



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación del efecto del β -glucano de avena en la
producción de péptidos potencialmente bioactivos
por *Lactobacillus rhamnosus* GG**

Tesis que para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

Presenta

I.A. María Isabel Chávez de la Vega

Directora

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Asesores

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Ciudad de México, a 18 de noviembre de 2020

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465. Se agradece el apoyo de la beca otorgada por CONACYT (CVU 940425) para la realización del presente trabajo.

DEDICATORIAS

A Leticia De La Vega García, mi madre, quien con su apoyo y ejemplo me ha enseñado que todo se puede lograr de la mano de Dios y trabajando duro siempre, y que a pesar de los tropiezos ha estado a mi lado incondicionalmente alentando cada una de mis decisiones y buscando siempre mi desarrollo y superación personal y profesional, consintiéndome y procurándome desde que tengo memoria. No tengo palabras suficientes ni me alcanzaría la vida para agradecer todo lo que me das mami. Espero con este trabajo puedas sentirte un poco recompensada.

A Emilio Isaac Chávez de la Vega, mi hermano, que siempre ha estado para hacerme reír en los momentos más complicados de este camino, aunque él no lo sepa, y a quien quiero darle el ejemplo de que si se quiere y se lucha por algo se puede conseguir con trabajo duro y mucha fe. Hay que echarle ganas a la vida G, todo esfuerzo viene con una recompensa y créeme que es muy satisfactoria. Gracias por estar conmigo siempre.

A Wenceslao J. Muñoz Sánchez, quien ha estado a mi lado en todo este proceso y me ha animado en todos esos momentos difíciles donde pensé en abandonar, y me ha recordado que soy capaz de hacer cualquier cosa que desee. Agradezco por todo el tiempo que has estado conmigo, y espero que sea mucho más, toda la vida.

A Agustín Chávez Medina†, mi padre, que desde el cielo estoy segura de que ha estado conmigo y me ha cuidado desde su partida.

A Rocky, Newton, Waffle† (te extraño tanto), Muffin, Taco, Silvestre, Flaco, Rayitas, Muégano y Clasificado, por su compañía y amor incondicional, sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

Y principalmente, a Dios, por su guía y consuelo, por siempre cuidar de mi en mi camino a la escuela y en cada uno de los días de mi vida.

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano, por siempre estar para resolver mis dudas, por siempre estar al pendiente de mis necesidades, por todo el apoyo que me brindó, y, sobre todo, por la paciencia y confianza que depositó en mí para la realización de este proyecto.

A la Dra. Alma E. Cruz Guerrero, por compartir su conocimiento conmigo, por su asesoría en cada momento que lo necesité y por todos los cuestionamientos a los que me enfrentó para aprender a buscar soluciones.

Al Dr. Luis Guillermo González Olivares, por estar al pendiente de la evolución del proyecto, por su asesoría y por su apoyo.

Infinitas gracias por fomentar en mí el amor por la ciencia y la investigación, siento una gran admiración hacia ustedes. Les agradezco también por haber estado disponibles en todos los momentos en los que necesité guía.

Gracias por todo.

CONTENIDO

RESÚMEN	8
ABSTRACT	9
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	10
1.1 Probióticos.....	10
1.1.1 Aplicaciones en tratamientos alternativos de los probióticos.....	13
1.1.2 Mecanismo de acción de bacterias probióticas sobre bacterias patógenas.....	14
1.1.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	17
1.2 Prebióticos	19
1.2.1 Avena: β -glucanos.....	20
1.3 Péptidos bioactivos.....	23
1.3.1 Clasificación	24
1.3.1.1 Péptidos antimicrobianos	25
1.3.1.2 Péptidos antihipertensivos.....	25
1.3.1.3 Péptidos antitrombóticos.....	26
1.3.1.4 Péptidos hipocolesterolémicos	27
1.3.1.5 Péptidos antioxidantes	27
1.3.1.6 Péptidos inmunomoduladores.....	28
1.3.1.7 Péptidos opioides	28
1.3.1.8 Péptidos fijadores de minerales.....	29
1.3.2 Sistema proteolítico de BAL para la producción de péptidos bioactivos	30
1.3.2.1 Proteinasas.....	30
1.3.2.2 Sistemas de transporte.....	31
1.3.2.3 Peptidasas.....	32
2. JUSTIFICACIÓN	35
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo general	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5. METODOLOGÍA	37

5.1	Activación de <i>L. rhamnosus</i> GG	37
5.2	Avena.....	37
5.2.1	Tratamiento del grano de avena	37
5.2.2	Extracción de β -glucano de las fracciones de avena.....	38
5.2.2.1	Método 1: Extracción de β -glucano por solubilización.....	38
5.2.2.2	Método 2: Extracción del β -glucano con inactivación enzimática	38
5.2.3	Cuantificación de β -glucano	39
5.3	Optimización de la producción de grupos amino libres y crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> GG durante la fermentación	39
5.4	Determinaciones	40
5.4.1	Cuantificación de biomasa.....	40
5.4.2	Determinación del grado de proteólisis (grupos amino libres).....	41
5.5	Fermentación con agitación	41
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
6.1	Caracterización morfológica de <i>L. rhamnosus</i> GG	42
6.2	Avena.....	43
6.2.1	Extracción de β -glucano.....	44
6.3	Diseño experimental.....	47
6.3.1	Crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> GG en medios de cultivo enriquecidos con β -glucano.....	47
6.3.2	Consumo de β - glucano.....	49
6.3.3	Rendimiento de <i>L. rhamnosus</i> GG en función del β -glucano.....	50
6.3.4	Capacidad proteolítica de <i>L. rhamnosus</i> GG	52
6.4	Optimización de la fermentación de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	53
6.4.1	Optimización de crecimiento bacteriano	53
6.4.2	Optimización de actividad proteolítica de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	55
6.4.3	Comprobación del modelo.	58
7	CONCLUSIONES.....	60
8	PERSPECTIVAS	61
9	REFERENCIAS	62
10	ANEXOS	75
	Anexo 1. Curva patrón glicina.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción de probióticos.....	17
Figura 2. Estructura básica del β -glucano de cereales	21
Figura 3. Clasificación de péptidos bioactivos y su rol en el cuerpo humano	24
Figura 4. Modelo del sistema proteolítico de <i>Lactococcus lactis</i>	34
Figura 5. Morfología colonial de <i>L. rhamnosus</i> GG en agar MRS incubado 24 h a 37 °C.	42
Figura 6. Tinción de Gram de <i>L. rhamnosus</i> GG.	42
Figura 7. Fracciones obtenidas de la molienda de avena.....	43
Figura 8. Contenido de β -glucano en los extractos de avena obtenidos con el método 1 (solubilización).....	45
Figura 9. Crecimiento final de <i>L. rhamnosus</i> GG bajo las diferentes condiciones del diseño experimental.	47
Figura 10. Consumo de β -glucano por <i>L. rhamnosus</i> GG bajo diferentes condiciones de fermentación.....	49
Figura 11. Rendimiento del crecimiento de <i>L. rhamnosus</i> GG en función del β -glucano consumido.	51
Figura 12. Actividad proteolítica de <i>L. rhamnosus</i> GG en fermentación con β -glucano	52
Figura 13. Superficie de respuesta para el crecimiento bacteriano en función de la concentración inicial de β -glucano (g/L) y de inóculo (%).	54
Figura 14. Superficie de respuesta para producción de péptidos en función de la concentración de β -glucano y de inóculo.....	56
Figura 15. Comparación de condiciones de fermentación	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos probióticos.....	11
Tabla 2. Clasificación de los probióticos por mecanismos de acción	16
Tabla 3. Composición bioquímica de la avena.....	21
Tabla 4. Peptidasas de lactobacilos	33
Tabla 5. Diseño central compuesto (variables naturales).....	39
Tabla 6. Análisis proximal de la avena (g/100 g de muestra).	43
Tabla 7. Análisis de varianza para crecimiento.....	55
Tabla 8. Análisis de varianza para péptidos.....	57
Tabla 9. Comparación de los valores calculados y los experimentales.....	58

RESUMEN

Los β -glucanos de cereales son polisacáridos que presentan diversas bioactividades. Son capaces de estimular el sistema inmune, modificar los niveles de colesterol, estimular el crecimiento de probióticos, entre otros. Por otro lado, los péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche son producidos por bacterias probióticas como *L. rhamnosus* GG. Es por ello que, hay un interés en la búsqueda de métodos para aumentar la producción de péptidos debido a su alto valor de diversas bioactividades: antihipertensiva, inmunomoduladora, antimicrobiana, entre otras.

Para este estudio, se realizó la extracción del β -glucano a partir de las tres fracciones obtenidas después de la molienda del grano de avena: cascarilla, sémola y harina. La mayor concentración de β -glucano se encontró en la sémola cuando se realizó una extracción por solubilización en agua. Este resultado se comparó con el método de extracción con inactivación enzimática. Con éste método se obtuvo un aumento en el rendimiento de extracción y fue así que se realizaron experimentos dictados por un diseño experimental. El diseño experimental usado fue uno 2^2 compuesto, con puntos estrella para evaluar el efecto de la concentración del inóculo y de β -glucano, en el crecimiento y la actividad proteolítica de *L. rhamnosus* GG. Al final, se aplicó la metodología de superficies de respuesta para la optimización del crecimiento y de la actividad proteolítica.

Los resultados demostraron que las condiciones óptimas para el crecimiento de *L. rhamnosus* GG y para la actividad proteolítica fueron de 20 g/L de β -glucano y 4% de inóculo inicial. De esta manera se demostró que la adición de un prebiótico como el β -glucano de avena en leche, favorecen el crecimiento de *L. rhamnosus* GG y activan la capacidad proteolítica del probiótico durante un proceso de fermentación.

ABSTRACT

Cereal β -glucans are polysaccharides with diverse bioactivities. They are capable of stimulating the immune system, modifying cholesterol levels, stimulating the growth of probiotics, among others. On the other hand, bioactive peptides derived from milk proteins to bioactive peptides by probiotic bacteria such as *L. rhamnosus* GG from milk proteins, has been widely studied. That is why, there is an interest in the search for methods to increase the production of peptides due to its high value of various bioactivities: antihypertensive, immunomodulatory, antimicrobial, among others.

For this study, the extraction of β -glucan was carried out from the three fractions obtained after grinding the oat grain: husk, semolina and flour. The highest concentration of β -glucan was found in the semolina when an extraction by solubilization in water was carried out. This result was compared with the enzyme inactivation extraction method. With this method, an increase in the extraction yield was obtained and thus experiments dictated by an experimental design were carried out. The experimental design used was a compound 22, with star points to evaluate the effect of the inoculum and β -glucan concentration on the growth and proteolytic activity of *L. rhamnosus* GG. At the end, the response surface methodology was applied to optimize growth and proteolytic activity.

The results showed that the optimal conditions for the growth of *L. rhamnosus* GG and for the proteolytic activity were 20 g / L of β -glucan and 4% of initial inoculum. In this way, it was shown that the addition of a prebiotic such as oat β -glucan in milk, favors the growth of *L. rhamnosus* GG and activates the proteolytic capacity of the probiotic during a fermentation process.

1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1 Probióticos

La diversidad de la microbiota intestinal, su equilibrio y las interacciones entre todos los microorganismos presentes, son importantes para mantener una buena salud no solo intestinal, sino que también este equilibrio participa en el mantenimiento del sistema inmune. Por ello, el estudio del papel de los probióticos tanto en la salud como en el efecto de los factores que alteran el ambiente gastrointestinal sobre ellos, ha sido tema de estudio en los últimos años (Castañeda-Guillot, 2018).

En principio, la palabra probiótico se deriva del latín “*pro*” que significa “en favor de” y del griego “*bios*” que significa vida, sin embargo, ha tenido diferentes significados a lo largo de la historia. Lilley y Stitwell en 1965 utilizaron el término para describir sustancias secretadas por un microorganismo que estimulaba el crecimiento de otro. Sperti en 1971 describió a los probióticos como extractos de tejido que estimulaban el crecimiento microbiano. Pero no fue sino hasta 1974 que se utilizó la siguiente definición: “Organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”. Fuller en 1989, al intentar mejorar la definición, describió a los probióticos como suplementos microbianos que afectan benéficamente al huésped mejorando su balance microbiano intestinal (Fuller, 2012).

Una definición más reciente es la que proponen Guarner *et al.* (2017) quienes mencionan que los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud cuando se les administra en cantidades adecuadas, definición que utiliza la Organización Mundial de la Salud (OMS), organismo cuyo objetivo es que toda la humanidad goce de buena salud a través de la promoción, vigilancia y regulación de los sistemas sanitarios, alimenticios y médicos.

Sin embargo, se ha demostrado que de igual forma, si se consumen los probióticos inactivados o extractos libres de células con los metabolitos derivados de las bacterias también tienen efectos benéficos a la salud

(Zendeboodi *et al.*, 2020), por lo que, el término “probiótico” también tendría que tener en cuenta a las células muertas.

En la tabla 1 se enlistan algunos de los microorganismos que se han usado como probióticos.

Tabla 1. Microorganismos probióticos
(Adaptada de Zendeboodi *et al.*, 2020)

Género	Especies
Lactobacillus	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>
Bifidobacterium	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i>
Propionobacterium	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
Pediococcus	<i>P. acidilactici</i>
Leuconostoc	<i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> , <i>Lc. mesenteroides</i>
Streptococcus	<i>S. oralis</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. rattus</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i>
Saccharomyces	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. boulardii</i>

Para que un microorganismo pueda ser clasificado como probiótico debe presentar las siguientes características (Castañeda-Guillot, 2018):

- 1) No patógeno
- 2) Capacidad de supervivencia a través del tracto digestivo
- 3) Adherencia al epitelio intestinal
- 4) Colonización en el tracto intestinal
- 5) Producción de sustancias antimicrobianas
- 6) Estabilidad en forma de polvo, líquido o en alimentos

En principio, cualquier microorganismo de la microbiota intestinal podría ser candidato para convertirse en probiótico, ya que todos ellos contribuyen potencialmente a generar los beneficios que otorga el conjunto. Sin embargo,

en la práctica los probióticos pertenecen fundamentalmente a tres grupos microbianos: los lactobacilos, las bifidobacterias y las levaduras. Estos géneros se caracterizan porque son capaces de colonizar la mucosas intestinal y son inocuos, clasificados como GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos. Las cepas más utilizadas para la producción segura de alimentos fermentados como el yogurt o el queso, pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

A pesar de que las cepas probióticas sean consideradas GRAS, es recomendable realizarles los siguientes análisis antes de ser utilizadas para la producción de alimentos (Sanz *et al.*, 2003).

