafinosa con valores significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre EGK y EGD ($0,26 \text{ g/100 g}$ y $0,38 \text{ g/100 g}$, respectivamente) y por último estaquiosa con $0,23 \text{ g/100 g}$ de garbanzo en las muestras Kabuli y $0,25 \text{ g/100 g}$ en las muestras Desi.

Los extractos presentaron diferencias significativas según el tipo de garbanzo en cuanto a fructosa, sacarosa y rafinosa ($P < 0,05$) (Figura 4). En los extractos de garbanzos de tipo desi (EGD) se encontró una mayor cantidad de fructosa y rafinosa, en comparación con el extracto de garbanzos de tipo Kabuli (EGK). En cambio, en estos últimos, se observó una mayor cantidad de sacarosa.

Se obtuvo un total de 4 g y de 3,54 g de oligosacáridos de grado de polimerización de 2-5 azúcares por cada 100 g de garbanzos para EGK y para EGD, respectivamente, lo que coincide con lo informado por otros autores (Khatoon & Prakash, 2009).

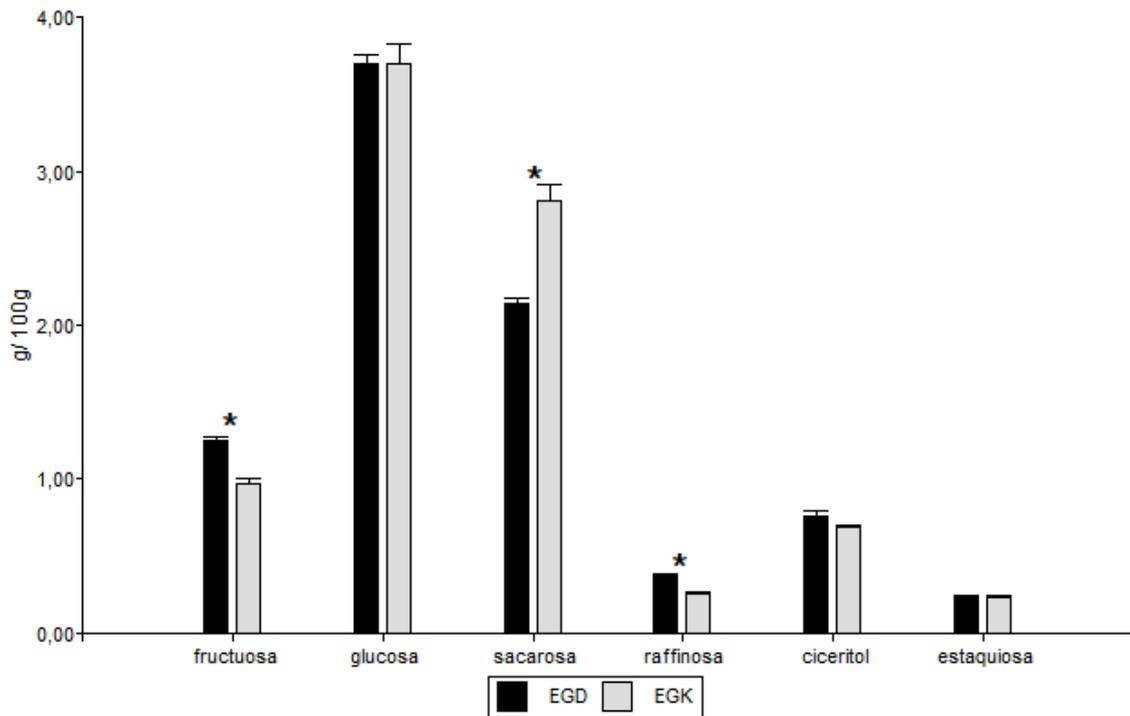


Figura 4: Cuantificación (g azúcar/ 100 g de garbanzos) de los azúcares presentes en los extractos. Las comparaciones señaladas con un * indican la existencia de diferencias significativas ($P < 0,05$) entre ellos.

Actividad prebiótica

Un ensayo utilizado para estudiar la actividad prebiótica de un compuesto o un extracto, como en este caso, es la comparación en el crecimiento de determinadas cepas probióticas en un medio basal suplementado con un azúcar testigo (en este caso glucosa) utilizada habitualmente como fuente de carbono y el medio suplementado con el extracto de estudio.

En la figura 5 se puede observar la diferencia en los recuentos de viables (\log UFC/mL) entre tiempo inicial (tiempo 0) y tiempo final (luego de 24hs) de cultivo en presencia de EGK, EGD, inulina (IN) y glucosa (G). En el caso de *L. reuteri*, el aumento de microorganismos en 24 horas es similar en todos los tratamientos alcanzaron un crecimiento medio de \log_{10} 2,15 UFC/mL, por lo que la IN y ambos extractos producen un efecto similar a la G en el crecimiento de la cepa utilizada. *B. longum* tuvo un crecimiento similar al alcanzado con glucosa con los extractos de garbanzo de ambas variedades (2 \log_{10} UFC/mL). En cambio, al utilizar inulina, se

observa un crecimiento significativamente menor, con un aumento de Log₁₀ UFC/mL de 1,05.

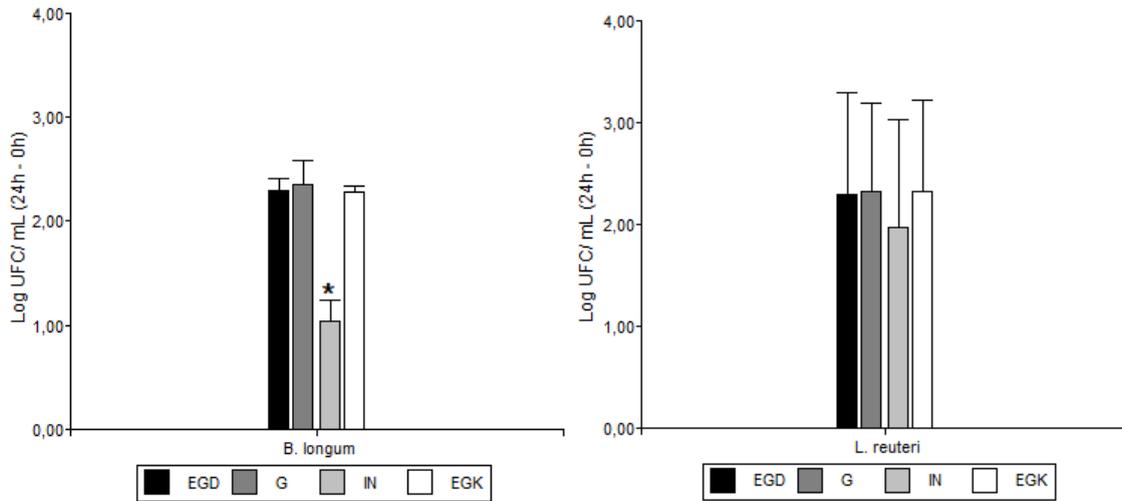


Figura 5: Crecimiento de A) *B. longum* y B) *L. reuteri*, representado como la diferencia en log UFC/mL entre los tiempos final e inicial de cultivo. Los tratamientos marcados con un * indican una diferencia significativa ($P < 0,05$) con el resto de ellos.

Crecimiento microbiano. Turbidez

Otra forma de determinar el crecimiento microbiano es mediante la medición de la turbidez. Una determinación indirecta y complementaria que nos permite determinar la diferencia de crecimiento en los distintos medios suplementados. Se analizó la turbidez del cultivo mediante lectura de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.

