

Obtención de prebióticos a partir de subproductos vegetales para uso como ingrediente en alimentos funcionales

Obtaining prebiotics on the basis of vegetable by products for use as an ingredient in functional foods

^aArtica Mallqui, L.; ^aRosales Papa, H.;

^bBaquerizo Canchumanya, M.

Facultad de Ingeniería en Industrias alimentarias / Universidad Nacional del Centro del Perú

Email: lartica@uncp.edu.pe

Resumen

En los últimos años, se ha incrementado la importancia de los prebióticos por estar relacionados a la salud humana, en diversas investigaciones se ha encontrado la presencia de prebióticos en muchos vegetales; por otro lado, también se sabe que hay muchos subproductos vegetales que aún no son aprovechados eficientemente, siendo considerados residuos. Estudios recientes, se investigaron sobre la obtención de prebióticos a partir de subproductos y residuos, como cáscaras y semillas de diversas frutas, planteando diferentes metodologías, empleando solventes, reactivos, tratamientos térmicos y enzimáticos, estos reportaron la presencia de prebióticos. En ese sentido, el objetivo del presente trabajo es obtener prebióticos a partir de subproductos vegetales de la calabaza (*cucurbita Fici-folia*) para uso como ingrediente en alimentos funcionales.

Se recolectaron los subproductos semilla y cascara de calabaza, se sometió a un deshidratado (50 °C x 48 horas), luego se procedió a una molienda para la obtención de harina a un tamaño de partícula de 70° mesh, en las muestras obtenidas se determinó su composición química y se procedió a la obtención de prebióticos mediante dos métodos: Hidrotérmicos (121 °C x 10 min) en un autoclave vertical y enzimático (α -amilasa a 37 °C) en un biorreactor, se determinó el contenido de fibra dietética total, sacarosa, azúcares reductores y fructosa. Se encontró diferencia significativa ($P < 0,05$) entre tratamientos, presentando mejores promedios el método enzimático. La calabaza presentó mejor potencial prebiótico y la semilla presenta un alto contenido de proteína y aceite.

Palabras clave: subproductos vegetales, prebióticos, cucurbita ficifolia, alimentos funcionales, fibra dietética

Abstract

In recent years the importance of prebiotics has been increased because they are related to human health, in several investigations the presence of prebiotics in many vegetables has been found, on the other hand it is also known that there are many plant by-products that are not yet used efficiently, being considered waste. Recent studies investigated the obtaining of prebiotics from by-products and residues such as husks and seeds of various fruits raising various methodologies using solvents, reagents, thermal and enzymatic processes that reported the presence of prebiotics. In that sense, the objective of this work is to obtain prebiotics from vegetable by-products of pumpkin (*Ficifolia cucurbita*) for use as an ingredient in functional foods.

Seeds and pumpkin peel by-products were collected and subjected to dehydration (50 °C x 48 hours), then grinding was carried out to obtain flour at a particle size of 70 ° mesh, the chemical composition of the samples obtained was determined and prebiotics were obtained by two methods: Hydrothermal (121 °C x 10 min) in a vertical autoclave and Enzyme (α -amylase at 37 °C) in a bioreactor, the total dietary fiber content was determined, sucrose, reducing sugars and fructose. A significant difference ($P < 0.05$) was found between treatments, presenting better average of the enzymatic method. The pumpkin presented better prebiotic potential and the seed has a high protein and oil content.

Keywords: plant by-products, prebiotics, cucurbita ficifolia, functional foods, dietary fiber

Introducción

En los últimos años se ha incrementado la preocupación de la presencia de prebióticos en la alimentación, debido a que está relacionado con la salud humana. Taiseer et al. (2014) indican que los prebióticos son polisacáridos y oligosacáridos que pueden resistirse a la digestión y absorción en el intestino; pero, pueden ser selectivamente fermentados por bacterias probióticas nativas en el intestino grueso.