- a) Resistencia a los antibióticos
- b) Identificación de actividades metabólicas perjudiciales, por ejemplo, la producción de ácido D-láctico, que en seres humanos puede causar acidosis y descalcificación
- c) Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores
- d) Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica
- e) Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos

Según la Asociación Científica Internacional para los Probióticos y Prebióticos, el espectro de los productos y preparaciones que pueden considerarse como probióticos es muy amplio y abarca desde fármacos, alimentos de usos médicos especiales (nutrición enteral con probióticos), alimentos probióticos (leches fermentadas, yogurt y quesos con estudios que demuestren un beneficio sobre la salud), fórmulas infantiles (leches en polvo) y probióticos de administración no oral (vaginales).

Para que un microorganismo sea considerado probiótico es necesario contar con estudios en humanos que demuestren los beneficios directos sobre la salud (Olveira y González-Molero, 2016).

1.1.1 Aplicaciones en tratamientos alternativos de los probióticos

El efecto de los probióticos se ha demostrado en afecciones intestinales en niños y adultos tales como: 1) diarrea aguda infecciosa (de causa viral, bacteriana o parasitaria); 2) diarrea persistente y diarrea asociada con antibióticos; 3) enfermedades inflamatorias intestinales; 4) enterocolitis necrosante en niños prematuros; 5) síndrome del intestino irritable. También se ha estudiado su efecto en el tratamiento de otras afecciones: alergia intestinal, eczema de la piel, osteoporosis, infección gástrica por *Helicobacter pylori*, salud urinaria y vaginal, cólico del lactante, enfermedad diverticular no complicada y en la salud de la cavidad bucal, en específico en la enfermedad periodontal y la halitosis (Castañeda-Guillot, 2018).

Johnston *et al.* (2011) realizaron un estudio en 3432 niños que tomaron antibióticos. Durante el estudio se administraron diferentes probióticos, solos o combinados a diferentes dosis (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus spp* o *Saccharomyces boulardi*) para prevenir diarrea asociada a antibióticos. El estudio demostró que solo el 9% de pacientes del grupo tratado con probióticos presentó diarrea, mientras que en el grupo control, 18% presentó este síntoma asociado al consumo de antibióticos. También se observó que el efecto de los probióticos fue mayor en aquellos que recibieron altas dosis, donde solo el 8% se enfermaron de diarrea, mientras que en el grupo control, 22% de los pacientes presentaron la enfermedad. Candela *et al.* (2008) demostraron que probióticos como *Bifidobacterium longum* Bar33, *Bifidobacterium lactis* Bar30, *Lactobacillus acidophilus* Bar13 y *Lactobacillus plantarum* Bar10 inhibieron la adhesión de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* H10407 a las células Caco-2, al competir por los sitios de adhesión en la capa de enterocitos donde colonizan las bacterias patógenas.

En 2013, Jacobs *et al.* estudiaron el efecto de la administración combinada de *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus thermophilus*, y *Bifidobacterium lactis* en el tratamiento contra la enterocolitis necrosante en lactantes. Estos autores encontraron que se redujo significativamente la enfermedad en el grupo con el tratamiento comparado con el grupo control (reincidencia de 2% y 4.4%,

respectivamente) sin encontrar diferencias significativas entre las combinaciones aplicadas.

Ferrer *et al.* (2017) estudiaron el efecto de la terapia convencional con bromuro de pinaverio en comparación con la misma terapia adicionada con *L. acidophilus* y *L. bulgaricus* en el tratamiento del síndrome de intestino irritable. El 36% de los individuos del grupo al que se le administró el tratamiento con probióticos presentó una disminución de dolor abdominal, mientras que en el grupo control solo el 7.6% de los pacientes reportaron mejoría.

1.1.2 Mecanismo de acción de bacterias probióticas sobre bacterias patógenas

Se han propuesto varios mecanismos de acción en la efectividad de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped contra microorganismos patógenos (Castro y De-Rovetto, 2006).

1. *Producen sustancias antimicrobianas.* El ácido láctico, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y las bacteriocinas, reducen el número de células viables de microorganismos patógenos, afectan el metabolismo bacteriano y pueden tener un efecto sobre la producción de toxinas. En la industria alimentaria, las cepas probióticas se utilizan como conservadores biológicos, en particular por la producción de bacteriocinas que ejercen acción antibacteriana y con ello, **contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos.**
2. *Aumentan la resistencia a la colonización.* Compiten con patógenos por los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal. Algunas cepas han sido seleccionadas por su habilidad de adherencia a las células epiteliales, tal es el caso de algunos *Lactobacillus spp.*
3. *Compiten por nutrientes.* Los probióticos pueden utilizar los nutrientes consumidos por microorganismos patógenos.
4. *Estimulan la respuesta inmune.* Evidencias recientes sugieren que la estimulación de la inmunidad innata y adquirida protegen contra las enfermedades intestinales. Estos microorganismos pueden alertar al

sistema inmune y favorecer la acción en contra de agentes infecciosos a través de la estimulación de la producción de inmunoglobulina A, la activación de macrófagos y el incremento del interferón gamma.

Los probióticos producen beneficios que van más allá de la resistencia a la colonización por microorganismos patógenos, que se enlistan a continuación (Olveira y González, 2016):

- ⇒ Mecanismos muy frecuentes (comunes a la mayoría de los probióticos):
 - Producción de ácidos grasos de cadena corta (acidificación del medio).
 - Regulación del tránsito gastrointestinal.
 - Regularización y estabilización de la microbiota intestinal.
 - Aumento de la regeneración de enterocitos.
 - Exclusión competitiva de patógenos.
 - Acción antioxidante
- ⇒ Mecanismos frecuentes comunes a determinadas especies:
 - Síntesis de vitaminas.
 - Antagonismo directo frente a otras bacterias.
 - Reforzamiento de la barrera intestinal.
 - Metabolismo sobre las sales biliares.
 - Neutralización de carcinógenos.
 - Producción de exopolisacáridos.
- ⇒ Mecanismos raros específicos de algunas cepas
 - Efectos neurológicos.
 - Efectos inmunológicos.
 - Efectos endocrinos.
 - Producción de sustancias bioactivas.

En la tabla 2 se muestran ejemplos de probióticos según algunos de los mecanismos de acción arriba mencionados.

Tabla 2. Clasificación de los probióticos por mecanismos de acción
(Adaptada de Chugh, & Kamal-Eldin, 2020)

Mecanismo de acción	Especies
Producción de bacteriocinas	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>
Mejora de funciones metabólicas e inmunológicas	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i>
Producción de vitaminas	<i>Propionibacterium shermani</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
Actividad antioxidante	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>subsp. bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , and <i>Bifidobacterium longum</i>
Producción de exopolisacáridos	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i>

En la figura 1 se representa el mecanismo de acción de los probióticos en el intestino para manifestar su efecto benéfico. Se incluyen funciones de barrera, modulación de la mucosa, producción de sustancias antimicrobianas y alteración de la microbiota intestinal, con algunos de los mecanismos de acción arriba mencionados.

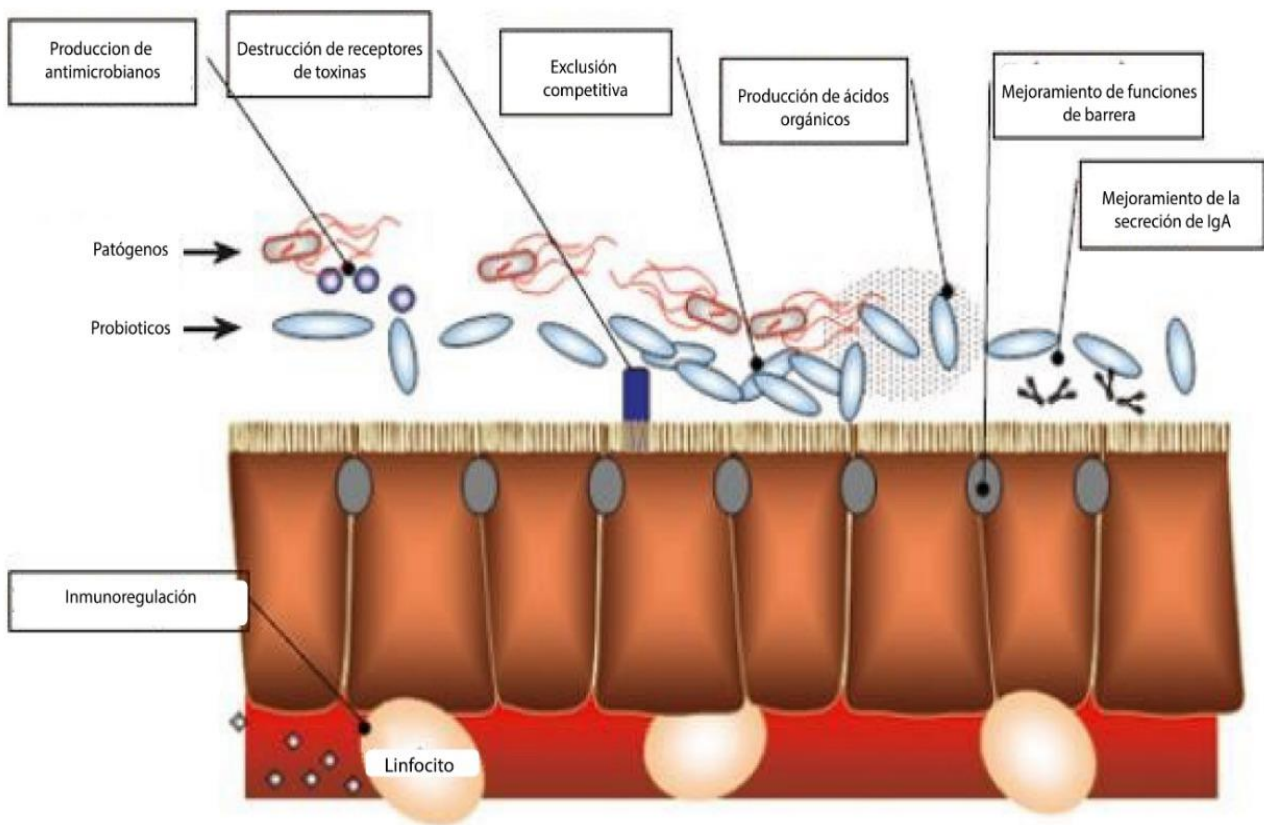


Figura 1. Mecanismos de acción de probióticos
(Adaptado de Ewaschuk & Dieleman, 2006).

1.1.3 *Lactobacillus rhamnosus* GG

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) se han consumido de manera tradicional en los alimentos fermentados. Las bacterias pertenecientes al grupo de *Lactobacillus casei*, han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades probióticas. En este grupo encontramos a *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei* y *L. paracasei*, que han sido comúnmente utilizadas como cultivos iniciadores de la fermentación para aplicaciones en la industria alimentaria (Hill et al., 2018). Debido a que estos microorganismos son heterofermentativos y pueden adaptarse fácilmente a distintas condiciones del medio ambiente, se han encontrado en diversos ecosistemas bacterianos. En el caso específico de *L. rhamnosus*, éste ha sido aislada del intestino humano, de las cavidades vaginal

y oral, así como de quesos. Existen múltiples subespecies de *L. rhamnosus* y una de las más estudiadas es *L. rhamnosus* GG (Douillard et al., 2013).

L. rhamnosus GG fue aislada en 1983 de heces de humanos saludables por Sherwood Gorbach y Barry Goldin, a quienes se les atribuye el "GG" del nombre (Goldin et al., 1992). Ellos observaron que se trataba de una cepa resistente a los ácidos biliares en un rango de pH entre 3-7 y que durante 4 horas no había una disminución de células viables, mientras que cepas como *L. bulgaricus* si presentaba disminución de la cuenta viable bajo las mismas condiciones. También encontraron que tenía la capacidad de adherirse a las células epiteliales, así como de producir sustancias antimicrobianas. Observaron también que morfológicamente se trataba de colonias con forma circular, y en ocasiones ovaladas color crema-blanco y opacas.

Esta cepa fue la primera en ser aceptada como probiótico en la industria láctea (Gorbach & Newton, 1996) y desde entonces se le han atribuido beneficios a la salud relacionados con la mejora de afecciones gastrointestinales y respiratorias, con un efecto en el sistema inmune a nivel de la actividad de citoquinas (entre otros), en la producción de proteínas y por su actividad antibacteriana (Capurso, 2019). Es por ello que se ha utilizado en algunos estudios para el tratamiento de algunas afecciones.

La administración de una dosis diaria de 10^{10} UFC a infantes con gastroenteritis junto con su tratamiento farmacológico, tiene un efecto en la disminución en periodos de diarrea y la recuperación es más rápida (Szajewska et al., 2019). Adicionalmente se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades psicosociales. Al administrar una concentración 10^{10} UFC diariamente por 3 meses en adolescentes hiperactivos, se han observado mejorías en dolores de cabeza, en síntomas emocionales, así como una mejoría en las relaciones familiares, aunado a una disminución de citoquinas proinflamatorias. Es por ello que se sugiere que existe una relación entre las citoquinas y los trastornos de personalidad que puede ser mejorado mediante la administración de un probiótico como *L. rhamnosus* GG (Kumperscak et al., 2020).

Por otro lado, la administración de entre 4.5×10^7 y 8.5×10^7 UFC de *L. rhamnosus* GG por 6 meses en niños de hasta 1 año con problemas de alergia a la leche de vaca aumenta la diversidad de la microbiota intestinal y los niveles de butirato. También disminuyen los síntomas asociados a la alergia como el vómito, diarrea y urticaria. (Canani *et al.*, 2016).