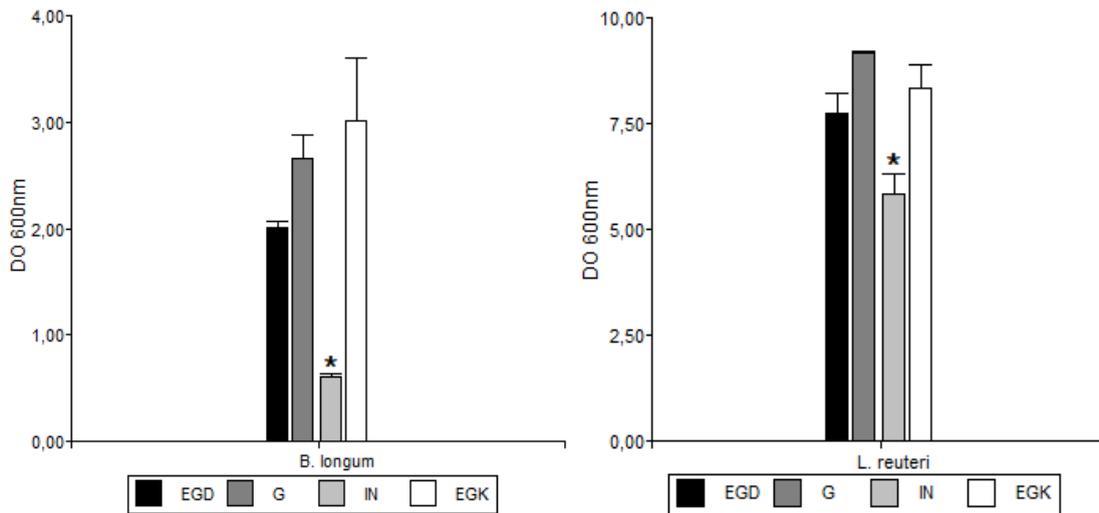


Figura 6: Turbidez del medio producida por el crecimiento de **A)** *B. longum* y **B)** *L. reuteri*. Los tratamientos marcados con un * indican una diferencia significativa ($P < 0,05$) con el resto de ellos.

Se observa, para ambas cepas, que la menor turbidez se obtiene en el medio con inulina, lo que está de acuerdo con lo observado en el método de recuento en placa. Mientras que los extractos de GOS de ambos garbanzos alcanzan una turbidez similar al medio suplementado con glucosa (Figura 6), sin encontrarse diferencias significativas, lo que también confirma lo observado anteriormente.

pH

El metabolismo de bacterias lácticas produce acidificación en los medios de cultivo, por lo que el pH es una variable importante, como indicador de la actividad de las bacterias, y la liberación de compuestos de interés. Se midió el pH de los medios a las 24 hs de cultivo (Figura 7).

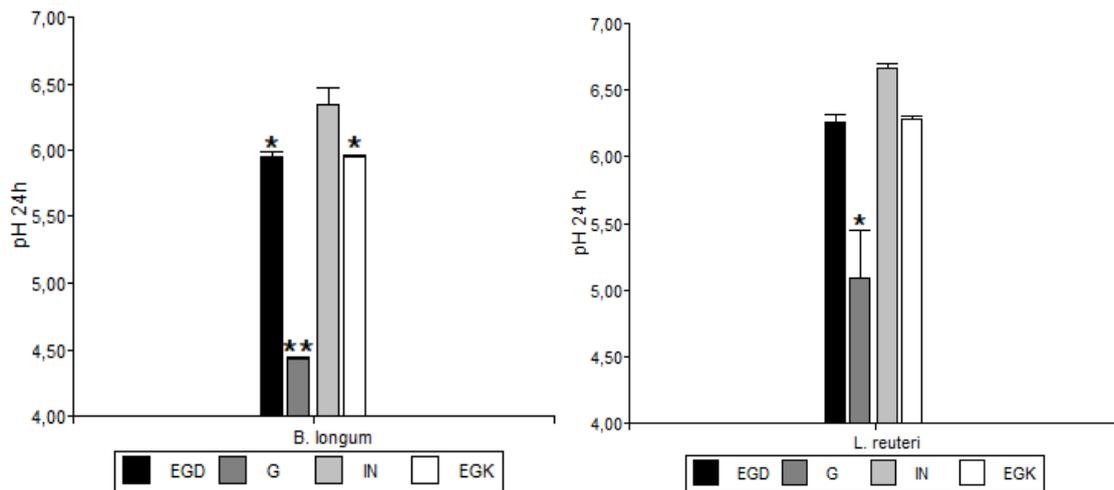


Figura 7: pH de los cultivos con diferente fuente de carbono a las 24h. **A)** *B. longum* y **B)** *L. reuteri*. Los grupos con un * pertenecen a un mismo grupo sin diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ellos.

Las cepas probióticas utilizadas mostraron diferencias en el cambio de pH del medio según el suplemento utilizado. Para ambos probióticos, el medio alcanzó la mayor acidez (pH= 4.4 en *B. longum* y pH= 5,0 en *L. reuteri*) con el consumo de glucosa (Figura 7A y 7B).

En el caso de *L. reuteri*, el resto de los oligosacáridos presentes en el medio (IN, EGK y EGD) causaron una disminución similar del pH, lo que coincide con la bibliografía de trabajos previos. *B. longum* en presencia de IN alcanzó un pH de 6.3, mientras que en los medios con EGK y EGD el pH disminuyó a valores de 6.15, siendo estos significativamente diferentes ($P < 0,05$) al medio con inulina (Figura 7A). Esta circunstancia, al utilizar GOS, se ha observado y ha sido reportada por otros autores.

Crecimiento relativo y puntuación prebiótica

Los estudios de compuestos prebióticos sugieren continuar en la búsqueda de índices que permitan cuantificar y comparar la actividad prebiótica de distintos componentes de alimentos. A partir de la literatura consultada y trabajos previos se calculó el crecimiento relativo y la puntuación de actividad prebiótica obtenida para IN, EGK y EGD, con base en los resultados de crecimiento obtenidos.

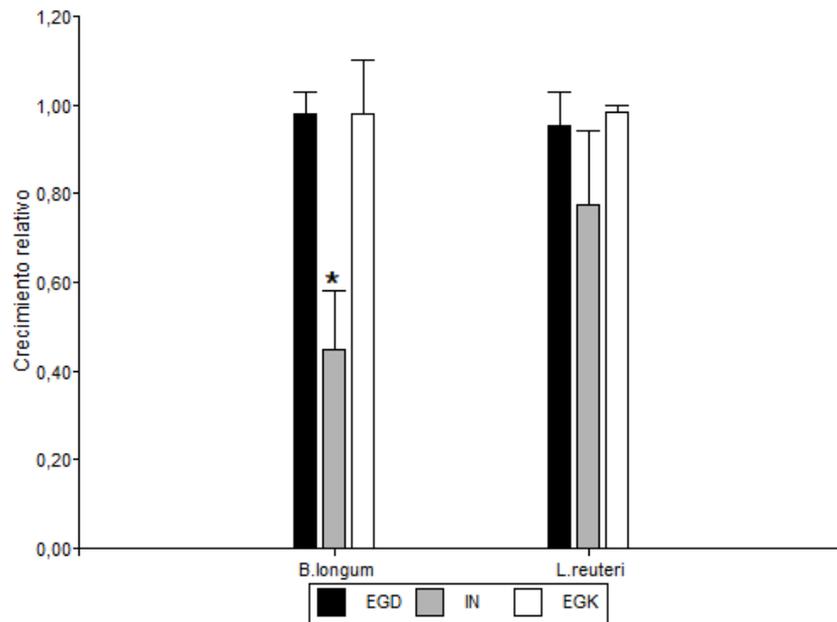


Figura 8: Crecimiento relativo de las cepas *B. longum* y *L. reuteri* en medios con EGD, EGK e Inulina. Los tratamientos marcados con un * indican una diferencia significativa ($P < 0,05$) con el resto de ellos.

El crecimiento relativo expone la relación entre el crecimiento de una misma cepa en un compuesto prebiótico y con respecto a la glucosa. Esta relación fue cercana a 1 (crecimientos similares) para casi todas las combinaciones de cepas y prebióticos. *B. longum* alcanzó un crecimiento relativo similar a glucosa con los extractos de garbanzo, no así con inulina. Esto pone en evidencia que el extracto complejo de azúcares y oligosacáridos de garbanzo promueve el crecimiento de la cepa probiótica.