En diversas investigaciones se reportaron la presencia de prebióticos en los productos vegetales. Una parte del sector agroindustrial, específicamente el procesamiento de vegetales, genera diversos subproductos que son considerados desperdicios y que son eliminados, contribuyendo a la contaminación; sin embargo, estos aún pueden ofrecer diversos componentes bioactivos que pueden ser beneficiosos para la salud. Los subproductos vegetales son fuentes importantes de ingredientes alimentarios funcionales con interés comercial, y que a la vez disminuya el volumen de subproductos, mejorando la viabilidad económica de los procesos tecnológicos, al producir ingredientes funcionales, así como la obtención de fibra dietética a partir de dichos subproductos vegetales.

En ese sentido, Hermida (1993) menciona que la industria agroalimentaria genera anualmente una gran cantidad de subproductos, que frecuentemente no se aprovechan. También, la FAO (2014) reporta que la gran mayoría de leguminosas (guisantes, garbanzos, judías y habas) son consumidas sin cáscara después de ser procesadas, por que sus cáscaras producen problemas. Igualmente, Alonso y Col (2000) indican que las arvejas son las más consumidas y que se eliminan sus vainas, en donde se encuentran sustancias importantes que se pueden aprovechar para obtener sustancias prebióticas, sería una forma de reutilizar dichos desperdicios.

Así mismo, Nabais y Col (2008) mencionan que el sector de la agroindustria jugaría un papel importante en la economía, debido a que está relacionado con los ingresos económicos y a la creación de empleos. Por ello, toda acción a este sector, mejoraría la competitividad de las industrias con lo que habría un beneficio de la sociedad, puesto que, estos desperdicios, estadísticamente representan la tercera parte de los alimentos que se producen, claro que estas varían en función a la cadena alimenticia que pertenece. En el caso de frutas y hortalizas, llegan a ser el 50 %. Es importante tener en cuenta el valor económico, nutricional y presencia de bioactivos no nutritivos que representarían estos residuos, considerando lógicamente su inocuidad para preservar la salud de los consumidores (FAO, 2011).

Se realizaron investigaciones, como el de Mejías, Orozco y Galán (2017) quienes estudiaron sobre el aprovechamiento de los residuos de la agroindustria, para poder contribuir al desarrollo sostenible de México, donde

el objetivo fue evaluar la situación del aprovechamiento biotecnológico y energético de los residuos agroindustriales, a través del impacto ambiental que generan los mismos, dada las malas prácticas en el sector agrícola y los aspectos relevantes que poseen, intentando con ello, una perspectiva que contribuya al desarrollo sostenible del país. Flórez y Rojas (2018) realizaron investigaciones en los principales residuos provenientes de la agroindustria; de tal manera, caracterizarlos estructuralmente y proponerlos para un aprovechamiento potencial.

Para el logro de los objetivos, se realizó en primer lugar la caracterización, determinando los componentes estructurales como la celulosa, el contenido de lignina y la presencia de hemicelulosa; así mismo, identificaron los no estructurales, como extractivos y cenizas de cada residuo agroindustrial encontrado. Teniendo en cuenta estos resultados, se identifican las aplicaciones potenciales de los residuos estudiados según sus porcentajes de celulosa, hemicelulosa, lignina y extractivos. Finalmente, cuantificaron cada uno de los componentes y, de acuerdo a los resultados, propusieron posibles aplicaciones potenciales. Los resultados mostraron que los que contienen alto contenido de celulosa, se recomiendan para la industria de papel, industria textilera y la industria alimentaria, como azúcares fermentables; también, para la elaboración de biomateriales y en la obtención de éter y ésteres de celulosa. Entre estos residuos se encuentran las cáscaras de maracuyá, guanábana, plátano y mango, también demostraron que las semillas de mandarina y naranja, el vástago de tomate de árbol, cáscaras de mango, guanábana, maracuyá y plátano, tienen un aprovechamiento potencial en la fermentación y otros.

Por otro lado, se ha incrementado la preocupación de obtener prebióticos e incluirlos en la alimentación; así, Bhonsmithikun et al. (2010) seleccionaron las condiciones de extracción de prebióticos de semillas de jekfruit. Las condiciones fueron: de temperatura (40 °C y 60 °C), tiempo de extracción (15 a 45 min) y ratios de líquido a sólido (6:1 y 10:1), a escala de laboratorio y extracción continua, las condiciones óptimas de la extracción de los prebióticos, se basó sobre el rendimiento y la cantidad de azúcares no reductores, del cual se esperó que tengan características prebióticas.