1.2 Prebióticos

La World Gastroenterology Organization (WGO, 2011) define a los prebióticos como “sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas”.

De acuerdo con Olagnero *et al.* (2007) las características que deben presentar los prebióticos son:

- ⇒ No debe ser hidrolizado ni absorbido en la parte alta del tracto digestivo, para favorecer su llegada a la microbiota.
- ⇒ Debe ser capaz de fermentarse selectivamente por bacterias benéficas como bifidobacterias o lactobacilos.
- ⇒ Debe tener la capacidad de modificar la microbiota gastrointestinal de forma saludable.

El papel de los prebióticos es regular la concentración de bacterias benéficas para evitar la colonización del intestino por bacterias patógenas y una disminución de la microbiota intestinal sana, dejando disponibles los nutrientes para este tipo de microorganismos. Se ha demostrado que prebióticos como la inulina y los oligofruktanos son capaces de inhibir la colonización de patógenos en el intestino, debido a los productos de la fermentación de los probióticos que ayudan a crear una barrera intestinal. Entre los productos de la fermentación de los probióticos se encuentran metabolitos como ácidos grasos de cadena corta, hidrógeno, metano, dióxido de carbono, lactato y adicionalmente se estimula el aumento de la biomasa bacteriana (Barreto, 2019).

Los carbohidratos no digeribles (oligosacáridos y polisacáridos), considerados como prebióticos, pueden estar presentes en alimentos de forma natural. Se encuentran en la leche, la miel, frutas, vegetales, cereales etc. Se pueden obtener mediante procesos de extracción solubilizándolos directamente en agua, o bien, por tratamientos químicos o enzimáticos, esta última es la técnica más utilizada (Corzo *et al.*, 2015).

Existen distintos tipos de prebióticos, los más comunes son los fructanos tipo inulina que provienen principalmente de la achicoria (*Cichorium intybus*), con un grado de polimerización de 3 a 60 unidades (en promedio 10). La oligofruktosa se puede obtener por hidrólisis enzimática de la inulina y puede estar compuesta por una mezcla de monómeros de fructosa e inulina con un grado de polimerización de 2 a 8 unidades (Barreto *et al.*, 2019).

Por otro lado, los galactooligosacáridos se obtienen industrialmente a partir de la lactosa con métodos enzimáticos, aunque también se pueden encontrar de manera natural en la leche materna y animal. Pueden contener desde 2 hasta 10 moléculas de galactosa unidas a la glucosa terminal.

Existen moléculas que han sido llamadas “prebióticos emergentes”, dentro de estos se encuentran los glucooligosacáridos, los cuales son carbohidratos lineales de glucosas unidas con enlaces α (1 \rightarrow 6) y pueden presentar ramificaciones en α (1 \rightarrow 2) y α (1 \rightarrow 3). Dentro de este mismo grupo se encuentran los oligosacáridos de soja que son principalmente galactooligosacáridos, los xilooligosacáridos y la lactosacarosa (Corzo *et al.*, 2015).

1.2.1 Avena: β -glucanos

La avena (*Avena sativa*) es un cereal de grano entero perteneciente a la familia *Poaceae* (conserva el germen, el endospermo y el salvado); es mayormente cultivado en Europa y Norteamérica. Tiene un valor energético de 361 kcal por 100 g. Es una buena fuente de ácidos fenólicos y flavonoides (Gómez-Carus *et al.*, 2017). Además, es rica en almidón y contiene una concentración elevada

de fibra total (Tabla 3). La avena es reconocida como buena fuente de β -glucano (3.5-8 g/100g).

Tabla 3. Composición bioquímica de la avena
(Adaptada de Sterna *et al.*, 2016)

	Concentración Mínima (g/100 g)	Concentración Máxima (g/100 g)
Proteína	9.7	17.3
Grasa	5.2	12.4
Almidón	27.3	50.01
Fibra total	13.66	30.17
Fibra soluble	11.53	20.07
β-glucano	2.7	3.5

La importancia de la avena radica en que en la actualidad los cereales son usados para producir alimentos funcionales debido a su composición y en especial, al contenido de β -glucano (Havrlentova *et al.*, 2011). En este caso, la fibra soluble de la avena consiste principalmente de β -glucanos, los cuales son capaces de producir soluciones viscosas.

Los β -glucanos son polisacáridos no ramificados de unidades de β -D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos (1 \rightarrow 4) y (1 \rightarrow 3). Estos se encuentran principalmente en la pared celular de cereales (figura 2).

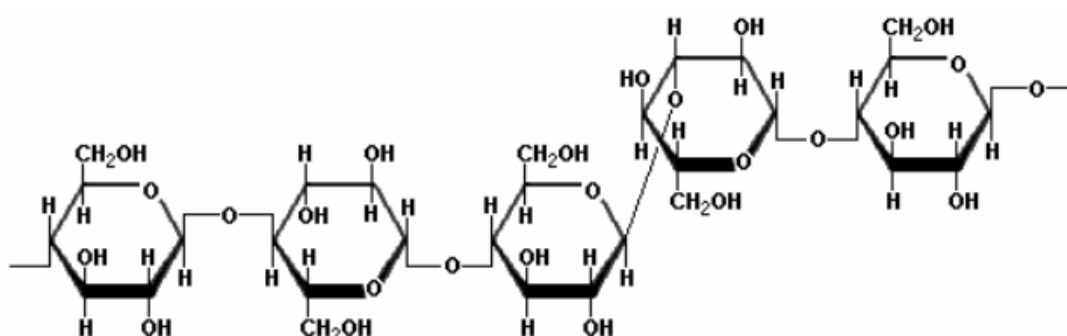


Figura 2. Estructura básica del β -glucano de cereales
(Havrlentova *et al.*, 2011)

La concentración de β -glucano en los cereales depende de factores geoclimáticos, los cuales inciden en el desarrollo de la cascarilla del cereal, donde se encuentra albergada la mayor concentración de β -glucano. Esta concentración se regula por la enzima (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) β -glucanasa, la cual se encarga de degradar la pared celular del endospermo durante la germinación del grano. Los cereales con mayor concentración de β -glucano son la cebada, con 2-20 g/100 g (65% hidrosoluble) y la avena, con 3-8 g/100 g (82% hidrosoluble) (Pizarro *et al.*, 2014).

Pérez *et al.* (2016) reportaron que la viscosidad que genera la avena en solución por la presencia de β -glucano es responsable de la capacidad de disminuir la absorción de colesterol en el intestino además de que al ser fermentado por la microbiota colónica, se generan ácidos grasos de cadena corta que inhiben la absorción del colesterol hepático. En su estudio, 26 pacientes consumieron una ración de 60 g de avena una vez al día por 6 semanas y observaron que el colesterol disminuyó de 217.04 mg/dL a 195.73 mg/dL en promedio, mientras que en los triglicéridos hubo una disminución de 200.31 a 171.38 mg/dL, aunque el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas. Por otra parte, en el estudio realizado por Beck *et al.* (2009), en 41 pacientes con sobrepeso a los que se les dio una ración diaria de cereal con β -glucano (3.8 g/día), presentaron un aumento significativo de la hormona colecistoquinina y en consecuencia, una disminución del apetito y de la respuesta insulínica.

Arora y Sharma (2011) encontraron que con la adición de 3% de β -glucano de cebada en el medio de cultivo, el número de células viables de *L. acidophilus* NCDC13 aumentó hasta 2 ciclos logarítmicos en comparación con el medio control. Por su parte, Dong *et al.* (2017) reportaron que el β -glucano es un buen sustrato para *L. helveticus*, *L. rhamnosus* GG y *B. longum*, ya que su crecimiento mejoró, en comparación con el medio de cultivo sin el prebiótico. Estos autores también encontraron que los ácidos grasos de cadena corta aumentaron durante la fermentación en presencia de β -glucano. Lam *et al.* (2018) reportaron que la presencia de β -glucano mejoró el crecimiento y

prolongó la vida de los lactobacilos durante largos periodos de fermentación en comparación con otro tipo de prebióticos (fucooligosacáridos, galactooligosacáridos).

1.3 Péptidos bioactivos

La concentración de proteína en la leche es de 3.5%, de la cual el 20% es proteína de suero de leche y el 80% son caseínas (α -, β - y κ -caseínas) (Mohanty *et al.*, 2016). A partir de la hidrólisis de estas proteínas se generan los péptidos bioactivos, que son secuencias específicas de 2 a 40 aminoácidos. Mientras forman parte de las proteínas permanecen inactivos y una vez liberados, presentan diversas actividades biológicas dependiendo de la secuencia de aminoácidos presentes. Estos péptidos al ser ingeridos pueden actuar directamente en el sistema gastrointestinal, o pasar al sistema circulatorio para manifestar su efecto (Martínez-Medina *et al.*, 2019).

Los péptidos bioactivos pueden ser producidos mediante 3 mecanismos:

1. **Digestión gastrointestinal.** La hidrólisis ocurre durante la digestión, cuando las proteínas son hidrolizadas por la pepsina, la tripsina y la quimiotripsina, para la producción de péptidos, aunque ciertas proteínas podrían ser resistentes a estas enzimas. Los péptidos producidos pueden ser digeridos en la superficie de las células epiteliales del intestino, mediante peptidasas para la producción de péptidos más cortos o aminoácidos (Jäkälä y Vapaatalo, 2010).
2. **Hidrolisis enzimática.** Es una de las técnicas más utilizadas, en la cual se pueden variar parámetros como pH o temperatura y se pueden utilizar proteinasas de bacterias y hongos para la producción de péptidos bioactivos de origen tanto vegetal como animal, aunque la proteína de leche ha sido la más utilizada. Un beneficio de este método es que se pueden obtener altos rendimientos (Martínez-Medina *et al.*, 2019).
3. **Fermentación microbiana.** La hidrólisis se lleva a cabo mediante el sistema proteolítico de las bacterias ácido-lácticas durante la

fermentación para la producción de yogurt y queso, principalmente. *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* son los más utilizados. La bioactividad y la cantidad de péptidos liberados durante la fermentación dependen de los cultivos iniciadores. Este método también es uno de los más usados para la producción de alimentos enriquecidos con péptidos bioactivos (Sánchez y Vázquez, 2017).

1.3.1 Clasificación

La bioactividad de los péptidos, asociada a distintas respuestas fisiológicas, depende de la secuencia y longitud de la cadena de aminoácidos. Algunas de ellas se muestran en la figura 3.

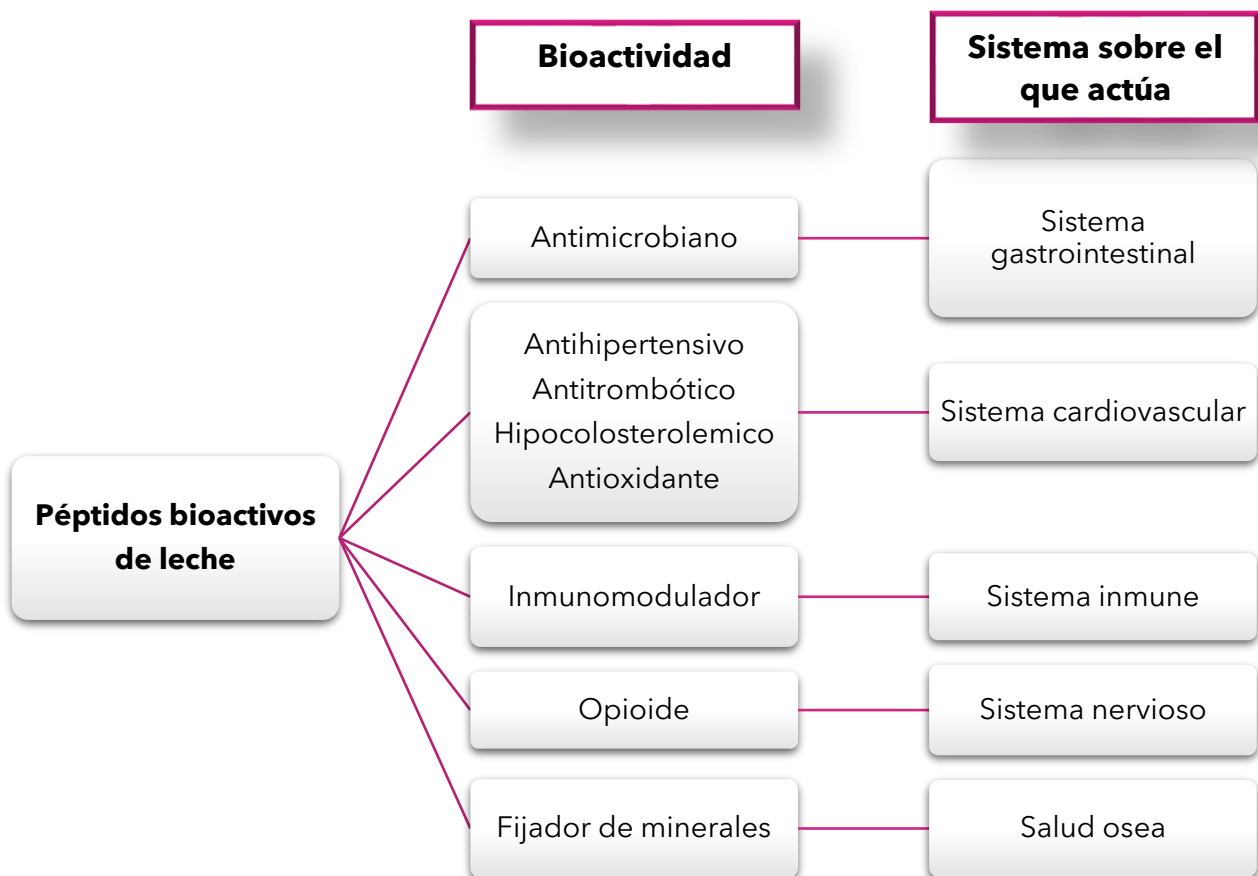


Figura 3. Clasificación de péptidos bioactivos y su rol en el cuerpo humano (Adaptado de Mohanty *et al.*, 2016)

1.3.1.1 Péptidos antimicrobianos

Se ha demostrado que estos péptidos pueden tener acción sobre algunos microorganismos patógenos como *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, además de levaduras y hongos filamentosos. Se caracterizan por ejercer actividad similar a la de los antibióticos, mediante el control de los patógenos al inhibir su crecimiento de una manera natural (Kameli y Ehsani, 2017).