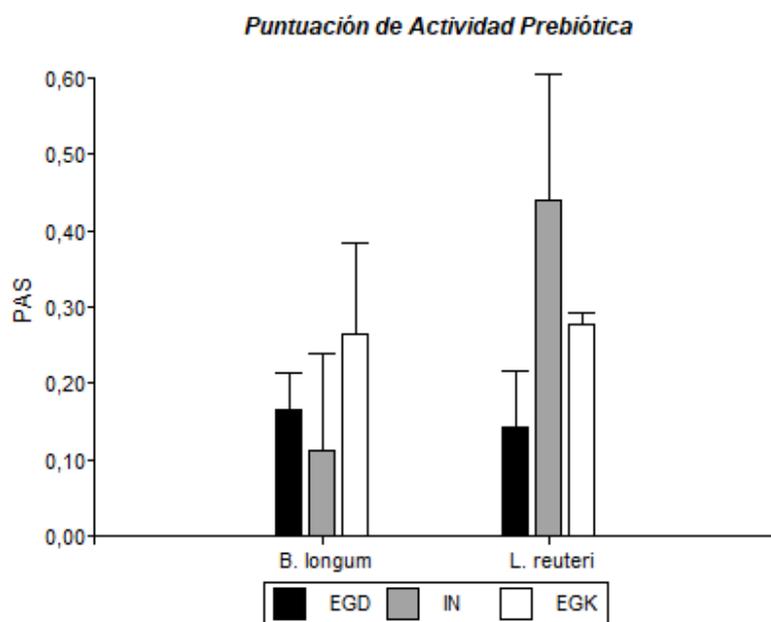


Figura 9: Puntuación prebiótica de los diferentes medios de cultivo luego del crecimiento de las cepas de *B. longum* y *L.reuteri*.

Tabla 1: Puntuación de actividad prebiótica.

Cepa	Tratamiento	PAS	E.E
B. longum	EGD	0,16	± 0,06
B. longum	EGK	0,26	± 0,16
B. longum	IN	0,11	± 0,17
L. reuteri	EGD	0,14	± 0,10
L. reuteri	EGK	0,27	± 0,02
L. reuteri	IN	0,43	± 0,23

La puntuación prebiótica (PAS, del inglés: prebiotic activity score) indica la diferencia entre crecimientos relativos de una cepa probiótica con respecto a cepas entéricas, representadas en este trabajo por la cepa de *E. coli*.

B. longum alcanzó un PAS de 0,26 con EGK, y 0,16 con EGD, por encima de los obtenidos con inulina presentó un valor de 0,11 aunque las diferencias no fueron significativas ($P>0,05$) entre los tres extractos evaluados.

L. reuteri alcanzó un PAS más alto (0,43) con inulina como sustrato, mientras que con EGK y EGD alcanzó un valor de 0,14 y 0,27, respectivamente. Estos valores

que no presentaron diferencias significativas y demuestran que los extractos pueden ser metabolizados y utilizados como fuente de carbono por ambas cepas probióticas evaluadas alcanzando un score similar o mayor al prebiótico inulina.

Estos resultados indican una mayor utilización y preferencia de las cepas benéficas por los extractos comparados con glucosa, no así de la cepa entérica, lo que indica una promoción del crecimiento de las cepas probióticas por sobre las enterobacterias y es un primer indicio de su funcionalidad como extracto prebiótico de garbanzo.

Índice prebiótico

El índice prebiótico (Palframan et al., 2003), en este trabajo, asume como valores positivos al incremento de células pertenecientes a *Bifidobacterium* y *Limosilactobacillus*, y como valores negativos al incremento de *E. coli*. Se obtuvo los siguientes valores para EGD, EGK e inulina:

Tabla 2: Índice prebiótico

Tratamiento	IP
EGD	2,09
EGK	2,60
IN	2,77

Se observó un valor positivo, mayor a 2, para todos los compuestos utilizados, siendo el prebiótico comercial inulina el más alto de todos ellos. No hubo diferencias significativas en el índice prebiótico de los tres azúcares utilizados.

Determinación de AGCC

A continuación en la figura 10 se presentan los compuestos volátiles obtenidos por cromatografía gaseosa a partir del sobrenadante de los cultivos luego de 24 hs, expresados cada uno en porcentaje del total de compuestos para cada combinación de cepa y fuente de carbono.

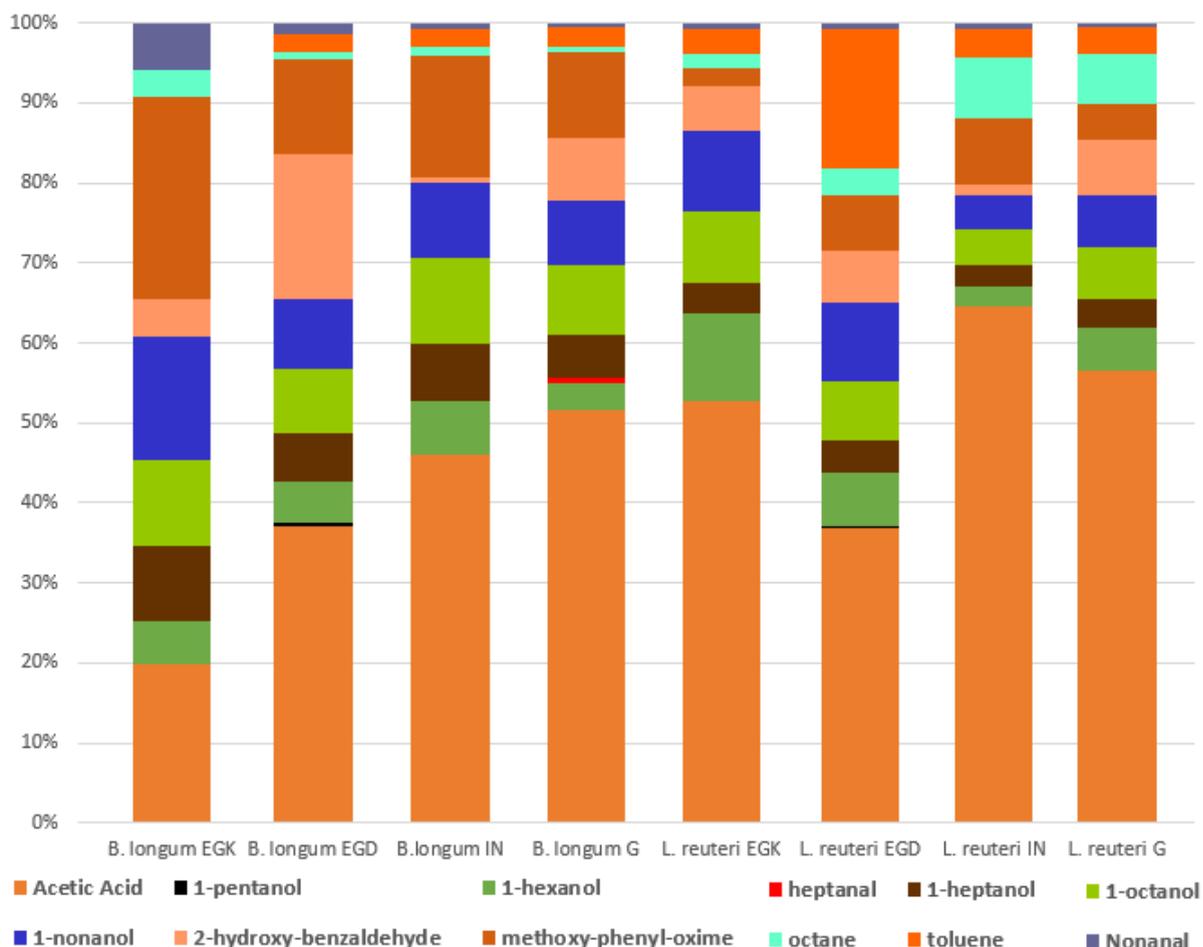


Figura 10: Perfil de compuestos volátiles obtenidos con ambas cepas evaluadas en distintos medios suplementados.

La determinación de compuestos volátiles mediante cromatografía gaseosa revela como dato de interés el contenido de ácidos acético, un AGCC crucial en el ecosistema intestinal, así como otros compuestos que pueden tener relevancia en productos fermentados o bien en el metabolismo intestinal. La figura muestra los compuestos encontrados en las muestras y su porcentaje relativo.