Las condiciones óptimas de extracción fueron: Tiempo de extracción de 15 minutos a 60 °C, usando 50 % de etanol como solvente L/S ratio 10:1, el cual dio máximo contenido de azúcares no reductores; es decir. 491 mg/g de extracto. También, Wichienchot et al. (2011) indican que la extractabilidad de los prebióticos está influenciada por varios factores, tales como tipo de solvente, tamaño de partícula de los materiales de extracción, ratio de solvente a muestra, velocidad de agitación, velocidad y tiempo de extracción. En otras investigaciones, se han informado que la calabaza posee alto contenido en

fibra y que ello presenta actividad prebiótica, además, que puede ser utilizada para tratar la diabetes (Bayat et al., 2016), también debido a su contenido de mucílagos, favorece la digestión y mejora el sistema inmunológico (García, 2019), esta característica lo convierte en un alimento funcional. Slavin (2013) menciona que la fibra dietética está muy relacionada con los beneficios para la salud; durante mucho tiempo, ha sido muy considerada, entre estos tenemos la inulina, los fructooligosacáridos y otros oligosacáridos, que son los prebióticos y que se emplean en las etiquetas nutricionales.

Entre estos, los más conocidos son los fructooligosacáridos o prebióticos como un ingrediente selectivamente fermentado que ofrece cambio, tanto en la composición como en su actividad de la microflora, este “ingrediente selectivamente fermentado que permite cambios específicos, tanto en la composición como en la actividad de la microflora gastrointestinal que confiere beneficios al bienestar y la salud del huésped” Roberfrid, 2007. Actualmente, todos los prebióticos conocidos son generalmente compuestos de carbohidratos, en especial oligosacáridos, debido a que estos no se digieren en el intestino delgado humano y pasan al colon donde la microflora los fermentan.

En ese sentido, en el presente trabajo se planteó contribuir al sector agroalimentario con la creación y elaboración de productos, como el aprovechamiento de subproductos vegetales a partir de calabaza, con la finalidad de obtener, mediante tratamientos hidrotérmicos y enzimáticos, fibra prebiótica que se utilizaría como ingrediente en alimentos funcionales. Por lo que, toda la información de los resultados de la investigación obtenida y recopilada sería de mucha utilidad para desarrollar transferencia tecnológica en el sector de alimentos funcionales saludables.

Métodos y materiales

Preparación de los subproductos de la calabaza

La calabaza se lavó, desinfectó y pelaron, separando los subproductos, como la cáscara, semilla y pulpa. La cáscara y semilla se sometieron a dos tratamientos; una parte de la semilla y cáscara directamente se deshidratan a 60 °C y, el otro, consistió en calentamiento hidrotérmico en un autoclave, a una temperatura de 121 °C por 10 minutos. Luego de deshidratado y molienda, de ambas muestras en un molino de laboratorio, cribado con tamiz N° 70 mesh, donde se obtuvieron harina de cáscara y semilla de calabaza; a partir de la harina, se prepararon muestras en una relación de 30g/100ml de agua para la hidrólisis enzimática con α -amilasa incubadas a 37 °C, para evaluar los sustratos obtenidos por la hidrólisis enzimática y el tratamiento hidrotérmico de la fracción lignoselulósica de la semilla y cáscara de calabaza y su viabilidad para el crecimiento de bacterias probióticas.

Análisis químico

El contenido de agua, se determinó en tres muestras de cada fracción por secado a 70 °C, bajo vacío, hasta que sea constante peso.

La grasa total, se analizó por el método Soxhlet en unidad de extracción de grasa Soxhlet, usando hexano (AOAC, 1990).

La proteína total, se determinó a través de método Kjeldahl (Método 920.152, AOAC, 1990).

Las cenizas totales, se determinaron por incineración a 550 °C, según el método 923.03 de AOAC (1990).