El primer péptido antimicrobiano aislado fue la casocidina-I, derivado de la α -_{s2}-caseína, constituido de 39 aminoácidos, que al poseer aminoácidos de carácter básico pueden formar un bucle de α -hélice en el carbono terminal, que puede ser la causa de su efecto antimicrobiano. Se ha demostrado que actúa contra *E. coli*.

Por otro lado, la lactoferricina es un péptido antimicrobiano catiónico derivado de la degradación de la lactoferrina con la pepsina gástrica. Está compuesto de 25 residuos de aminoácidos, 8 de ellos básicos y presenta una carga neta positiva. Estas características pueden ser la causa de su poder antimicrobiano (Torres-Llenez *et al.*, 2005).

1.3.1.2 Péptidos antihipertensivos

Son los péptidos más estudiados. Presentan dos mecanismos de acción: inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y bloqueo de los receptores de angiotensina. Los péptidos antihipertensivos derivados de las caseínas se llaman casoquininas mientras que los derivados de las proteínas de suero de leche se denominan lactoquininas (Bhat *et al.*, 2017).

Adams *et al.* (2020) midieron la actividad inhibitoria de la ECA de los péptidos generados por *L. helveticus* R0389 y *L. rhamnosus* R0011 en caldo Man Rogosa & Sharp (MRS) suplementado con caseína. Después de 24 h de crecimiento la inhibición de *L. rhamnosus* R011 fue cercano al 100% en el medio

suplementado comparado con el control, mientras que el de *L. helveticus* R0389 fue de 80%.

Crippa *et al.* (2018) realizaron un estudio a un grupo de 15 personas con una presión arterial inicial promedio de 138.2-88.1 mm Hg. Se les suministraron 30 g por día de queso Grana Padano, con 4 péptidos antihipertensivos diferentes. Al grupo control se les administró un placebo. Después de 2 meses intercambiaron, al grupo control comenzaron a administrarle el tratamiento y al grupo experimental se le administró el placebo. Observaron que al primer grupo que le administraron el tratamiento fue el que tuvo una disminución mayor de presión arterial al final del estudio (120-70 mm Hg), en comparación con el grupo control (125-75 mm Hg).

1.3.1.3 Péptidos antitrombóticos

Este tipo de péptidos inhiben la interacción de la trombina con la fibrina para evitar que se formen coágulos en el torrente sanguíneo. El caseinomacropéptido generado a partir de la κ -caseína por acción de la enzima renina, tiene propiedades anticoagulantes (Cheng *et al.*, 2019).

Rendon-Rosales *et al.* (2019) realizaron un estudio *in vitro* con las fracciones peptídicas obtenidas después de la fermentación en leche con 5 cepas diferentes de *Lactococcus lactis*, en un sistema donde simulaban el tracto gastrointestinal. Estos autores observaron que la inhibición de la trombina con el extracto libre de células de las cepas *L. lactis* Lc-571 y *L. lactis* Lc-572, fueron las que presentaron un efecto mayor sobre la inhibición de la trombina (99 % de inhibición), en comparación con la heparina (100% de inhibición).

Por otro lado, Pérez-Escalante *et al.* (2018) realizaron un estudio con *L. casei* Shirota y *L. johnsonii* LA1 aislados de leches fermentadas comerciales para evaluar la capacidad antitrombótica de los péptidos generados a diferentes tiempos de fermentación. Encontraron que con las fracciones peptídicas de *L. johnsonii* LA1 se obtuvo la máxima inhibición de trombina a las 10 horas de

fermentación con 35% de inhibición, mientras que con los péptidos obtenidos de la fermentación de *L. casei* Shirota a las 26 h, solo hubo 20% de inhibición.

Estos resultados demuestran que el sistema proteolítico de cada especie produce péptidos diferentes que manifiestan un efecto propio a cada uno de ellos, cuando se evalúa la misma bioactividad.

1.3.1.4 Péptidos hipocolesterolémicos

Los péptidos que tienen alta capacidad de unirse a ácidos biliares son capaces de inhibir la reabsorción de estos ácidos en el íleon y de esta manera pueden disminuir el nivel de colesterol en la sangre (Park y Nam, 2015).

Rendón-Rosales *et al.* (2019) determinaron la capacidad hipocolesterolémica de las fracciones peptídicas producidas a partir de una leche fermentada con distintas cepas de *L. lactis* en un modelo del sistema gastrointestinal. Los péptidos obtenidos con la cepa Lc-571, mostraron una alta capacidad de inhibición en la formación de micelas de colesterol. En cuanto a la capacidad de unión de los péptidos al ácido cólico, fue la cepa Lc-600e la que produjo los péptidos con el mayor porcentaje de unión (40%).

1.3.1.5 Péptidos antioxidantes

Son péptidos que previenen la peroxidación de ácidos grasos esenciales. Se ha demostrado que, al digerirse caseína, se producen péptidos fosforilados con actividad antioxidante debido a los iones metálicos que poseen (Sánchez y Vázquez, 2017).

Barac *et al.* (2016) evaluaron la capacidad antioxidante de péptidos generados durante la maduración de queso de cabra y encontraron que aumentaba de 35 mmol de Trolox/ kg hasta 60 mmol de Trolox/ kg en 50 días de maduración.

Shu *et al.* (2018) fermentaron leche de cabra con *L. casei* L61 y aislaron los péptidos generados para medir su estabilidad en un modelo del tracto gastrointestinal en presencia del radical libre hidroxilo, debido a que los

radicales libres pueden causar daño oxidativo a proteínas, enzimas y ácidos nucleicos en el cuerpo y desencadenar en enfermedades cardíacas, diabetes, cáncer, entre otras. Encontraron que la tasa de eliminación del radical libre hidroxilo fue de 92.59% a los 40 minutos y bajó a 78% a los 160 minutos, este cambio se le atribuye a la modificación de pH, temperatura y a relaciones enzima-sustrato a lo largo del tracto gastrointestinal.

1.3.1.6 Péptidos inmunomoduladores

Estos péptidos tienen la capacidad de estimular el sistema inmune a través de la activación de macrófagos, los cuales juegan un papel importante en la inmunidad del cuerpo humano, a través de la producción de óxido nítrico, citoquinas como TNF- α , IL-1 y IL-6, inmunoglobulinas y de la fagocitosis. Estos péptidos son de naturaleza hidrofóbica, contienen de 2 a 10 residuos de aminoácidos, entre los que se encuentran la glicina, la valina, la leucina, la prolina y la fenilalanina (Chalamaiah *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que los péptidos generados durante la fermentación con bacterias probióticas como *L. helveticus* aumentan la producción de IL-1, IL-6 y TNF- α , citoquinas que juegan un papel importante en el control de la respuesta inflamatoria. Los péptidos que las estimulan son derivados principalmente de caseínas, aunque, también pueden producirse a partir de proteínas de suero de leche, de pescado, etc. (Tellez *et al.*, 2010).

1.3.1.7 Péptidos opioides

Los receptores de opioides están distribuidos a lo largo del sistema nervioso. Algunos péptidos que son resultado de la hidrólisis de las proteínas de la leche presentan actividad opioide, como las casomorfina. Estos péptidos ejercen funciones reguladoras del sistema nervioso después de su administración oral o intracerebroventricular, al penetrar la barrera intestinal e inducir efectos biológicos a través de los receptores de opioides del sistema nervioso de forma agonista o antagonista (Liu y Udenigwe, 2018).

Jarmolowska *et al.* (2019) evaluaron el efecto de estos péptidos sobre el autismo, ya que se sugiere que este tipo de péptidos contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Se extrajeron muestras de sangre a 86 niños con trastorno del espectro autista y 51 sanos y se cuantificó la concentración de β -casomorfina 7. Se encontró que en los niños autistas había mayor concentración del péptido en comparación con el grupo sano. Este resultado fue atribuido a la acumulación de péptidos debido a una falla en el sistema de transporte de péptidos.

Por otro lado, Dwivedi y Sheth (2019) al evaluar el efecto de la casoxina C sobre la depresión y los niveles de cortisol, encontraron que la administración diaria de una leche fermentada suplementada con casoxina C por un mes, disminuyó el cortisol en 4% y los niveles de depresión en 46.5%.

1.3.1.8 Péptidos fijadores de minerales

Los péptidos fijadores de minerales se obtienen principalmente a partir de la hidrólisis de las caseínas. Estos péptidos mejoran la biodisponibilidad de los minerales al actuar como portadores, lo que contribuye a mejorar su solubilidad. Se les ha relacionado con la unión de iones como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} entre otros (Nongonierma *et al.*, 2016).

Cao *et al.* (2017) evaluaron una mezcla comercial de fosfopéptidos de caseína proveniente de Guangzhou Greencream Biotech Co. Ltd. Aislaron 5 péptidos que mostraron actividad de transporte de calcio, los péptidos DIGSESTEDQAMEDIK y QDKIHPP fueron los que mayor cantidad de calcio transportaron (50 y 60 μg) después de 4 horas, mientras que los demás estuvieron entre 10 y 30 μg de calcio transportado. Lo que demuestra que los péptidos tienen la capacidad de transporte de minerales.

Por otro lado, en un estudio realizado por Figueroa-Hernández *et al.* (2012) donde evaluaron la producción de péptidos fijadores calcio por *L. lactis* subsp *cremoris* NCFB712, encontraron que, al controlar el pH durante la fermentación y manteniéndolo a 6.5, que es el pH óptimo para la proteinasa

de la pared celular, el grado máximo de fijación de calcio se encontró a las 24 horas (0.28 mmol de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína), mientras que sin control de pH obtuvieron 0.23 mmol de Ca^{2+} mg^{-1} de proteína.

1.3.2 Sistema proteolítico de BAL para la producción de péptidos bioactivos

El sistema proteolítico de *S. thermophilus*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* etc., juega un papel muy importante para su crecimiento en la leche ya que necesitan una fuente externa de aminoácidos que adquieren a través de la proteólisis de la caseína y de las proteínas de suero de leche (Savijoki et al., 2006).

El sistema proteolítico de las BAL se compone de tres elementos principales:

1. **Proteinasas** unidas a la pared celular que inician la degradación de las proteínas a oligopéptidos.
2. **Sistema de transporte** de di-, tri- y oligopéptidos a través de la membrana citoplasmática hacia el interior de la célula.
3. Diversas **peptidasas** intracelulares responsables de la degradación de péptidos a oligopéptidos y aminoácidos (Dib et al., 2014).

1.3.2.1 Proteinasas

La degradación de las caseínas es iniciada por una proteinasa extracelular unida a la pared celular llamada PrtP en bacterias del género *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Rodríguez-Serrano et al., 2018). En *Lactobacillus*, la estructura primaria de esta enzima está constituida por 1946-1962 aminoácidos. Estas enzimas se sintetizan como pre-proteínas de aproximadamente 2000 residuos con diferentes dominios. Tienen preferencia por caseínas hidrofóbicas, cuyas características en su estructura secundaria (sin formación de hélices) las hacen susceptibles a la acción de las proteinasas (Savijoki et al., 2006).

Por ejemplo, en el caso de las PrtP de *Lactococcus lactis* se dividen en enzimas tipo PI y PIII, que tienen diferente especificidad por la α S1-, β - y κ -caseína. La PI

degrada la β -caseína, mientras que la PIII tiene afinidad sobre el resto de las caseínas y las degradan en oligopéptidos de 4 a 30 residuos de aminoácidos (Doeven *et al.*, 2005).

Las proteinasas de las BAL tienen similitudes a nivel estructural, aunque su preferencia por los enlaces peptídicos es diferente. En *L. paracasei* se denomina PrtP, en *L. helveticus* es PrtH, en *L. rhamnosus* es PrtR y en *L. bulgaricus* es PrtB (Pastar *et al.*, 2003).

1.3.2.2 Sistemas de transporte

Una vez que las proteinasas de pared celular han hidrolizado las proteínas, los péptidos generados entran a la célula mediante el sistema de transporte de péptidos que los pasa a través de la membrana, este sistema es el Opp, constituido por proteínas que pertenecen a una familia de transportadores que funcionan con ATP (Savijoki *et al.*, 2006).

Esta etapa incluye varios subsistemas específicos para aminoácidos regulados por la generación de protones. En el caso de *Lactobacillus* y *Lactococcus* se lleva a cabo con una enzima llamada DtpT, que permite el transporte de di y tripéptidos hidrófilicos (Liu *et al.*, 2010).

En lactobacilos y lactococos los sistemas de transporte de oligopéptidos se dividen en OppA que es la proteína de unión a los oligopéptidos; OppB y OppC que son dos proteínas integrales de membrana y OppD y OppF que son proteínas de unión a los nucleótidos (Doeven *et al.*, 2005).

A pesar de que el mecanismo del sistema de transporte funciona de manera similar, no todas las cepas tienen los mismos sistemas. *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, y *L. rhamnosus* tienen 3 sistemas de transporte: DPP que es capaz de transportar di-, tri- y tetrapéptidos que contienen aminoácidos de cadena ramificada, DtpT que tiene preferencia por di- o tripéptidos hidrófilicos y Opp para oligopéptidos. Mientras que, *L. reuteri* solo presenta el DtPT (Liu *et al.*, 2010).

1.3.2.3 Peptidasas

Una vez que los péptidos fueron transportados al interior de la célula, entran en acción las peptidasas intracelulares para la liberación de aminoácidos (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2018).

Las peptidasas intracelulares como las aminopeptidasas PepN, PepC, PepX y PepP, se han encontrado en todas las BAL, excepto en *Lactobacillus sakei* y *Pediococcus pentosaceus*. Son las primeras en actuar sobre los oligopéptidos y una de las características principales de estas enzimas es que no pueden degradar la caseína intacta, pero pueden hidrolizar los enlaces peptídicos de los péptidos cortos derivados de la misma. Estas enzimas son capaces de eliminar los aminoácidos N-terminales.