Se destacan la presencia, además de ácidos acético, de alcoholes como hexanol, heptanol, octanol, nonanol, y aldehídos como nonanal y decenal. *B. longum* produjo mayor porcentaje de nonanal en el medio con EGK (5,99 %) que con los otros compuestos (EGD= 1,45%; G= 0,61%). Esta misma fermentación produjo mayor porcentaje de nonanol comparado con otros sustratos y menor porcentaje de 2-hidroxibenzaldehído, lo cual es relevante ya que no es considerado un componente beneficioso en cuanto a perfil aromático.

Se encontró una mayor cantidad de methoxy-phenyl-oxime en los sobrenadantes donde fue cultivado *B. longum* que los de *L. reuteri* mientras que el 2-hidroxibenzaldehído se encontró en más bajo porcentaje en fermentaciones con inulina para ambas cepas (*B. longum* = 0,86%; *L. reuteri* = 1,36%).

En todas las fermentaciones se detectó la presencia de heptanol. Los porcentajes, en general, fueron mayores en fermentaciones con *B. longum* que con *L. reuteri*, con mayor porcentaje encontrado *B. longum* utilizando EGK como sustrato (9,38%).

El estudio de los aldehídos y alcoholes producidos en estas fermentaciones es interesante además desde el aspecto tecnológico. La fermentación de derivados de garbanzo con bacterias probióticas, a fin formular un alimento funcional, genera estos compuestos volátiles que contribuyen al aroma y sabor, otorgando sabores frutales, o florales, en algunos casos o desagradables como en el caso del benzaldehído. Mantener un balance apropiado de características nutricionales y sensoriales es el objetivo en el desarrollo de alimentos funcionales y la utilización de cepas probióticas es una alternativa. Estos estudios se deben continuar con análisis nutricionales y de biodisponibilidad de compuestos de interés.

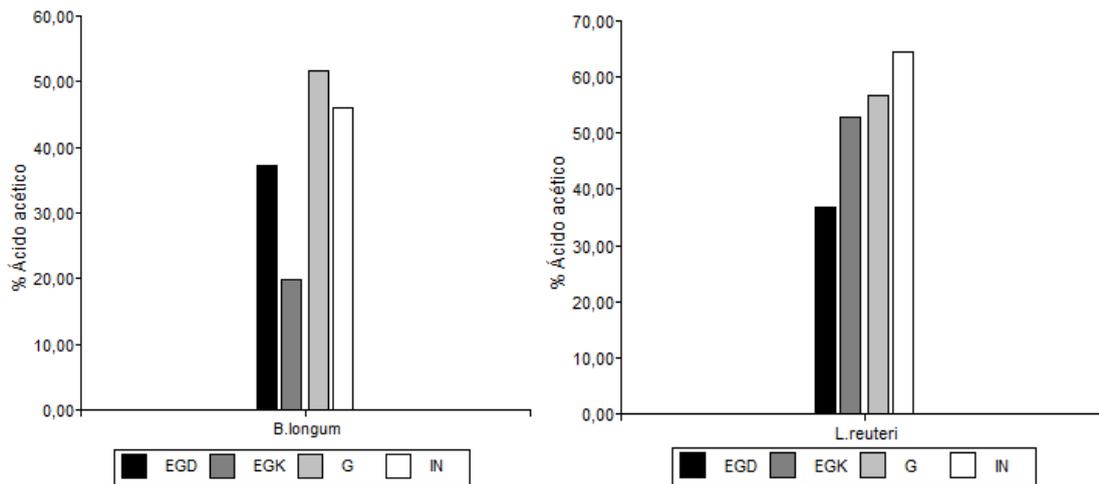


Figura 11: Porcentaje de ácido acético en sobrenadantes de cultivos de **A)** *B. longum* y **B)** *L. reuteri* con diferentes fuentes de carbono.

En fermentaciones con diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se observa un incremento de ácido acético (De Preter et al., 2011; Nissen et al., 2021; Cao et al., 2019). En nuestro ensayo, *L. reuteri* produjo mayor porcentaje de ácido acético en el medio con EGK (52,72%) en comparación con el de EGD (36,79%), y el mayor porcentaje se encontró en el medio con inulina (64,52%). El porcentaje en los medios con extracto de GOS fue similar o mayor al medio con glucosa (Figura 11).

B. longum presentó mayor porcentaje de acético en el medio suplementado con glucosa, seguido del medio con inulina, y entre los extractos de GOS, la producción de ácido acético fue menor en el medio con EGK (19,83%) en comparación con el de EGD (37,12%) (Figura 12).

Discusión

Los mono-, di- y oligosacáridos encontrados coinciden con lo visto en garbanzos y legumbres en general (Sánchez-Mata et al., 1998; Rupérez, 1998). Los extractos contienen GOS de grado de polimerización de 2 a 5. Esto coincide con los obtenidos por Mei et al., (2022) y Xiaoli et al., (2008). La menor presencia de fructosa en los granos tipo kabuli puede deberse a la formación de la sacarosa presente en el grano. La sacarosa facilita el transporte de energía en las plantas y juega un papel vital en la formación de granos. El contenido del disacárido dentro de los cotiledones se establece durante el llenado del grano. Turner (2009) observó una mayor actividad de la sacarosa sintasa y una disminución de la actividad de la sacarosa fosfato sintasa en granos kabuli, los cuales son más grandes que los desi. Este mecanismo favoreció una menor presencia de sacarosa en los cultivares JG-62 y Chañarito Negro UNC, mientras que los cultivares kabuli tuvieron un contenido elevado de sacarosa. Las interacciones químicas de los componentes de los alimentos son importantes para evaluarlo como posible prebiótico, ya que uno de los elementos que determinan el consumo de azúcares por parte de cepas probióticas es el grado de polimerización de los mismos y los porcentajes presentes (Sims et al., 2014).

Las harinas de garbanzo de los diferentes genotipos han sido identificadas como fuente de compuestos nutricionales bioactivos, específicamente galactooligosacáridos (GOS). Los GOS son compuestos con conocida actividad prebiótica, especialmente en las especies de *Bifidobacterium*, aunque también estimulan el crecimiento en ciertos miembros de *Lactobacillaceae* (Marzorati et al., 2023; Makki et al., 2018; Al-Sheraji et al., 2013). Estos GOS son capaces de conferir efectos positivos para la salud del ser humano y su microbioma. Dada la ausencia de enzimas en el sistema digestivo humano que puedan romper los enlaces galactosa-sacarosa, esta condición proporciona resistencia a la digestión intestinal y consecuentemente la utilización de los mismos por microorganismos de la microbiota intestinal que metabolizan GOS (Gangola et al., 2016, Zhang et al., 2017; Fernando et al., 2010). Rycroft et al. (2001) y Palframan et al (2003) describieron el efecto prebiótico de GOS comerciales.

En este trabajo se observó la presencia de rafinosa, ciceritol y estaquiosa en ambas muestras de extractos de garbanzo. Se obtuvo 3,54-4 g/100g de garbanzos de

oligosacáridos de GP 2-5 (sacarosa, rafinosa, ciceritol, estaquiosa) por debajo de lo obtenido por Mei et al., 2008. Esta diferencia puede deberse a diferencias en el método de extracción, genotipo de las muestras y variables ambientales.

Para comenzar a evaluar el efecto prebiótico de los extractos de garbanzo, realizamos ensayos de fermentación de cultivos puros utilizando cepas probióticas. *B. longum* es una especie estudiada en cuanto a su efecto prebiótico clínicamente bien estudiado sobre animales y humanos. El potencial de *B. breve* y *B. longum* de digerir eficientemente polisacáridos de plantas, resistencia a bajos pH, influencia sobre el metabolismo del hospedero y efecto antipatogénico, antiinflamatorio e inmunomodulador lo hace un probiótico muy utilizado (Chen et al., 2021; Fanning et al. 2012). *B. longum* ATCC 15707 es productora de acetato, presenta actividad antimicrobiana y efecto inmunomodulador. *L. reuteri* ATCC 23272 es una cepa obtenida de heces humanas ha demostrado tener capacidad de reducir los efectos del daño histopatológico en infecciones con *Citrobacter* y la incidencia y severidad de enteritis necrotizante y estabiliza la barrera intestinal (Mackos et al., 2016).