El extracto libre de nitrógeno, se calculó por diferencia entre 100 y la suma total del porcentaje de humedad, proteínas, grasas, fibras y cenizas,

La fibra dietética total, se analizó de acuerdo con el método enzimático-gravimétrico, método 985.29 de la AOAC (1990).

El contenido de sacarosa, se determinó, según la metodología de Buysse y Merckx (1993), por espectrofotometría, a una longitud de onda de 620 nm. La concentración de sacarosa, fue obtenida mediante el uso de una curva de calibración.

Los azúcares reductores, fructos y glucosa, se determinaron por el método de Miller (1959).

Evaluación de la actividad prebiótica

Se preparó un cultivo para cepas probióticas (VIVO-LAC 424) en caldo MRS y para la cepa *E. coli*, en TSA a 37 °C por 24 horas. En cada caldo, se adicionó el 1 % (v/v) del cultivo de 24 horas de cada cepa adicionada; además, 1 % (p/v) de inulina como control positivo. La incubación, fue a 37 °C en medio microaerofilia para el probiótico VIVOLAC 424 y un medio aeróbica para *E. coli*. Se determinó la cantidad inicial de microorganismos y el conteo a las 24 horas, utilizando el método de la gota (Milles-Misra), en los medios de cultivo respectivos Agar MRS y Agar TSA.

La actividad prebiótica, se calculó utilizando la relación matemática propuesta por Huebner y et al. (2008).

Análisis estadístico

Las evaluaciones estadísticas, se efectuaron empleando el software estadístico SAS v 8.0. Se utilizó ANOVA con tres repeticiones para evaluar la diferencia entre los resultados, donde un valor de P menor que 0.05 indica que existe diferencia significativa entre los prebióticos de subproductos de la calabaza y de control.

Resultados

En Tabla 1, se presentan los valores encontrados de composición química de los subproductos semilla y cáscara de la calabaza, que se sometieron a un proceso de

secado previamente a ser sometidas a los tratamientos hidrotérmico y enzimático para la obtención de harinas prebióticas. Estos resultados, indicaron que la composición química varía entre la semilla y la cáscara, la semilla en comparación a la cáscara es alta en contenido de proteína y en grasa y posee en mayor contenido de minerales; sin embargo, la cáscara es alta en extracto libre de nitrógeno (ELN) y en fibra bruta.

Tabla 1

Composición química proximal de semilla y cáscara de calabaza (*cucúrbita ficifolia*) (g/100 g)

Componentes g/100g	Harina de semilla	Harina de cáscara
Humedad	5,25 ± 0,23	6,43 ± 0,09
Proteínas	38,71 ± 0,47	7,84 ± 0,32
Grasa	35,28 ± 0,49	2,27 ± 0,12
Fibra	3,11 ± 0,14	14,62 ± 1,58
Cenizas	5,57 ± 0,11	2,25 ± 0,42
ELN	12,08 ± 0,71	66,59 ± 1,30

En las tablas 2 y 3, se presentan los valores que se obtuvieron de la cuantificación de los polisacáridos con características prebióticas que se encontraron en la harina obtenida de la semilla y cáscara de calabaza, respectivamente; estas harinas, fueron sometidas al método hidrotérmico y enzimático. Los componentes fibra dietética, azúcares reductores, sacarosa y fructosa, son diferentes estadísticamente, presentando diferencia significativa ($P < 0,05$) y en la comparación de medias se observa que los componentes son mayores por el método enzimático en comparación con los del método hidrotérmico.

Tabla 2

Componentes prebióticos de harina de semilla de calabaza (*cucúrbita ficifolia*) (g/100 g), obtenidos por método hidrotérmico y enzimático

Componentes g/100g	Hidrotérmico	Enzimático
Fibra dietética total (%)	23,63 ± 0,84	27,39 ± 1,46
Azúcares reductores (%)	2,84 ± 0,07	3,74 ± 0,10
Sacarosa (mg/g)	1,24 ± 0,07	1,48 ± 0,05
Fructosa (mg/g)	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,03

Tabla 3

Componentes prebióticos de harina de cáscara de calabaza (*cucúrbita ficifolia*) (g/100 g), obtenidos por método hidrotérmico y enzimático.