Posteriormente, los péptidos son hidrolizados por la tripeptidasa PepT y por las dipeptidasas PepV y PePD presentes en lactococos y lactobacilos. Estas enzimas tienen afinidad por péptidos que tengan en su secuencia aminoácidos hidrofóbicos (leucina, metionina, glicina y fenilalanina).

Otras peptidasas específicas son: PepA, libera péptidos de 3 a 9 residuos; PepP, afín a tripéptidos con prolina en posición media; PepR y Pepl, actúan en péptidos con prolina en la penúltima posición; PepQ, prefiere péptidos con prolina en la segunda posición y PepS, afín a péptidos con 2-5 residuos de arginina o de aminoácidos aromáticos en la posición terminal (Savijoki *et al.*, 2006).

En la tabla 4 se muestra una relación de las peptidasas intracelulares presentes en diferentes especies de lactobacilos

Tabla 4. Peptidasas de lactobacilos

(Adaptada de Liu *et al.* 2010).

Microorganismo	Peptidasas
<i>L. helveticus</i>	Endopeptidasas: PepO, PepO2, PepO3, PepE, PepE2, Pep F Aminopeptidasas: PepN y PepC, PepT Dipeptidasa: PepD, PepI Específicas para prolina: PepR, PepX
<i>L. rhamnosus</i>	Endopeptidasa: PepO Aminopeptidasas: PepR, PepX
<i>L. delbrueckii</i>	Endopeptidasa: PepG Aminopeptidasas: PepN, PepC, PepL Dipeptidasa: PepV Específicas para prolina: PepQ, PepI, PepX
<i>L. bulgaricus</i>	Específica para prolina: PepQ

En la figura 4 se muestra el sistema proteolítico de *L. lactis*, el sistema proteolítico más estudiado. El esquema muestra las distintas proteínas como la PrtP y la PrtM, que son proteasas de pared celular, las cuales hidrolizan la caseína. También están los sistemas de transporte de oligopéptidos como el Opp, que transporta péptidos entre 4 y 18 residuos de aminoácidos, mientras que el Dpp y el DtpT transportan péptidos más pequeños de entre 2 y 4 residuos. Dentro del citoplasma se encuentran las peptidasas intracelulares, por ejemplo, las PepN, PepO, PepC, PepF, PepX y PepP que se encargan de hidrolizar los péptidos más grandes y generar di o tripéptidos, mientras que PepI, PepV, PepL, PepQ, PepL, PepT, PepR, PepD son responsables de liberar aminoácidos. En *L. lactis* las endopeptidasas presentes son más que las que se encuentran en lactobacilos, es por eso que el sistema proteolítico de esta cepa ha sido más estudiado que el de los lactobacilos, sin embargo, también se han encontrado las mismas proteasas tanto en *L. lactis* como en lactobacilos.

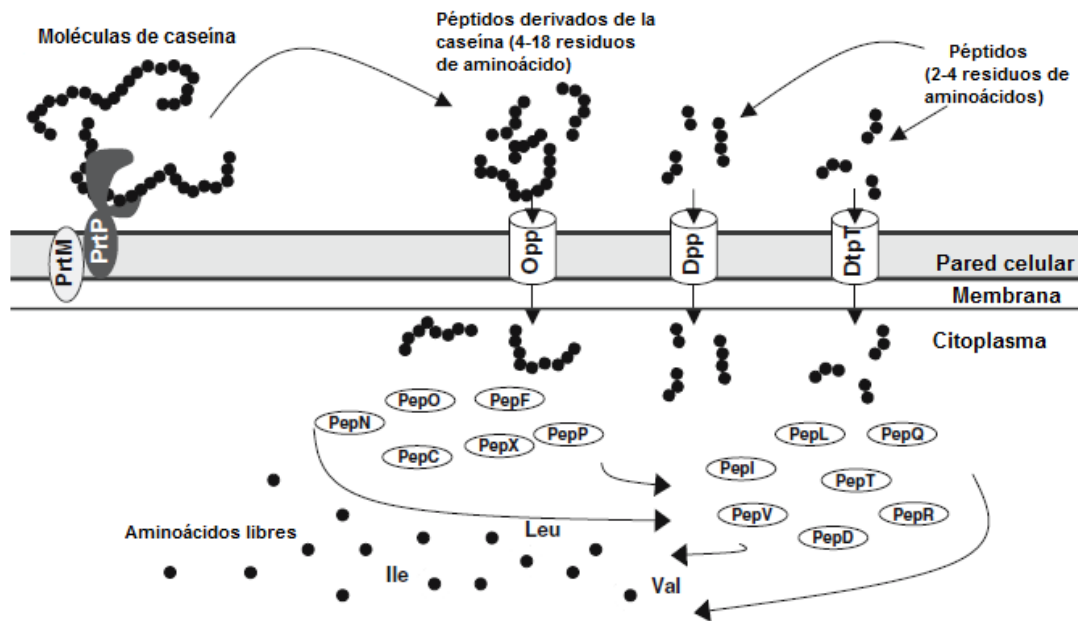


Figura 4. Modelo del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis*.

(Adaptado de Doeven *et al.*, 2005)

Como se ha discutido en esta sección, en el sistema proteolítico existen diferentes elementos en todas las BAL, sin embargo, todas tienen algo en común: proteinasas extracelulares de pared, sistema de transporte y peptidasas intracelulares. Y a pesar de las diferencias en las enzimas presentes en cada cepa, el funcionamiento del sistema proteolítico es el mismo, aunque de estas diferencias también depende la secuencia y la concentración de péptidos generados.

2. JUSTIFICACIÓN

Los prebióticos representan un sustrato preferencial para los probióticos, microorganismos benéficos para la salud. La evidencia científica muestra que el consumo de prebióticos produce efectos positivos sobre la salud tales como la estimulación del crecimiento de cepas probióticas en el tracto gastrointestinal y a través de ello regular la microbiota intestinal, el aumento de la resistencia a infecciones agudas, la mejora del tránsito intestinal, el aumento de la absorción de minerales (calcio y magnesio), un buen funcionamiento del metabolismo de glúcidos y de lípidos, etc. Por otra parte, se ha demostrado el efecto del β -glucano de avena sobre el crecimiento de cepas probióticas como *L. rhamnosus* GG.

En los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo y el consumo de alimentos funcionales nutritivos para mejorar la salud, tales como aquellos que contienen probióticos y prebióticos (simbiótico). Un mejor conocimiento y mayor evidencia científica acumulada hasta ahora permiten, en algunos escenarios clínicos, evaluar las BAL, sobre todo especies de lactobacilos y bifidobacterias como una herramienta terapéutica o un coadyuvante para el tratamiento de algunos síntomas. Estas bacterias tienen la capacidad de degradar las proteínas a di o tripéptidos durante el proceso de la fermentación, entre los cuales se ha demostrado que algunos tienen actividades biológicas en el cuerpo humano. Por ello, es necesario encontrar la manera de aumentar la producción de estos péptidos con actividad biológica para así favorecer su efecto en el tratamiento o prevención de enfermedades.

3. HIPÓTESIS

La adición de β -glucano de avena como prebiótico al medio de cultivo favorecerá el crecimiento de *L. rhamnosus* GG y generará un mayor rendimiento en la producción de péptidos bioactivos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad proteolítica de *Lactobacillus rhamnosus* GG a través de la producción de grupos amino libres en un medio de cultivo adicionado con β -glucano de avena.

4.2 Objetivos específicos

- ⇒ Cuantificar el β -glucano de las fracciones obtenidas de la molienda de la avena (harina, sémola y cascarilla).
- ⇒ Comparar dos métodos de extracción de β -glucano.
- ⇒ Determinar el efecto de la adición del β -glucano al medio de cultivo sobre el crecimiento de *L. rhamnosus* GG.
- ⇒ Cuantificar los grupos amino libres durante la fermentación con *L. rhamnosus* GG en un medio adicionado con β -glucano de avena.
- ⇒ Determinar las condiciones óptimas de inóculo y de concentración de β -glucano para la producción de grupos amino libres por *L. rhamnosus* GG durante la fermentación con leche.

5. METODOLOGÍA

5.1 Activación y caracterización morfológica de *L. rhamnosus* GG

En un tubo con 10 mL de caldo MRS se inocularon 5 chaquiras de un cultivo liofilizado de *L. rhamnosus* GG (Cruz-Guerrero *et al.*, 2014) y se incubó a 37 °C por 24 h. Posteriormente, de este tubo se inoculó al 1% un matraz con 100 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C por 24 h. Para descartar contaminación se realizó tinción de Gram. Una vez que la cepa de *L. rhamnosus* GG fue activado, se conservó en glicerol estéril al 50% en tubos Eppendorff a -20 °C.

Para la caracterización de las colonias, se realizó el método de cuenta en placa (método de la gota). Se realizaron diluciones sucesivas 1:10, en tubos con 9 ml de solución salina al 0.85%, (10^{-1} a 10^{-6}). De cada una de las diluciones se tomaron 5 μ L y se inocularon en cajas Petri con agar MRS, divididas en 4 cuadrantes. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h, y se observaron las colonias en un cuentacolonia.

5.2 Avena

Se utilizó avena (*Avena sativa* L.) en grano, proveniente de Productores Agropecuarios de Tepexpan, Hidalgo.

5.2.1 Tratamiento del grano de avena

Un lote de 5 kg de avena fue limpiado de granos contaminantes, insectos y piedras. Los granos fueron lavados 4 veces con agua destilada (1 L/kg de avena). El desinfectado de los granos se hizo por remojo durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (1%) (Fuentes *et al.*, 2011). Se enjuagó 2 veces con agua destilada en una relación 1:1 (avena:agua). El grano se extendió en charolas de aluminio, en una cama de 3 mm de grosor y se dejó secar en horno a 30 °C por 48 h. A partir de la molienda de la avena en un molino de martillos (Chopin® CD1), se obtuvieron 3 fracciones: sémola, harina y cascarilla. Se hizo el análisis proximal de las 3 fracciones para conocer su composición, y, principalmente, su contenido de fibra.

También se les determinó la concentración de β -glucano a cada una de las 3 fracciones ya que se ha reportado que la cascarilla es la que tiene la mayor concentración de β -glucano. La determinación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el método enzimático β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage) de Megazyme® (Lim, 2018), cuyo principio es que las muestras son suspendidas e hidratadas en un buffer a pH 6.5 y posteriormente incubada con una liquenasa purificada. Una alícuota de la muestra en buffer es hidrolizada completamente con una β -glucosidasa. La D-glucosa producida es medida usando un reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa.

5.2.2 Extracción de β -glucano de las fracciones de avena

5.2.2.1 Método 1: Extracción de β -glucano por solubilización.

Se preparó una mezcla de 0.1 g/mL de cada una de las fracciones obtenidas de la molienda de avena en agua destilada. Cada mezcla se sometió a una agitación vigorosa (agitador magnético) durante 3 h a 55 °C. La mezcla agitada fue centrifugada a 5500 rpm por 10 minutos y el extracto líquido se guardó en congelación hasta su uso (Benito-Román *et al.*, 2011).

Para la comparación de métodos se utilizó la fracción de la cual se obtuvo una mayor concentración de β -glucano con el método 1.

5.2.2.2 Método 2: Extracción del β -glucano con inactivación enzimática

Se pesaron 27.5 g de la fracción elegida y se mezcló con 250 mL de etanol al 75%; se mantuvieron a 80 °C por 4 h. Después del calentamiento, la mezcla se dejó a 40 °C por 48 h hasta sequedad. Se tomaron 6 g de harina seca y se mezclaron con 90 mL de agua destilada a 40 °C, se ajustó el pH a 10 con carbonato de sodio al 20% y se agitó por 30 min. La mezcla agitada se centrifugó por 10 min a 2000 x g. El sobrenadante se enfrió a 20 °C y se ajustó el pH a 4 con ácido clorhídrico al 20%. El extracto líquido se congeló hasta su uso (Beer *et al.*, 1996).

5.2.3 Cuantificación de β -glucano

Se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el método enzimático β -Glucan Assay Kit (Mixed Linkage) de Megazyme® (Lim, 2018).

5.1 Optimización de la producción de grupos amino libres y crecimiento de *L. rhamnosus* GG durante la fermentación

Se optimizaron el grado de proteólisis (grupos aminos libres) y el crecimiento bacteriano en función de distintas concentraciones de β -glucano (g/L) e inóculo (% v/v), de acuerdo con un diseño central compuesto con puntos estrella (Jiménez Careaga, 2015). Las condiciones utilizadas en cada uno de los 12 experimentos realizados se muestran en la tabla 5 con las variables reales y las variables codificadas. El análisis de los datos obtenidos fue realizado con el programa Statgraphics 18-X64 (2018).

Se llegaron a estas concentraciones por medio de la dilución del extracto de β -glucano con agua destilada.

Tabla 5. Diseño central compuesto (variables naturales).

Experimento	β -glucano (X1) g/L	Inóculo (X2) (%)	X1	X2
1	10	3	-1	-1
2	30	5	1	1
3	34.14	4	1.41	0
4	20	5.41	0	1.41
5	20	4	0	0
6	20	4	0	0
7	5.85	4	-1.41	0
8	20	4	0	0
9	30	3	1	-1
10	10	5	-1	1
11	20	4	0	0
12	20	2.58	0	-1.41

Para la activación de *L. rhamnosus* GG, se adicionó 1 mL del stock (almacenado a -20 °C), a un matraz con 20 mL de caldo MRS. Se incubó por 24 h a 37 °C. Para cada experimento del diseño, se prepararon matraces de 50 mL con un volumen de trabajo de 20 mL de Skim milk (10%) con las concentraciones de β -glucano de acuerdo con la tabla 5. Una vez activado *L. rhamnosus* GG (10^6 UFC/mL), se inocularon los medios de acuerdo con la concentración de inóculo indicada en la tabla 5. Para realizar los análisis de grupos amino libres y cuantificación de biomasa, se tomaron 5 mL de cada uno de los matraces ya inoculados, al inicio (0 hr) y al final de la fermentación (24 hr). Las muestras fueron centrifugadas a 18000 rpm por 20 min y los sobrenadantes fueron congelados a -4 °C para análisis posteriores.