Estos microorganismos son representativos de la microbiota intestinal y, dados sus efectos beneficiosos, constituyen candidatos interesantes para combinar con prebióticos y obtener una modulación o cambio de la microbiota intestinal.

El método de determinación de índices y puntuaciones prebióticas permite estandarizar métodos comparables para evaluar un extracto o componente de alimento y, además, permiten establecer el tiempo y las condiciones deseados para cada cultivo, proporcionan información valiosa y no poseen limitaciones éticas del uso de animales de experimentación, por lo que ha sido adoptado como una herramienta común para el estudio de prebióticos (Moon et al., 2016).

Los extractos de ambos tipos de garbanzos demostraron tener un efecto positivo en el crecimiento de las cepas probióticas. El crecimiento de *L. reuteri* en MRS tuvo un recuento mayor a lo observado en otros trabajos (Ayad et al., 2020). Los medios suplementados con GOS, EGD o EGK, crecimiento relativo) indujeron un crecimiento similar al obtenido con glucosa, coincidente con observado por otros autores (Ambroggi et al., 2023). Los recuentos menores en *B. longum* ATCC 15707 con inulina como fuente de carbono pueden deberse a que generalmente *Bifidobacterium* no aprovecha de manera directa los compuestos de mayor grado de polimerización (Van Den Broek & Voragen, 2008). Los cálculos de crecimiento relativo en *L. reuteri* tuvieron todos un

valor cercano a 1, indicando que esta cepa puede aprovechar EGK y EGD de la misma manera que la glucosa.

La variación de pH es un parámetro de la cepas utilizadas cuando utilizan una fuente de carbono. La fermentación de inulina en el colon, por ejemplo, produce lactato y ácidos grasos de cadena corta, en su mayoría, acetato que producen un descenso del pH. La acidificación del medio es consecuencia de la liberación de estos metabolitos al medio por parte de las bacterias en actividad, por lo cual es práctica común observar los cambios de pH en los cultivos junto al crecimiento de las cepas, aunque estos dos parámetros no van siempre en conjunto, ya que la liberación de metabolitos varía en función de la fuente de carbono utilizada por la bacteria.

El crecimiento de ambas cepas probióticas provocó la disminución del pH con todas las muestras evaluadas aunque esta fue mayor con glucosa. *B. longum* disminuyó el pH a 6 utilizando los extractos de GOS, una variación similar fue reportada por Sims et al. (2014) utilizando GOS con DP de 2 a 5, al igual que los encontrados en los extractos de garbanzo. La disminución del pH en el caso de *L. reuteri* fue menor a la observada con glucosa. Esto coincide con Mei et al. (2011) quienes informaron que GOS de soja induce una disminución de pH menor que glucosa u otros oligosacáridos en cultivos de *B. longum* ATCC 15707 y *L. reuteri* ATCC 23272. Rubel et al. 2014, observan incluso una disminución menor de pH con distintos extractos de inulina como sustrato (0.10 aprox) utilizando cepas de *L. paracasei*.

Por otra parte, de acuerdo a estudios previos del grupo de trabajo, se continuó con la determinación de la actividad prebiótica calculando la puntuación prebiótica (PAS). La actividad prebiótica refleja la capacidad de un sustrato dado para soportar el crecimiento de un organismo en relación con otros organismos, en este caso, enterobacterias, y en relación con el crecimiento en un sustrato no prebiótico, como la glucosa. Las herramientas cuantitativas en los estudios de capacidad prebiótica como el PAS y el índice prebiótico permiten una estricta comparación entre componentes de alimentos y se han vuelto un recurso altamente utilizado en este campo de investigación (Rubel et al., 2014; Huebner et al., 2007; Mei et al., 2011; Olano Martín et al., 2002; Paesani et al, 2019). Estos índices brindan una herramienta comparativa cuantitativa en cuanto al potencial prebiótico que pueden tener extractos o componentes de alimentos. Además el método utilizado es comparativamente más sencillo que otros métodos que

involucran materia fecal y permite establecer la utilización del extracto por bacterias identificadas y caracterizadas que pueden tener un beneficio nutricional específico.

Las cepas evaluadas presentaron una actividad prebiótica positiva, lo que indica que los extractos fueron utilizados de manera similar a la glucosa. Además, el extracto de oligosacáridos de ambos tipos de garbanzo presentó actividad prebiótica y bifidogénica *in vitro*. La mayoría de los PAS informados por otros autores se encuentran en un rango de 0.2 a 0.4. Los GOS de garbanzo utilizados en este trabajo alcanzaron valores de PAS de 0,26, similar a lo reportado por Huebner et al. (2007), utilizando en ese caso otra cepa de *B. longum* con GOS purificados. En general los GOS promueven altos valores de PAS (Palframan et al., 2003), comparado con inulina y FOS (Huebner et al., 2007). Esto pone en evidencia que la extracción de GOS de garbanzos realizada produce un extracto capaz de promover el crecimiento de la cepa de referencia utilizada por sobre el de enterobacterias, lo que permite postular a esta combinación como base sinbiótica que sirva para desarrollar un alimento funcional.

Los valores del IP fueron mayores a 1 en todas las combinaciones de probióticos y prebióticos, sin diferencias significativas entre ellos. Esto confirma, en este caso, mediante métodos utilizados previamente por otros autores, que los oligosacáridos de garbanzos favorecen el crecimiento de bacterias lácticas y bifidobacterias sobre bacterias entéricas.

Trabajos previos que investigaron la utilización de diferentes extractos de oligosacáridos en diferentes cepas probióticas informaron variabilidad de acuerdo a la cepa utilizada y el prebiótico analizado. En el caso de *Bifidobacterium*, sin determinar índices de capacidad prebiótica, Mei et al. (2011) determinaron que las cepas *B. adolescentis* ATCC 15703, *B. longum* ATCC 15708, *B. breve* FRP 334 presentaron preferencia de GOS sobre azúcares, y la cepa *B. longum* ATCC 15707 creció mejor con FOS y GOS que con glucosa. Esto coincide con el presente trabajo, en el que observamos esta preferencia de la misma cepa probiótica, en este caso utilizando extracto de GOS de garbanzo y cuantificando esta preferencia mediante los índices calculados.

Es interesante destacar que varios autores han realizado ensayos de combinación de monosacáridos (fructosa, galactosa) y oligosacáridos (tanto en FOS como con GOS) y han reportado que el efecto bifidogénico, prebiótico y probiótico, es

más alto en caso de combinaciones de azúcares simples con los oligosacáridos (Mei et al., 2022; Parhi et al., 2022). El extracto de GOS que se utilizó en este trabajo contiene azúcares simples y la combinación de resulta en un extracto con efecto positivos según los ensayos realizados *in vitro* por lo que coincide en que los efectos beneficiosos de los oligosacáridos suelen potenciarse con la presencia de varios oligosacáridos, disacáridos y azúcares simples.

La determinación de AGCC coincide con el rol previamente observado de *B. longum* como productor de ácido acético. (Kajiwara et al., 2002; Harris et al., 2019; Moon et al., 2015). Kajiwara et al. (2002) detectaron alta producción de ácido acético con GOS utilizando *B. longum* ATCC 25707. A diferencia de lo reportado por estos autores, en nuestros ensayos observamos una mayor producción de ácido acético con inulina como sustrato con respecto a los extractos. Aún así, la cepa es capaz de producir niveles comparables de ácido acético a los obtenidos en el medio suplementado con glucosa de manera que el extracto de garbanzo promueve el crecimiento y la producción de un metabolito clave en relación al efecto beneficioso sobre el intestino y la microbiota. Para esta cepa, la concentración de acético fue mayor con el extracto de garbanzo tipo desi. En el caso de *L. reuteri* la mayor concentración se obtuvo con el extracto de kabuli, y apenas inferior al obtenido con inulina, mientras que el extracto del garbanzo tipo desi alcanzó niveles similares a los obtenidos en el medio con glucosa.