Componentes g/100g	Hidrotérmico	Enzimático
Fibra dietética total (%)	35,87 ± 0,81	32,58 ± 1,17
Azúcares reductores (%)	2,04 ± 0,10	2,75 ± 0,08
Sacarosa (mg/g)	1,08 ± 0,09	1,59 ± 0,08
Fructosa (mg/g)	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,01

La Tabla 4, es un cuadro comparativo donde se presentan los resultados que se obtuvieron de la evaluación prebiótica realizada a la harina de semilla desgrasada y harina de cáscara de calabaza, obtenidas por los tratamientos hidrotérmico y enzimático. Estos resultados mostraron que el potencial prebiótico de la harina de semilla y cáscara, presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos.

Tabla 4

Potencial probiótico de la harina de semilla y cáscara de calabaza (*cucúrbita ficifolia*), obtenidos por método hidrotérmico y enzimático

	Hidrotérmico	Enzimático
Harina de semilla	1,58 ± 0,04	1,85 ± 0,03
Harina de cáscara	1,63 ± 0,03	1,78 ± 0,04

Discusión

Composición química de las harinas de semilla y cáscara de calabaza

La semilla de la calabaza (*cucúrbita ficifolia*) evaluada, presenta alto contenido de proteína y grasa, encontrándose valores similares a los reportados por Raczyc et al. (2017) estimando para la cucúrbita pepo grasa 34,35 %, pero diferente su contenido proteico de 22,13 %; estas variaciones, son debidos a la variedad y lugar de cultivo. En cuanto al contenido de carbohidratos, se encontró que la cáscara presenta mayor contenido en comparación con la semilla, por lo que la cáscara se consideraría una buen fuente para la obtención de prebióticos.

Componentes prebióticos de la harina de semilla y cáscara de calabaza sometido a tratamientos hidrotérmicos y enzimático

La fibra dietaria, presentó mayor porcentaje en la cáscara que en la semilla; sin embargo, para semilla el método enzimático resulta más eficaz que el método hidrotérmico y para la cáscara el método hidrotérmico resultó mejor que el método enzimático, ello se atribuye a la presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina que están relacionadas con la fibra insoluble (Cruz et al. 2015), las que no han sido hidrolizadas enzimáticamente, lo porcentajes obtenidos de fibra dietética en cáscara es similar a lo reportados para cáscara de mango 42 % (Cruz et al., 2015), la fibra obtenida en semilla es mayor a lo reportado en semilla de maracuyá 9,7 % según Cruz et al. (2015), esta variación es debido a la composición de cada fruto.

También se ha encontrado oligosacáridos, que reportaron sacarosa azúcares reductores y fructosa en menores concentraciones, tanto en semillas como en la cáscara de calabaza, se pudo apreciar que el método enzimático fue mejor en la extracción de estos oligo-

sacáridos, la presencia de estos nos indica que hubo hidrólisis por acción enzimática y por acción del calor, lo que podría asumirse que hay otros oligosacáridos por identificar.

Potencial prebiótico de la semilla y cáscara de calabaza

El potencial prebiótico fue mejor para el tratamiento enzimático a diferencia del método hidrotérmico, tanto en semilla como en cáscara de calabaza, esta variación es atribuible a la diferencia del método empleado. Los resultados muestran actividad prebiótica de la harina de semilla y de cáscara de calabaza con cepas lácticas, VIVOLAC 424 evaluadas (Tabla 4). Se obtuvieron una actividad prebiótica en ambas muestras, un crecimiento favorable para el probiótico en comparación con el control inulina y un crecimiento preferencial de las bacterias lácticas sobre el microorganismo *E. coli*. En base a estos elementos, se puede mencionar que las harinas de semilla y cáscara de calabaza, independientemente del tratamiento térmico y de la acción enzimática en su obtención, presentan actividad prebiótica

Conclusiones

- Los subproductos vegetales de la *cucurbitácea ficifolia*, la semilla y cáscara, al ser sometidas a tratamiento hidrotérmico y enzimático, brindan harina que contiene fibra dietaria, sacarosa, azúcares reductores y fructosa, que le confiere su potencial prebiótico, siendo más eficaz el tratamiento enzimático.
- La cáscara, posee mayor potencial prebiótico que puede ser empleado como ingrediente en alimentos funcionales, mientras que la semilla es una buena fuente de aceite y proteína; sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre la identificación de oligosacáridos en cáscara.