5.4 Análisis

5.4.1 Cuantificación de biomasa

La cuantificación de la biomasa se realizó mediante el método de cuenta en placa (método de la gota) para cada uno de los experimentos al inicio y al final de la fermentación (Herigstad *et al.*, 2001).

Se realizaron diluciones sucesivas 1:10, en tubos con 9 ml de solución salina al 0.85%, (10^{-1} a 10^{-6}). De cada una de las diluciones se tomaron 5 μ L y se inocularon en cajas Petri con agar MRS, divididas en 4 cuadrantes. Las cajas se incubaron a 37 °C por 24 h. El conteo para cada muestra se realizó por cuadruplicado.

Se calculó el rendimiento de biomasa producida con respecto al sustrato consumido con la ecuación 1.

Ecuación 1

$$Y = (M_t - M_0)/(S_0 - S_t)$$

Donde:

Y= Rendimiento (UFC/ g de β -glucano)

M_t= Biomasa final (UFC/mL)

M0= Biomasa inicial (UFC/mL)

S0= β -glucano inicial (g/mL)

St= β -glucano final (g/mL)

5.4.2 Determinación del grado de proteólisis (grupos amino libres)

El grado de proteólisis se determinó al inicio y al final de cada fermentación por la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) que se basa en la reacción de los grupos amino libres con el TNBS en un medio ligeramente alcalino, que al reaccionar se tiñe de color amarillo (Adler-Nissen, 1979).

Se adicionaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M, pH 8.2 en tubos de ensaye forrados con papel aluminio (la reacción es sensible a la luz). Se adicionaron a cada tubo 250 μ L de muestra diluida 10 veces en solución amortiguadora de fosfatos. Para la preparación del blanco la muestra fue sustituida por agua desionizada. Se agregaron 2 mL de TNBS al 0.1% a cada tubo, se agitó en vortex y se incubó durante una hora a 50 °C en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción con 4 mL de HCl 0.1 N y se agitó en vortex. Se leyó la absorbancia a 340 nm en celdas de cuarzo en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800). La curva patrón se realizó con glicina (Anexo 1).

5.5 Fermentación con agitación

Una vez optimizadas las concentraciones de inóculo y de β -glucano, se llevó a cabo una fermentación con agitación para determinar su efecto sobre el crecimiento de *L. rhamnosus* GG y la producción de grupos amino libres. El matraz fue colocado en una incubadora con agitación orbital a 100 rpm por 24 horas a 37°C.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización morfológica de *L. rhamnosus* GG

La pureza de *L. rhamnosus* GG se verificó por siembra en placa en medio MRS y por tinción de Gram. En la figura 5 se observan colonias blancas, convexas, circulares con bordes redondeados, características de *L. rhamnosus* GG. En la figura 6 se muestra la micrografía con tinción de Gram, se observa que son bacilos cortos Gram positivos característicos de *L. rhamnosus* GG. Sus medidas reportadas son de 0,8 a 1,0 μm de ancho y de 2,0 a 4,0 μm de longitud (Gorbach & Newton, 1996).

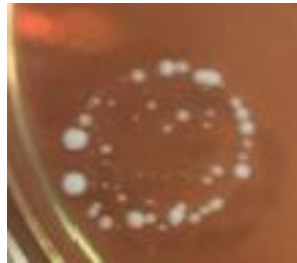


Figura 5. Morfología colonial de *L. rhamnosus* GG en agar MRS incubado 24 h a 37 °C.



Figura 6. Tinción de Gram de *L. rhamnosus* GG.

6.2 Avena

En la figura 7 se muestran las fracciones obtenidas de la molienda de la avena y su rendimiento:

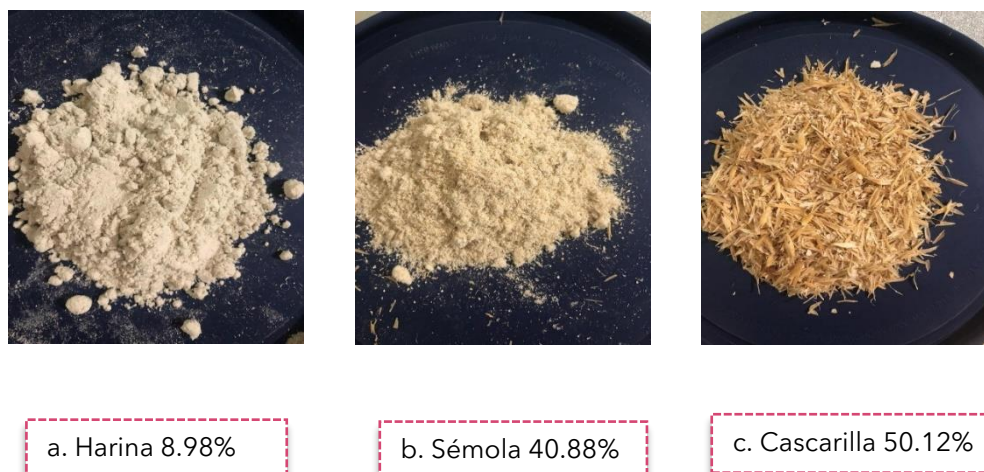


Figura 7. Fracciones obtenidas de la molienda de avena.

Los resultados del análisis proximal que se realizó para cada una de las fracciones de la avena se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Análisis proximal de la avena (g/100 g de muestra).

Análisis	Cascarilla	Sémola	Harina
Humedad	20.02 ± 0.62	21.02 ± 0.14	19.05 ± 0.18
Ceniza	5.24 ± 0.37	2.12 ± 0.16	1.16 ± 0.01
Fibra	39.93 ± 0.37	4.21 ± 0.07	0.29 ± 0.03
Proteína	4.51 ± 1.35	11.73 ± 0.11	8.94 ± 0.42
Grasa	3.23 ± 0.15	6.58 ± 0.40	6.90 ± 0.11
Carbohidratos	25.70 ± 1.75	54.35 ± 0.23	63.67 ± 0.58
β-glucano	3.35 ± 0.05	1.24 ± 0.06	0.12 ± 0.08

En comparación con lo reportado por Kent (1987), la avena con la que se trabajó en la presente tesis presenta algunas diferencias en los valores del análisis proximal de cada una de las fracciones, empezando por la humedad, sobre la cual Kent (1987) reporta valores menores. Para en este trabajo, antes de realizar los análisis se realizó el lavado de la avena, y esto pudo haber

influido en esta variación, en cuanto a los demás valores como fibra, proteína, grasa y carbohidratos, Hernández-Campuzano *et. al.* (2018) hace mención de diversos factores que pueden modificar los valores de los parámetros determinados en el análisis proximal: el genotipo, la nutrición del cultivo, el nitrógeno suplementado durante el desarrollo de la planta, el clima, entre otros. Aunque en el caso de los carbohidratos, donde los valores también son distintos, hay una tendencia en la cual en la cascarilla hay menor concentración, seguido de la sémola y por último la harina.

En cuanto a la concentración de β -glucano, Butt *et al.* (2008) reportaron una concentración en el grano de avena de 2.3-8.5 g/100 g, con una mayor concentración en la cascarilla con 75-80% del total, en el salvado o sémola con 10.4%, mientras que en la harina el contenido es de solo 2-10%.

En el presente trabajo se encontró un total de 4.71 g/100g de β -glucano en el grano, donde el 71.12% se encontró en la cascarilla, el 26.32% en la sémola y el 2.54% en la harina, valores similares a los reportado por Butt *et al.* (2008), aunque en el caso de la sémola la concentración es mayor a la reportada y en la cascarilla es menor. Miller *et al.* (1993) le atribuyen estas diferencias en la concentración de β -glucano a condiciones climáticas, como las precipitaciones y la temperatura, a las que se desarrolla el cultivo, además de factores genéticos del cereal mismo.

De esta primera parte del proyecto se determinó que las fracciones de avena tienen diferentes concentraciones de fibra, dentro de la cual está contenida el β -glucano, por lo cual es importante determinar si la concentración de β -glucano en los extractos sigue la misma tendencia que en las fracciones secas.

6.2.1 Extracción de β -glucano

La figura 8 muestra las concentraciones de β -glucano obtenidas con el método 1 (Metodología 5.2.2.1) de cada una de las fracciones resultantes de la molienda de la avena. Con este método, se obtuvo la mayor concentración de β -glucano en el extracto de la sémola.

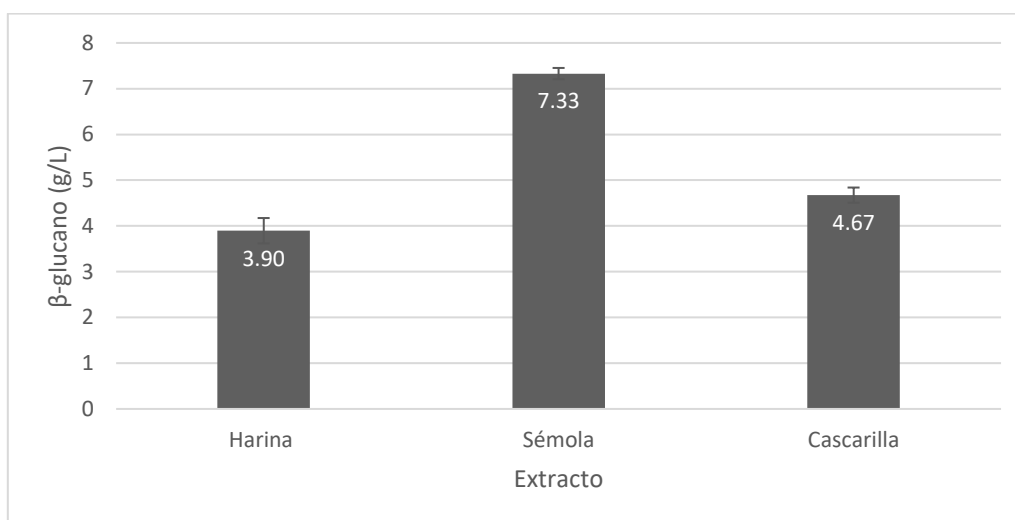


Figura 8. Contenido de β -glucano en los extractos de avena obtenidos con el método 1 (solubilización).

La extracción con el método 1 se basa en la aplicación de temperatura y agitación en un tiempo determinado, para favorecer la solubilización del β -glucano. Benito-Román *et al.* (2011) realizaron un estudio en el cual optimizaron las condiciones para la extracción de β -glucano y encontraron que el tamaño de partícula tiene gran influencia en su rendimiento final en el extracto cuando se aplica una extracción por solubilización.

Como se observó, la sémola y la cascarilla son las fracciones que presentaron la mayor concentración de β -glucano. El extracto de la sémola obtenido por el método 1 (solubilización), tuvo la mayor concentración de β -glucano. Este resultado puede estar relacionado con el tamaño de partícula según lo reporta Benito-Román *et al.* (2011). Como se observó después de la molienda el tamaño de partícula de la sémola es menor que el de la cascarilla (Fig. 7).

Con el método 2, con inactivación enzimática (Beer *et al.*, 1996), se obtuvo un extracto a partir de la sémola con 45.25 g/L de β -glucano. Hubo un aumento de la concentración en el extracto con este método de 517% comparado con el extracto de sémola obtenido a partir del método 1.

Beer *et al.* (1996) propusieron la inactivación de las glucanasas que degradan el β -glucano de la avena para aumentar su rendimiento de extracción. En su estudio encontraron que la inactivación enzimática con etanol disminuyó la actividad de las enzimas de 80 U/kg a 70.5 U/kg, con lo cual, obtuvieron una concentración de 39.65 g/L de β -glucano en su extracto.

El etanol puede actuar sobre la membrana de la pared celular de diversas formas, por ejemplo, deshidratándola, pero fundamentalmente, aumenta la fluidez de la membrana, haciéndola más permeable (Elvir, 2003), lo que pudo ayudar a que el β -glucano se extrajera con un mejor rendimiento. Por otra parte, se ha demostrado que también el etanol puede inactivar a las glucanasas de cereales como avena y cebada si se trata la muestra a temperaturas por arriba de 80°C (Knuckles *et al.*, 1997).

Como parte del método 2, se realizaron ajustes de pH en dos ocasiones, un aumento a pH 10 y una disminución a pH 4, así como un tratamiento térmico a 80°C. En contraste, el pH óptimo de las β -glucanasas está entre 6-7.5 y su temperatura óptima es de entre 45 y 65°C (Planas, 2000) por lo que con las modificaciones de pH y temperatura que se llevaron a cabo en el método de extracción también ayudaron a que la concentración de β -glucano aumentara al desnaturalizar las β -glucanasas.

Gangopadhyay *et al.* (2014) reportaron la optimización de la extracción del β -glucano a partir del grano entero de cebada, en función del pH y la temperatura. Las condiciones óptimas encontradas fueron 55.7 °C y pH de 6.6 con un rendimiento de 81.47 g/L a partir de 100 g de cebada. Este rendimiento es mayor que al obtenido en la presente tesis debido a que la cebada tiene una concentración mayor de β -glucano

Por ello el método de extracción de β -glucano elegido en este estudio fue por medio de inactivación enzimática y se partió de la fracción de sémola por su concentración de β -glucano, para los experimentos posteriores.

6.3 Diseño experimental

6.3.1 Crecimiento de *L. rhamnosus* GG en medios de cultivo enriquecidos con β -glucano

En la figura 9 se muestra el crecimiento de *L. rhamnosus* GG en función de las condiciones del diseño experimental (Tabla 5). Se observa que tanto la variación en la concentración de inóculo como de β -glucano, son factores que determinan la concentración final del microorganismo ($p < 0.05$).