Considerando los resultados de este trabajo, el extracto de garbanzo es capaz de promover el crecimiento de las cepas probióticas evaluadas, en los métodos *in vitro* realizados, la producción de ácido acético podría favorecer, como ya se ha comprobado en otros estudios, el cross-feeding con bacterias productoras de butirato, como *Faecalibacterium prausnitzii* o del género *Bacteroides*. Esto permitiría modular el crecimiento de bacterias benéficas que además de ejercer el efecto probiótico conocido para cada cepa específica, indirectamente contribuyan a reforzar la barrera intestinal, disminuir la permeabilidad y producir ácidos grasos de cadena corta.

Estos resultados son un paso inicial en el estudio de este tipo de interacciones entre un extracto con capacidad prebiótica y cepas probióticas. Hay que tener en cuenta que en el sistema complejo del colon de un mamífero, un alimento puede clasificar como prebiótico aún de otras maneras no observables en este tipo de ensayos. Otros investigadores han observado, como extractos de alimentos utilizados en ensayos con

un tipo de bacteria, no resultan en el crecimiento significativo de esta, sin embargo al realizar pruebas con materia fecal o ensayos in vivo, este alimento genera un efecto prebiótico en la misma cepa probiótica. (Li et al., 2019). Por ello, la complementación con ensayos de fermentaciones fecales pueden ser útiles en función de la búsqueda de una modulación particular de la microbiota como por ejemplo el efecto bifidogénico, el incremento de la concentración de butirato o la mayor abundancia de otros géneros de interés.

Resulta interesante entonces evaluar fermentaciones en presencia conjunta de microorganismos del colon, tanto de organismos probióticos como no probióticos, que permitan procesos como el cross-feeding y la competencia entre distintas especies bacterianas (Huebner et al. 2007, Van Den Broek & Voragen, 2008). Con los resultados obtenidos, creemos conveniente avanzar además con ensayos sobre el efecto prebiótico de los garbanzos tipo desi en un entorno más cercano a un microbioma real.

Conclusión

Los prebióticos como inulina, pectinas o FOS pueden tener efectos beneficiosos a la salud como reducción de incidencia o duración de la diarrea, reducción de inflamación y otros síntomas asociados al síndrome de colon irritable o proteger contra el cáncer de colon, así como también efectos sobre la saciedad en casos de obesidad (Al-Sheraji et al., 2013; Pandey et al., 2015; Salvucci, 2019b). Estos prebióticos pueden estudiarse en combinación con ciertos géneros o especies de bacterias de la microbiota para identificar interacciones positivas y beneficiosas que puedan luego constituir un alimento funcional con efecto a nivel de colon. Por ello es necesario identificar prebióticos de distintas fuentes de alimentos, caracterizarlos, extraerlos y establecer métodos comparativos *in vitro* para establecer las asociaciones que puedan luego evaluarse mediante métodos *in vivo* en humanos, para así establecer todos los criterios que permitan definirlo como sinbióticos.

En este trabajo se obtuvo un extracto rico en GOS provenientes de la línea de garbanzo que han demostrado tener la capacidad de promover el crecimiento de bacterias probióticas de *B. longum* ATCC 15707 y *L. reuteri* ATCC 232272 que han demostrado diversos efectos beneficiosos como actividad antimicrobiana, efecto inmunomodulador y mejora de la salud en enfermedades como enterocolitis necrotizante o síndrome de colon irritable, todas asociadas a una disbiosis de la microbiota intestinal.

La aplicación de una metodología *in vitro* pudo establecer que estos extractos promueven el crecimiento con valores de puntuación prebiótica e índice prebiótico comparables a otros extractos de fibra evaluados en trabajos previos con GOS de otro origen. Además, es la primera vez que un extracto de esta característica proveniente de garbanzo se evalúa con estas cepas y es el trabajo inicial para postular estas combinaciones como base para un alimento sinbiótico y para su utilización en modelos más complejos o modelos *in vivo* para estudiar la modulación de la microbiota de una manera específica.

Este trabajo hace también un aporte en el conocimiento de las propiedades de un tipo de garbanzo obtenido en la UNC que ha demostrado tener aplicaciones de

interés en la tecnología de alimentos (Losano Richard, 2021), contribuyendo a su caracterización y puesta en valor de un desarrollo local.

Referencias bibliográficas

- ABDELHAMID, A. G., S. S. EL-MASRY, & N. K EL-DOUGDOUG. 2019. Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains possess safety characteristics, antiviral activities and host adherence factors revealed by genome mining. *EPMA Journal*, 10(4): 337–350.
- AL-HADIDI A., J. NAVARRO, S. D. GOODMAN, M. T. BAILEY, G. E. BESNER. 2021. *Lactobacillus reuteri* in Its Biofilm State Improves Protection from Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Nutrients*; 13(3):918.
- AL-SHERAJI, A., A. MOHD, Y. MANAP, Y. MUSTAFA, R. YUSOF & F. HASSAN .2013. Prebiotics as functional foods: A review. *J Funct Foods*. 5: 1542-1553
- AMBROGI V., F. BOTTACINI, L. CAO, B. KUIPERS, M. SCHOTERMAN & D. VAN SINDEREN. 2023. Galacto-oligosaccharides as infant prebiotics: production, application, bioactive activities and future perspectives, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63:6: 753-766..
- AYAD A.A., D.A. GAD EL-RAB, S.A. IBRAHIM & L.L. WILLIAMS. 2020. Nitrogen Sources Effect on *Lactobacillus reuteri* Growth and Performance Cultivated in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) By-Products. *Fermentation*. 6(3):64.
- BAKHTIAR, S. M. ,J. G. LEBLANC, E. SALVUCCI, A. ALI, R. MARTIN, P. LANGELLA, J. M. CHATEL, A. MIYOSHI, L. G. BERMUDEZ-HUMARAN & V. AZEVEDO. 2013. Implications of the human microbiome in inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Lett*. 342:10–17.
- CAO, P., L. WU, Z. WU, D. PAN, X. ZENG, Y. GUO & L. LIAN. 2019. Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science* 102(4): 2863-2872.
- CELIBERTO, L.S., BEDANI R. N. N. DEJANI, A. IVO DE MEDEIROS, J. A. SAMPAIO ZUANON, L. C. SPOLIDORIO, M. A. TALLARICO ADORNO, M. B. AMANCIO VARESCHE, R. CARRILHO GALVÃO, S. R. VALENTINI, G. FONT DE VALDEZ, E. A. ROSSI & D. C. UMBELINO CABALLINI. 2017. Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium*

- CRL183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. *PLoS ONE*12(4): e0175935.
- CHEN, P.-W., T. T. JHENG, C.-L. SHYU & F. C. MAO. 2013. Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *Journal of Dairy Science*, 96(3): 1438–1446.
- CHEN J, .X CHEN & C. L. HO. 2021. Recent Development of Probiotic *Bifidobacteria* for Treating Human Diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:770248.
- DE PRETER, V., A. H. GHEBRETINSAE, J. C. ABRAHANTES, K. WINDEY, P. RUTGEERTS & K. VERBEKE. 2011. Impact of the synbiotic combination of *Lactobacillus casei* shirota and oligofructose-enriched inulin on the fecal volatile metabolite profile in healthy subjects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(5): 714–722.
- DI RIENZO, J. A., R. E. MACCHIAVELLI & F. CASSANOVES. 2017. Linear mixed models: applications in Infostat, Córdoba.
- .ECKBURG, P. B., E. M. BIK, C. N. BERNSTEIN, E. PURDOM, L. DETHLEFSEN, M. SARGENT, S. R. GILL, K. E. NELSON & D. A. RELMAN. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), 1635-1638.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). 2020. Online statistical databases. Food and agriculture data. FAOSTAT. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QI>
- FALONY, G., A. VERSCHAEREN, F. DE BRUYCKER, V. DE PRETER, K. VERBEKE, F. LEROY, & L. DE VUYST .2009. In vitro kinetics of prebiotic inulin-type fructan fermentation by butyrate-producing colon bacteria: Implementation of online gas chromatography for quantitative analysis of carbon dioxide and hydrogen gas production. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18): 5884–5892.
- FANNING, S., L. J. HALL & D. VAN SINDEREN. 2012. *Bifidobacterium breve* UCC2003 surface exopolysaccharide production is a beneficial trait mediating commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Gut Microbes*, 3(5): 420–425.