Referencias bibliográficas

- AOAC. (1990). *Official methods of analysis* (15th ed.). MD: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis* (17th ed.). MD: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (1990) *Métodos oficiales de análisis para grasas y carbohidrato*. Asociación de Analíticos Oficiales Químicos. 13ª Edición. Washington, DC.
- Alonso, R.; Grant, G.; Dewey, P. & Marzo, F. (2000), *Nutritional assessment in vitro and in vivo of raw and extruded peas (Pisum sativum L.)*. J. Agric. Food Chem., 48, 2286-2290.
- Bayat, E.; Kourosh Rajaei, B. & Radzuan Juninb. (2016). *Assessing the effects of nanoparticle type and concentration on the stability of CO2 foams and the performance in enhanced oil recovery*. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 511-222-231
- Bohrnsmithikun, V.; Chetpattananondh, T.; Yamsaeng-sung, R. & Prasertsit, K. (2010). Continuous extraction of prebiotics from jackfruit seeds. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 32: 635-642.
- Cruz, A.; Guamán, M.; Castillo, M.; Glorio, P. & Martínez, R. Fibra dietaria en subproductos de mango, maracuyá, guayaba y palmito. September 2015; *Revista Politécnica* 36(2):9.
- FAO (2011). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention*. Roma.
- FAO (2014). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Pérdida y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe*.
- Hermida, J.R. (1993). *Tratamiento y aprovechamiento del orujo de aceituna*. Tecnologías complementarias en la industria alimentaria, 137-148.
- Huebner, J.; Wehling, R. L.; Parkhurst, A. & Hutkins, R. W. (2008). Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 18(3), 287-293.
- Muela, B. J.; Levario, G. G.; Nevárez-Moorillón, V.; Ballinas, C. M.L. & Morales, C. D. (2015). *Evaluación del efecto prebiótico en tres muestras de miel de maguey elaboradas artesanalmente*. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Químicas. México.
- Mejías-Brizuela, N.; Orozco-Guillen, E. y Galáan-Hernández, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2-6: 27-41.
- Miller, G. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Nabais, J. M. V.; Nunes, P.; Carrott, P. J. M.; Carrott, M. R.; García, A. M. y Díez, M. A. D. (2008). *Production of activated carbons from coffee endocarp by CO2 and steam activation*. Fuel Processing Technology, 89, 262-268.
- Raczyk, M.; Siger, A.; Radziejewska-Kubzdela, E.; Ratusz, K. & Rudzińska, M. (2017). *Roasting pumpkin seeds and changes in the composition and oxidative stability of cold-pressed oils*. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 16(3), 293-301.
- Roberfroid M. Prebióticos: El concepto revisado. J. Nutr. 2007, 137: S830-7

- Rojas-González, A.; Flórez-Montes, C. & López-Rodríguez, D. (2018), *Prospectivas de aprovechamiento de algunos residuos agroindustriales*. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Colombia.
- Slavin, J. (2013), *Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits*. Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota.
- Taiseer, M.; Abou-Bakr; Youssef, M. M. & Moharrm, H. A. (2014). *Analysis, health benefits and applications of prebiotics: A review*. Alex. J. Fd. Sci. & Technol. Vol. 11, No. 2, pp. 25-37.
- Wichienchot, S.; Thammarutwasik, P.; Jongjareonrak, A.; Chansuwan, W.; Hmadhlu, P.; Hongpattarakere, T.; Itharat, A. & Ooraiku, B. (2011). *Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand*. J. Sci. Technol. 33 (5), 517-523, 2011.