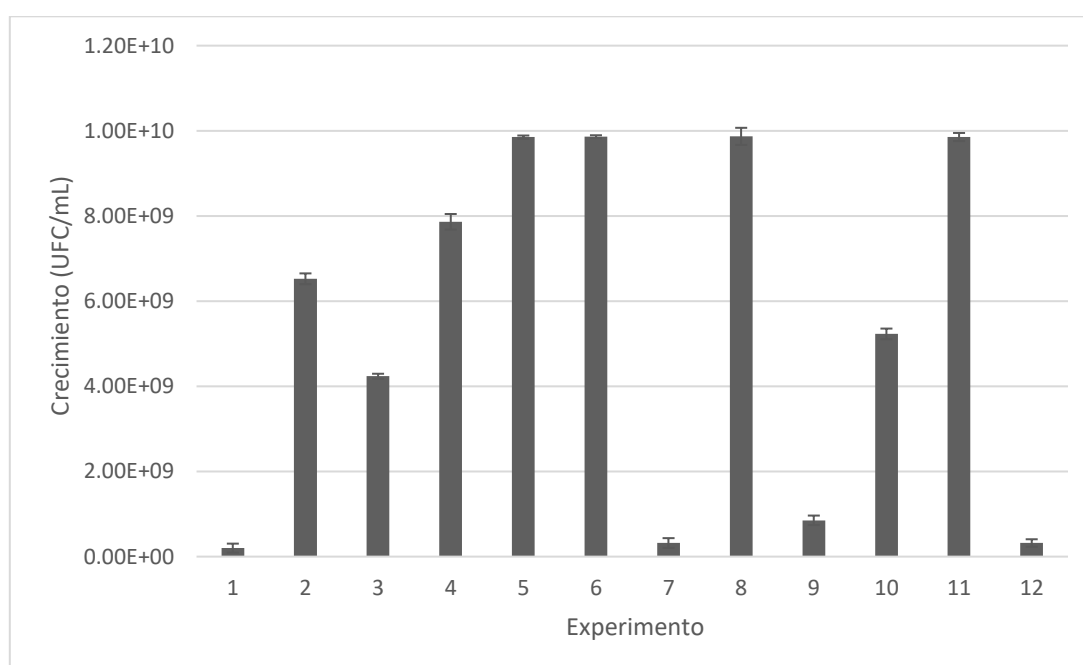


Figura 9. Crecimiento final de *L. rhamnosus* GG bajo las diferentes condiciones del diseño experimental.

Los experimentos correspondientes a los puntos centrales del diseño experimental (5, 6, 8 y 11) con una concentración de β -glucano de 20 g/L y 4% de inóculo inicial, mostraron el mayor crecimiento de *L. rhamnosus* GG, con una producción de biomasa de 1×10^{10} UFC/mL. Mientras que los experimentos 1, 7, 9 y 12 mostraron el menor crecimiento de *L. rhamnosus* GG. En dichos experimentos la concentración del inóculo fue $\leq 3\%$. En el experimento 7, la concentración del inóculo fue de 4% pero la del β -glucano

fue la más baja de todos los experimentos (5.85 g/L). Estos resultados indican que la combinación de concentraciones bajas de inóculo (3%, 4% y 2.58%) y de β -glucano (10, 5.85, 20 g/L) en los experimentos 1, 7 y 12, respectivamente, se obtiene menor crecimiento de *L. rhamnosus* GG. El crecimiento en leche sin β -glucano fue de 0.9×10^9 UFC/mL

Dong *et al.* (2017) estudiaron el potencial del β -glucano y de hidrolizados del mismo a distintas concentraciones, para estimular el crecimiento de algunas cepas probióticas, entre ellas, *L. rhamnosus* GG. Ellos encontraron que *L. rhamnosus* GG creció en el medio MRS suplementado con 2 g/L, tanto de hidrolizados de β - glucano como de β - glucano sin hidrolizar. El mejor crecimiento se tuvo con la adición de los hidrolizados (5.05×10^9 UFC/mL) y argumentaron que, al ser un compuesto de menor peso molecular, es más fácil de asimilar por las bacterias para su crecimiento. *L. rhamnosus* GG también creció en el medio de cultivo con el β - glucano sin hidrolizar (2.9×10^9 UFC/mL).

Arena *et al.* (2014) realizaron un estudio en el cual evaluaron el crecimiento de distintos probióticos (*L. fermentum*, *L. plantarum*. y *L. acidophilus*) en matrices alimenticias adicionadas con β -glucano. Ellos observaron que *L. plantarum* creció mejor en un medio suplementado con pasta de cebada adicionada con 3% de β -glucano en comparación con el medio sin cebada (1×10^{11} y 1×10^7 UFC/mL respectivamente). Con estos resultados llegaron a la conclusión de que la presencia del β -glucano mejora la capacidad de crecimiento de los probióticos. Los resultados de estos autores, se podrían atribuir a los componentes que la pasta de cebada puede contener, tales como contenido proteico y carbohidratos. En comparación con los resultados obtenidos en esta investigación, los cuales fueron menores, podrían deberse a que en esta investigación se utilizó el extracto de β -glucano y no el grano completo.

Por otro lado, en las fermentaciones en leche llevadas a cabo en el presente trabajo también había lactosa disponible, que es un disacárido formado por glucosa y galactosa con un peso molecular de 340 Da (Alm, 1982), mientras que el β -glucano de avena llega a pesar hasta 3100 Da (Vásquez-Mejía *et al.*, 2020). Es por eso que para BAL como *L. rhamnosus* GG es más fácil hidrolizar

la lactosa que es una molécula más pequeña que el β -glucano, por lo cual, no solamente hubo consumo del prebiótico, sino también de la lactosa, aunque debido a la pandemia por COVID-19 no hubo oportunidad de cuantificarla para la presente tesis.

6.3.2 Consumo de β - glucano

En la figura 10 se muestra el consumo de β -glucano en función de las condiciones evaluadas de acuerdo con el diseño experimental (Tabla 5).

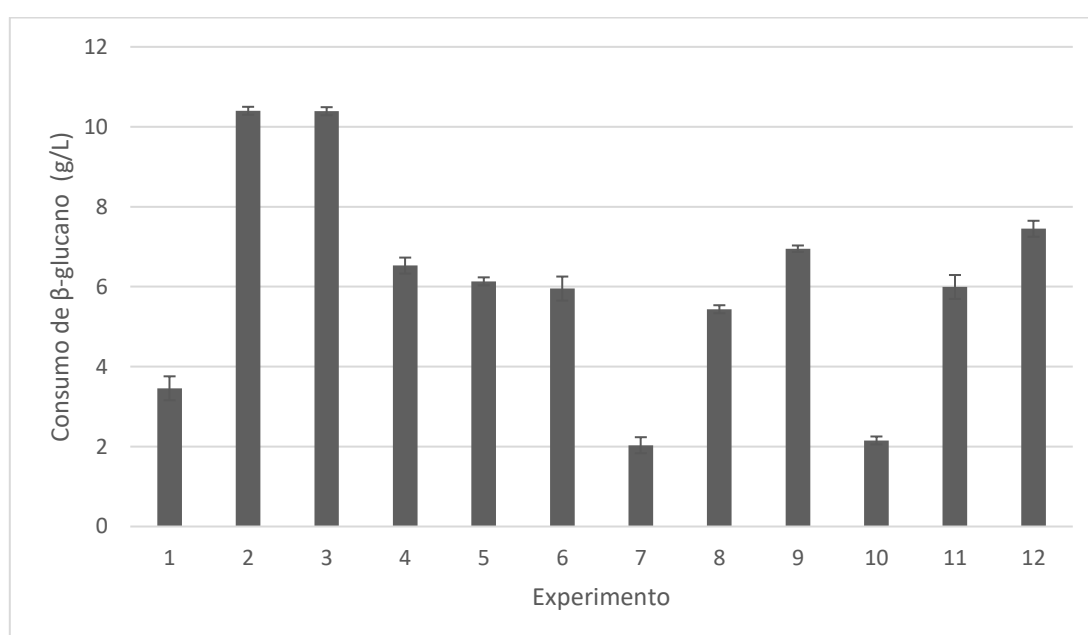


Figura 10. Consumo total de β -glucano por *L. rhamnosus* GG bajo diferentes condiciones de fermentación

En el presente trabajo, se cuantificó el crecimiento de *L. rhamnosus* GG y el consumo de β -glucano en función de la concentración inicial del prebiótico y del inóculo.

En 10 experimentos *L. rhamnosus* GG consumió entre el 30 y el 35% de β -glucano inicial. Solo los experimentos 7 y 10, con 30 g/L y 10 g/L de β -glucano respectivamente, consumieron el 23.3 y 20%, respectivamente. Estos porcentajes están relacionados tanto con la concentración inicial del inóculo,

como a la del β -glucano, ambos fueron determinantes en el crecimiento de *L. rhamnosus* GG y en el consumo del prebiótico.

Lazaridou *et al.* (2014) observaron el efecto del β -glucano sobre el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* en una leche fermentada, y observaron que *S. thermophilus* no se veía favorecida por la presencia del prebiótico, pues el crecimiento en presencia del β -glucano fue menor, mientras que para los dos lactobacilos si hubo un aumento de células viables en presencia de β -glucano, lo que podría indicar que este es un buen prebiótico específicamente para cepas de *Lactobacillus* y no para otros géneros.

Figuroa-González *et al.* (2019) encontraron que *L. rhamnosus* GG se desarrolló mejor en presencia de prebióticos comerciales como Frutafit, Oligomato 55 y Lactulosa, adicionando 10g/L de los prebióticos estudiados, y esa fue su única fuente de carbono con un mejor resultado en los dos últimos en donde alcanzaron un consumo de 35% durante la fermentación. Comparado con los resultados de la presente tesis, el consumo máximo fue de 35% de β -glucano adicionando 20 g/L inicial (experimento 12), sin embargo, también hubo valores bajos, de 23.3% de consumo con 30g/L inicial (experimento 9). Esta diferencia de consumo pudo haber disminuido por la presencia de lactosa, ya que este es un sustrato preferencial de las BAL para su desarrollo.

6.3.3 Rendimiento de *L. rhamnosus* GG en función del β -glucano

La figura 11 muestra el rendimiento del crecimiento del probiótico en función del consumo de β -glucano.

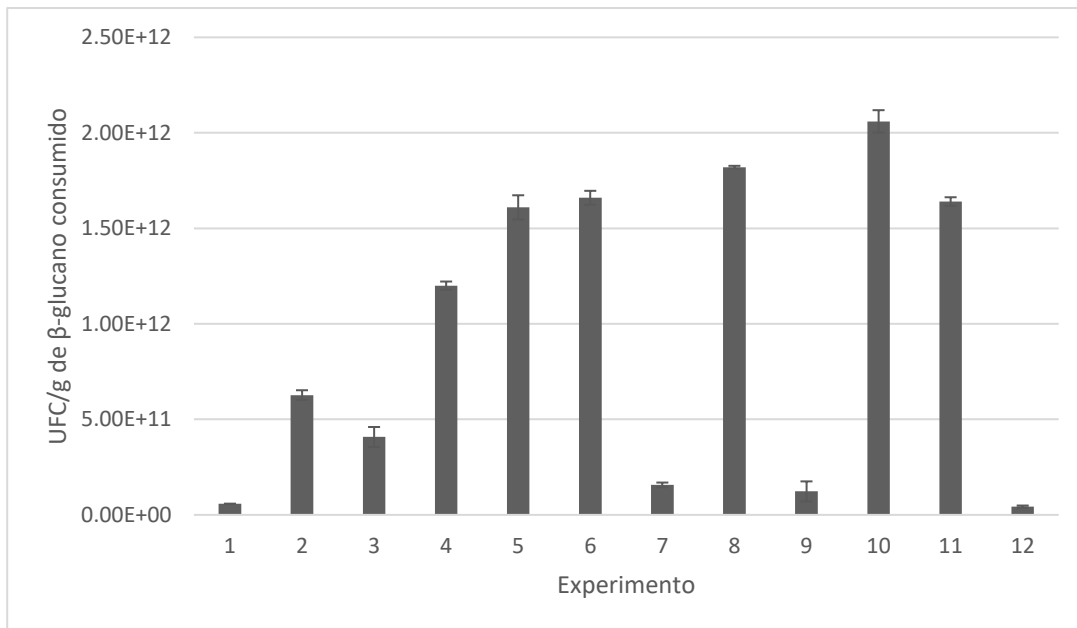


Figura 11. Rendimiento del crecimiento de *L. rhamnosus* GG en función del β -glucano consumido.

Los puntos centrales del diseño experimental (experimentos 5, 6, 8 y 11), junto con el experimento 10 fueron los que presentaron el mayor rendimiento, en este último el crecimiento de *L. rhamnosus* GG fue menor, debido a que la concentración de β -glucano fue de solo 10 g/L.

Los rendimientos obtenidos fueron mayores que aquellos reportados por Medved'ová y Valík (2013), quienes encontraron que el rendimiento máximo de *L. rhamnosus* GG fue de 1.23×10^9 UFC/g de sustrato en un medio de cultivo enriquecido con harina de avena integral con 7.1% de fibra. En el presente trabajo, con 10 g/L de β -glucano inicial, se obtuvo el mayor rendimiento con 2.06×10^{12} UFC/mL de β -glucano. Esto pudo deberse a la diferencia en la forma de adición del β -glucano, ya que Medved'ová y Valík (2013) adicionaron la harina integral de avena que tiene más componentes como proteínas, carbohidratos y grasas.

Por otro lado, Jaskari *et al.* (1998) reportan que *L. rhamnosus* GG puede llegar a consumir hasta el 70% del β -glucano disponible en el medio de cultivo. En la presente tesis el consumo máximo fue solo de 35%, posiblemente debido a la

presencia de la lactosa en las fermentaciones, debido a que, como se mencionó en la sección anterior, para *L. rhamnosus* es más fácil de utilizar el disacárido que el β -glucano.

6.3.4 Capacidad proteolítica de *L. rhamnosus* GG

La figura 12 muestra la producción de grupos amino libres durante la fermentación en cada una de las condiciones del diseño experimental.