- FAROOQ, M., A. ULLAH, D.-J. LEE, S. S. ALGHAMDI & K. H. M. SIDDIQUE. 2018. Desi chickpea genotypes tolerate drought stress better than kabuli types by modulating germination metabolism, trehalose accumulation, and carbon assimilation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 126: 47–54.
- FERNANDO W. M. U., J. E. HILL, G. A. ZELLO, R. T. TYLER, W. J. DAHL, A. G. VAN KESSEL. 2010. Diets supplemented with chickpea or its main oligosaccharide component raffinose modify faecal microbial composition in healthy adults. *Benef Microbes*. Jun;1(2):197-207
- FIORINI, D., M. C. BOARELLI, R. GABBIANELLI, R. BALLINI & D. PACETTI. 2016. A quantitative headspace–solid-phase microextraction–gas chromatography–flame ionization detector method to analyze short chain free fatty acids in rat feces. *Analytical Biochemistry*, 508, 12-14.
- GACI, N., G. BORREL, W. TOTTEY, P. W. O'TOOLE & J.-F. BRUGÈRE .2014. Archaea and the human gut: New beginning of an old story. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), 16062.
- GANGOLA, M. P., S. JAISWAL, U. KANNAN, P. M. GAUR, M. BÅGA, & R. N. CHIBBAR. 2016. Galactinol synthase enzyme activity influences raffinose family oligosaccharides (RFO) accumulation in developing chickpea (*Cicer arietinum L.*) seeds. *Phytochemistry*, 125: 88–98.
- GAUR, P. M., S. SAMINENI, S. SAJJA & R. N. CHIBBAR .2015. Achievements and challenges in improving nutritional quality of chickpea. . *Legume perspectives* 09: 31-33.
- HARRIS, S., A. MONTEAGUDO-MERA, O. KOSIK, D. CHARALAMPOPOULOS, P. SHEWRY & A. LOVEGROVE. 2019. Comparative prebiotic activity of mixtures of cereal grain polysaccharides. *AMB Expr* 9: 203.
- HERNÁNDEZ-GRANADOS M. J., & E. FRANCO-ROBLES 2020. Postbiotics in human health: Possible new functional ingredients? *Food Research International*, 137: 109660.
- HILL C, F. GUARNER, G. REID, G. R. GIBSON, D. J. MERENSTEIN, B. POT, L. MORELLI, R. B. CANANI, H. J. FLINT, S. SALMINEN, P. C. CALDER & M. E. SANDERS. 2014. The international scientific association for probiotics and

- prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 11:506–514.
- HUEBNER, J., R. L. WEHLING, & R. W. HUTKINS. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7), 770–775.
- KAJIWARA, S., H. GANDHI, & Z. USTUNOL. 2002. Effect of Honey on the Growth of and Acid Production by Human Intestinal *Bifidobacterium* spp.: An In Vitro Comparison with Commercial Oligosaccharides and Inulin. *Journal of Food Protection*, 65(1): 214–218.
- KARIMI, M., S. S. SEKHAVATIZADEH & S. HOSSEINZADEH. 2021. Milk dessert containing *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272) encapsulated with sodium alginate, *Ferula assa-foetida* and Zedo (*Amygdalus scoparia*) gum as three layers of wall materials. *Food and Bioprocess Processing*, 127, 244–254.
- KHATOON N & PAKASH J. 2009. Nutritional quality of microwave-cooked and pressure-cooked legumes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 55(6):441-448.
- KAYS, S. J. & S. F. NOTTINGHAM. 2007. Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: *Helianthus tuberosus* L (1st ed.). CRC Press.
- KIM, T.-B., S.-H.SONG, S.-C. KANG, & D.-K. OH. 2003. Quantitative Comparison of Lactose and Glucose Utilization in *Bifidobacterium longum* Cultures. *Biotechnology Progress*, 19(2): 672–675.
- LAMSAL, B. P. 2012. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10): 2020–2028.
- LANCETTI, R., L. SCIARINI, L., G. T. PÉREZ & E. SALVUCCI. 2021. Technological Performance and Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Argentinian Grains as Starters for Wheat Sourdough. *Current Microbiology* 78: 255–264
- LAUKENS D., B. M. BRINKMAN, J. RAES, M. DE VOS, P. VANDENABEELE. 2016. Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design, *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1): Pages 117–132.

- LI, Y., S. WANG, Y. SUN, H. ZHENG, Y. TANG, X. GAO, C. SONG, J. LIU, Y. LONG, L. LIU. Q. MEI. 2019. Apple polysaccharide could promote the growth of *Bifidobacterium longum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152: 1186-1193
- LOSANO RICHARD, P., M. E. STEFFOLANI, M. J. ALLENDE, J. CARRERAS & A. E. LEÓN .2020. By-products of the classification of chickpea as an alternative in the production of hummus. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(4), 1759–1765.
- MACKOS, A. R., J. D. GALLEY, T. D. EUBANK, R. S. EASTERLING, N. M. PARRY, J. G. FOX, M. LYTE & M. T. BAILEY. 2016. Social stress-enhanced severity of *Citrobacter rodentium*-induced colitis is CCL2-dependent and attenuated by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Mucosal Immunol.* 9: 515–526.
- MAKKI, K., E. C. DEEHAN, J. WALTER & F. BÄCKHED. 2018. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe*, 23: 705–715.
- MARTYNIAK A, A. MEDYŃSKA-PRZĘCZEK, A. WĘDRYCHOWICZ, S. SKOCZEŃ & P. J. TOMASIK. 2021. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. *Biomolecules*, 11(12):1903.
- MARZORATI M, J. GHYSELINCK, P. VAN DEN ABBEELE, A. MARUSZAK & L. HARTHOORN. 2023. Galactooligosaccharide (GOS) Reduces Branched Short-Chain Fatty Acids, Ammonium, and pH in a Short-Term Colonic Fermentation Model. *Applied Microbiology*, 3(1):90-103.
- MEDINA M., E. IZQUIERDO, S. ENNAHAR & Y. SANZ. 2007. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications, *Clinical and Experimental Immunology*, Volume 150, Issue 3: Pages 531–538,
- MEI, G.-Y., C. M. CAREY, S. TOSH & M. KOSTRZYNSKA. 2011. Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(10): 857–865.

- MEYER, D. & M. STASSE-WOLTHUIS. 2009. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr.* 63: 1277–1289.
- MOON, J. S., L. LI, J. BANG, & N. S. HAN. 2016. Application of in vitro gut fermentation models to food components: A review. *Food Science and Biotechnology*, 25(S1): 1–7.
- MOON, J. S., S. Y. SHIN, H. S. CHOI, W. JOO, S. K. CHO, L. LI, J.-H. KANG, T.-J. KIM & N. S. HAN. 2015. In vitro digestion and fermentation properties of linear sugar-beet arabinan and its oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 131: 50–56.
- NISSEN, L., F. CASCIANO, E. BABINI & A. GIANOTTI. 2021. Prebiotic potential and bioactive volatiles of hemp byproduct fermented by lactobacilli. *LWT*, 151: 112201.
- TURNER, N. C., R. T. FURBANK, J. D. BERGER, P. GREMIGNI, S. ABBO, & L. LEPORT. 2009. Seed Size Is Associated with Sucrose Synthase Activity in Developing Cotyledons of Chickpea. *Crop Science*, 49(2): 621-627.
- OLANO-MARTIN, E., G. R. GIBSON, R. A. RASTALL. 2002. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3): 505–511.
- PANDEY, K. R., S. R. NAIK & B. V. VAKIL. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol* 52, 7577–7587.
- PASQUALONE A, C. SUMMO, D. DE ANGELIS, G. CUCCI, D. CARANFA, G. LACOLLA. 2021. Effect of Mineral and Organic Fertilization on *desi* and *kabuli* Chickpea (*Cicer arietinum* L.): Plant Growth and Production, Hydration Properties, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity. *Plants*, 10(7):1441.
- PALFRAMAN, R., G. R. GIBSON, & R. A. RASTALL. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4), 281-284.

- PARHI, P., K. P. SONG & W. S. CHOO. 2022. Growth and survival of *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum* in various sugar systems with fructooligosaccharide supplementation. *J Food Sci Technol* 59: 3775–3786.
- PARVANEH, K., M. EBRAHIMI, M. R. SABRAN, G. KARIMI, A. N. M. HWEI, S. ABDUL-MAJEED, A. ZURAINI, I. ZURIATI & R. JAMALUDDIN. 2015. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) Increase Bone Mass Density and Upregulate *Sparc* and *Bmp-2* Genes in Rats with Bone Loss Resulting from Ovariectomy. *BioMed Research International* 2015: 1–10.
- POKUSAEVA, K., G. F. FITZGERALD & D. VAN SINDEREN. 2011. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr* 6, 285–306.
- REDDEN, R. J & J. D. BERGER. 2007. History and origin of chickpea. En: YADAV, S. S., R. J. REDDEN, W. CHEN & B. CHARMA. *chickpea breeding and management*. 1-14.
- RIVIÈRE, A., M. SELAK, D. LANTIN, F. LEROY & L. DE VUYST. 2016. *Bifidobacteria* and Butyrate Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol.* 7, 979.
- RUBEL, I. A., E. E. PÉREZ, D. B. GENOVESE & G. D. MANRIQUE. 2014. In vitro prebiotic activity of inulin-rich carbohydrates extracted from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers at different storage times by *Lactobacillus paracasei*. *Food Research International*, 62, 59–65.
- RUPÉREZ, P. 1998. Oligosaccharides in raw and processed legumes. *Z Lebensm Unters Forsch* 206: 130–133.
- RYCROFT, C. E., M. R. JONES, G. R. GIBSON & R. A. RASTALL .2001. Fermentation properties of gentio-oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 32(3): 156–161.
- SALVUCCI, E. 2016. Microbiome, holobiont and the net of life. *Crit Rev Microbiol.* 42: 485–494.
- SALVUCCI, E. 2019a. The human-microbiome superorganism and its modulation to restore health. *Int J Food Sci Nutr.* 1–15.

- SALVUCCI, E. 2019b. The Disappearing Microbiota: Diseases of the Western Civilization. En: M.A., ARNOLD, R.R. AND J. M. BRUNO-BÁRCENA. How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota: A Nutrition Continuum ed. Azcarate-Peril, pp.325–347. Cham: *Springer International Publishing*.
- SÁNCHEZ-MATA, M. C., M. J. PEÑUELA-TERUEL, M. CÁMARA-HURTADO, C. DÍEZ-MARQUÉS, & M. E. TORIJA-ISASA. 1998. Determination of Mono-, Di-, and Oligosaccharides in Legumes by High-Performance Liquid Chromatography Using an Amino-Bonded Silica Column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9): 3648–3652.
- SCARPELLINI, E., G. IANIRO, F. ATTILI, C. BASSANELLI, A. DE SANTIS & A. GASBARRINI. 2015. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Digestive and Liver Disease*, 47(12), 1007-1012.
- SCHNORR, S., M. CANDELA, S. RAMPELLI, M. CENTANNI, C. CONSOLANDI, G. BASAGLIA, S. TURRONI, E. BIAGI, C. PEANO, M. SEVERGNINI, J. FIORI, R. GOTTI, G. DE BELLIS, D. LUISELLI, P. BRIGIDI, A. MABULLA, F. MARLOWE, A. G. HENRY, A. N. CRITTENDEN. 2014. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 5, 3654.
- SENDER R, S. FUCHS & R. MILO. 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* 14:e1002533.
- SIMS, I. M., J. L. J. RYAN, & S. H. KIM. 2014. In vitro fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. *Anaerobe*, 25: 11–17.
- SWANSON, K. S., W. M. DE VOS, E. C. MARTENS, J. A. GILBERT, R. S. MENON, A. SOTO-VACA, J. HAUTVAST, P. D. MEYER, K. BOREWICZ, E. E. VAUGHAN & J. L. SLAVIN. 2020. Effect of fructans, prebiotics and fibres on the human gut microbiome assessed by 16S rRNA
- TORRES, D. P. M., M. DO P. F. GONÇALVES, J. A. TEIXEIRA, & L. R. RODRIGUES. 2010. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5): 438–454.

- TSATSARAGKOU, K, L. METHVEN, A. CHATZIFRAGKOU, J. RODRIGUEZ-GARCIA. 2021. The Functionality of Inulin as a Sugar Replacer in Cakes and Biscuits; Highlighting the Influence of Differences in Degree of Polymerisation on the Properties of Cake Batter and Product. *Foods* 10: 951.
- TURRONI, F., C. PEANO, D. A. PASS, E. FORONI, M. SEVERGNINI, M. J. CLAESSION & F. FULIGNI. 2012. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS ONE*, 7(5): Article e36957.
- VAN DEN BROEK, L. A. M., & A. G. J. VORAGEN. 2008. *Bifidobacterium* glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4): 401–407.
- VAN DER MEULEN, T. A, H. J. M. HARMSSEN, H. BOOTSMA, F. K. L. SPIJKERVET, F. G. M. KROESE & A. VISSINK. 2016. The microbiome–systemic diseases connection *Oral Diseases*. 22, 719–734
- VALLIANOU, N., T. STRATIGOU, G. S. CHRISTODOULATOS, C. TSIGALOU, & M. DALAMAGA. 2020. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Postbiotics, and Obesity: Current Evidence, Controversies, and Perspectives. *Current Obesity Reports. Metabolism*, 9: 179-192.
- WANG, R., M. P. GANGOLA, S. JAISWAL, M. BÅGA, P. M. GAUR & R. N. CHIBBAR. 2017. Variation in Seed-Quality Traits of Chickpea and Their Correlation to Raffinose Family Oligosaccharides Concentrations. *Crop Science*, 57(3): 1594-1602.
- WILLIAMSON, L. L., E. A. MCKENNEY, Z. E. HOLZKNECHT, C. BELLIVEAU, J. F. RAWLS, S. POULTON, W. PARKER & S. D. BILBO. 2016. Got worms? Perinatal exposure to helminths prevents persistent immune sensitization and cognitive dysfunction induced by early-life infection. *Brain, Behavior, and Immunity*, 51: 14-28.
- XIAOLI, X., Y. LIYI, H. SHUANG, L. WEI, S. YI, M. HAO, Z. JUSONG & Z. XIAOXIONG. 2008. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 111(1): 215–219.

- YUN B, M. SONG, D. J. PARK & S. OH. 2017. Beneficial Effect of *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 on Survival Rate of *Clostridium difficile* Infection in Mice. *Korean J Food Sci Anim Resour.* 2017;37(3):368-375.
- ZHANG, Y., D. SU, J. HE, Z. DAI, R. ASAD, S. OU & X. ZENG. 2017. Effects of ciceritol from chickpeas on human colonic microflora and the production of short chain fatty acids by in vitro fermentation. *LWT . Food Science and Technology*, 79: 294–299.
- ZHANG, C., Y. ZHIMING, Z. JIANXIN, Z. HAO, Z. QIXIAO & C. WEI. 2019. Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum*. *J. Funct. Foods* 53: 157–165.
- ZHENG, J., S. WITTOUCK, E. SALVETTI, C. M. A. B. FRANZ, H. M. B. HARRIS, P. MATTARELLI, P. W. O'TOOLE, B. POT, P. VANDAMME, J. WALTER, K. WATANABE, S. WUYTS, G. E. FELIS, M. G. GÄNZLE & S. LEBEER. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Microbiology society.* 70(4): 2782-2858.