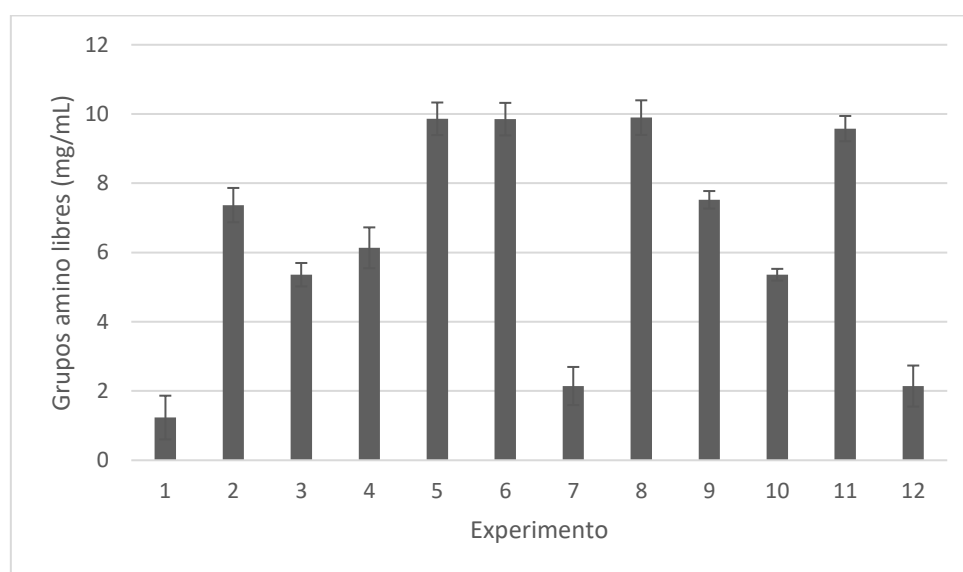


Figura 12. Actividad proteolítica de *L. rhamnosus* GG en fermentación con β -glucano

Los puntos centrales del diseño (experimentos 5, 6, 8 y 11) fue donde se observó una mayor cantidad de grupos amino libres (10 mg/mL). En los experimentos 1 y 12, con la menor concentración de inóculo y el 7 con la menor concentración de β -glucano, se obtuvo la menor producción de grupos amino libres (1.23 mg/mL). Estos resultados indican que la concentración inicial de inóculo así como la concentración de β -glucano suplementado en el medio de cultivo, son determinante en la producción de grupos amino libres. En el grupo control se obtuvo una producción de grupos amino libres de 0.7 mg/mL.

Con los resultados obtenidos podemos decir que la actividad proteolítica, el crecimiento y el rendimiento están sujetos a las concentraciones iniciales de inóculo y de β -glucano.

Los resultados obtenidos son consistentes a lo reportado por Jaimez-Ordaz *et al.* (2019), quienes reportaron que la adición de jugo de agave durante la producción de una leche fermentada aumentó la actividad proteolítica de *L. rhamnosus* GG con mejores resultados que con la adición directa de inulina. Por otro lado, Oh *et al.* (2016) también reportaron un aumento de la actividad proteolítica de *L. gasseri* con la adición al medio de cultivo de un prebiótico extraído de *Cudrania tricuspidata*. Por lo tanto, la presencia de los prebióticos estimula la capacidad proteolítica de los probióticos, al promover su crecimiento junto con la producción de metabolitos como péptidos bioactivos, bacteriocinas, ácidos orgánicos, entre otros (Sanders *et al.*, 2019).

6.4 Optimización de la fermentación de *L. rhamnosus* GG

Con los resultados obtenidos hasta este punto está demostrado que existe una combinación de concentración de inóculo y β -glucano en la cual el crecimiento de *L. rhamnosus* GG es mejor, así como su capacidad proteolítica. Por lo tanto, se obtuvieron las superficies de respuesta para la optimización de las condiciones para el crecimiento y la producción de grupos amino libres.

6.4.1 Optimización de crecimiento bacteriano

Derivado del diseño central compuesto, se obtuvo una superficie de respuesta para el crecimiento de *L. rhamnosus* GG (Figura 13). Se observa que el valor óptimo de crecimiento fue de 1.04×10^{10} UFC/mL con 22.46 g/L de β -glucano y 4.38% de inóculo. La ecuación 1 describe el modelo para crecimiento bacteriano con una R-cuadrada de 0.9753, es decir, que el modelo explica el 97.53% del crecimiento bacteriano en función de la concentración de β -glucano y de inóculo.

Ecuación 2

$$C = -5.79135E10 + 1.25667E9 * G + 2.47676E10 * i - 4.07143E7 * G^2 + 1.3065E8 * G * i - 3.16231E9 * i^2$$

Donde

C=crecimiento (UFC/mL)

G= β -glucano (g/L)

i= concentración de inóculo (%)

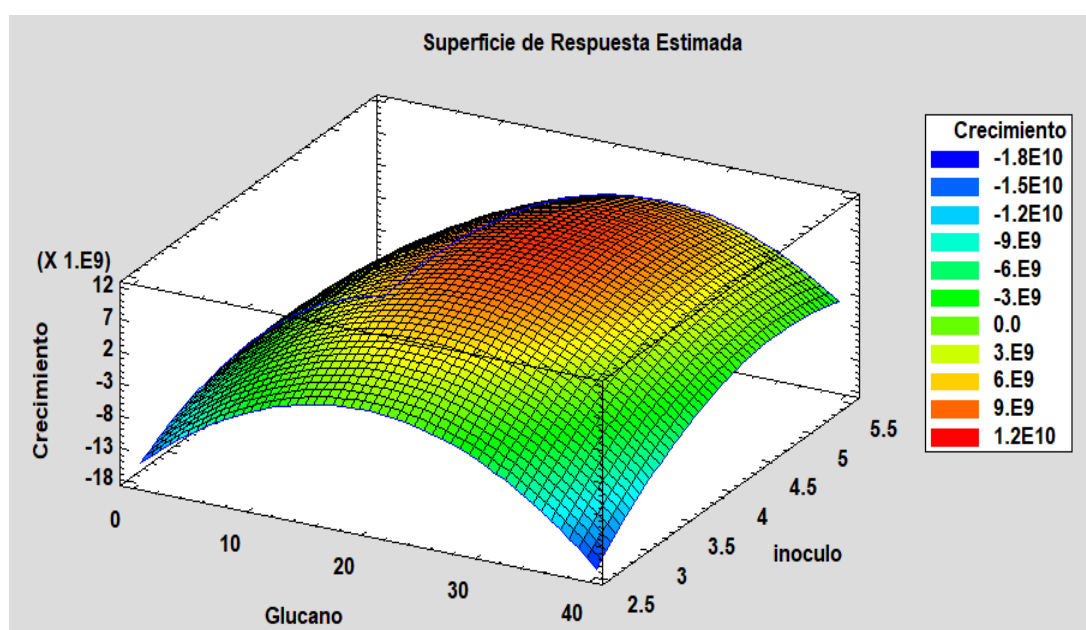


Figura 13. Superficie de respuesta para el crecimiento bacteriano en función de la concentración inicial de β -glucano (g/L) y de inóculo (%).

Del ANOVA derivado de la superficie de respuesta (Tabla 7) se observa que todos los factores fueron significativos ($p < 0.05$) para el crecimiento de *L. rhamnosus* GG: β -glucano, inóculo y la combinación de ambos.

Tabla 7. Análisis de varianza para crecimiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Glucano	1.82E+19	1	1.82E+19	21.23	0.0037
B: inóculo	3.47E+19	1	3.47E+19	40.54	0.0007
AA	1.06E+20	1	1.06E+20	124.02	0.0023
AB	6.83E+18	1	6.83E+18	7.98	0.0302
BB	6.41E+19	1	6.41E+19	74.9	0.0001
Error total	5.14E+18	6	8.56E+17		
Total (corr.)	2.08E+20	11			

Se ha demostrado que el crecimiento durante la fermentación con bacterias lácticas está directamente relacionado con la concentración inicial de inóculo, así como con todos los componentes y suplementos del medio (como prebióticos). Según lo reportado por Yépez *et al.* (2013), una especie de *Lactobacillus* aislado de pulque produjo mayor cantidad de biomasa en leche si se inocula a una concentración del 5% comparado con una concentración inicial del 2%. Por otro lado, la cantidad de prebiótico en el medio también es determinante para el crecimiento de la *L. rhamnosus* GG (Dong *et al.*, 2018). En la presente tesis se demostró que hay una combinación específica tanto de concentración inicial de inóculo como de β -glucano en la cual se produce la mayor cantidad de biomasa por *L. rhamnosus* GG.

6.4.2 Optimización de actividad proteolítica de *L. rhamnosus* GG.

Derivado de diseño central compuesto se obtuvo la superficie de respuesta (figura 14) en la que se observa que el valor óptimo de producción de péptidos es de 10.1571 mg/mL con una concentración inicial de 22.71 g/L de β -glucano en el medio de cultivo y 4.18% de inóculo. La ecuación 2 describe el modelo para generación de péptidos con una R-cuadrada 0.9546, es decir, que el

modelo explica el 95.46% de la producción de grupos amino libres en función de la concentración de β -glucano y de inóculo.

Ecuación 2

$$P = -60.9436 + 1.79406 * G + 24.219 * i - 0.0272997 * G^2 - 0.13225 * G * i - 2.53223 * i^2$$

Donde

P=péptidos (mg/mL)

G= β -glucano (g/L)

i= Concentración de inóculo (%)

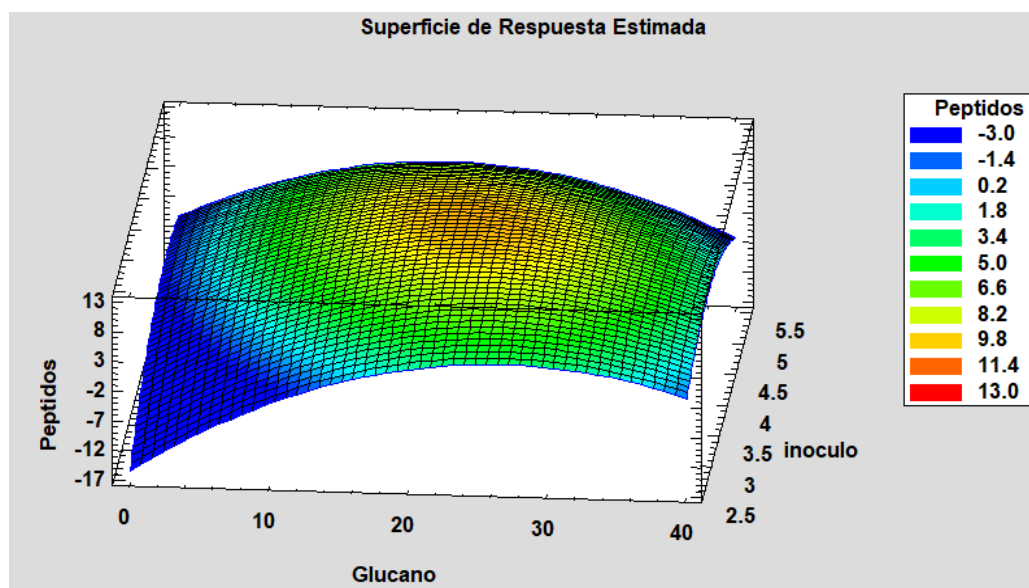


Figura 14. Superficie de respuesta para producción de péptidos en función de la concentración de β -glucano y de inóculo

Del ANOVA derivado de la superficie de respuesta (Tabla 8) se observa que todos los factores fueron significativos ($p < 0.05$) para la producción de péptidos por *L. rhamnosus* GG: la concentración de β -glucano, la concentración de inóculo y la interacción de ambos.

Tabla 8. Análisis de varianza para péptidos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Glucano	23.9663	1	23.9663	25.36	0.0024
B: inóculo	13.8658	1	13.8658	14.67	0.0087
AA	47.7214	1	47.7214	50.5	0.0004
AB	6.99602	1	6.99602	7.4	0.0346
BB	41.106	1	41.106	43.5	0.0006
Error total	5.66932	6	0.944887		
Total (corr.)	124.905	11			

Con los resultados obtenidos de la optimización se comprobó que la actividad proteolítica de *L. rhamnosus* GG está relacionada directamente con la concentración inicial de inóculo y de prebiótico en el medio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que la concentración inicial del inóculo es determinante en la actividad proteolítica de *L. rhamnosus* GG. En trabajos previos de fermentaciones con *L. rhamnosus*, se han utilizado concentraciones iniciales del 1% de inóculo, lo que representa aproximadamente 1×10^6 UFC/mL, por ejemplo, Rodríguez-Hernández & Chávez-Martínez (2018) cuyo sustrato fue yogurt, Kumari & Vij (2015) en leche de soya, Jaimez-Ordaz *et al.* (2019) en leche fermentada enriquecida con jugo de agave y González-Olivares *et al.* (2014) quienes utilizaron queso como sustrato para evaluar la actividad proteolítica de las cepas.

Por otro lado, la adición de prebióticos también se relaciona con la actividad proteolítica. En el presente trabajo se encontró que existe una combinación de la concentración inicial de β -glucano (prebiótico), con la concentración de inóculo inicial, en la cual la actividad proteolítica de *L. rhamnosus* GG fue mayor que en los estudios previos realizados por otros autores. HabibiNajafi *et al.* (2017) reportaron que mientras mayor es la adición de inulina en la fermentación con *L. casei*, mayor es la producción de grupos amino libres.

6.4.3 Comprobación del modelo.

La tabla 9 muestra la comparación entre los resultados experimentales y los predichos por el diseño experimental.

Tabla 9. Comparación de los valores calculados y los experimentales.

Variable de respuesta	Valores calculados	Valores experimentales	P ($\alpha=0.05$)
Péptidos (mg/mL)	10.16	10.01 \pm 0.02	0.098
Crecimiento (UFC/mL)	1.04 \times 10 ¹⁰	1.05 \pm 0.07 \times 10 ¹⁰	0.059

Se observa que entre los valores experimentales y los arrojados por el modelo con 22.46 g/L de β -glucano y 4.38% de inóculo inicial no hay diferencia significativa, por lo que el modelo es útil para predecir tanto el crecimiento de *L. rhamnosus* GG, como la concentración de péptidos. Con este modelo se observa que la actividad proteolítica depende del crecimiento de *L. rhamnosus*.

También se realizaron pruebas para ver el efecto de la agitación sobre la producción de péptidos y el crecimiento de *L. rhamnosus* GG, bajo las condiciones óptimas predichas por con el análisis de superficies de respuesta. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15.

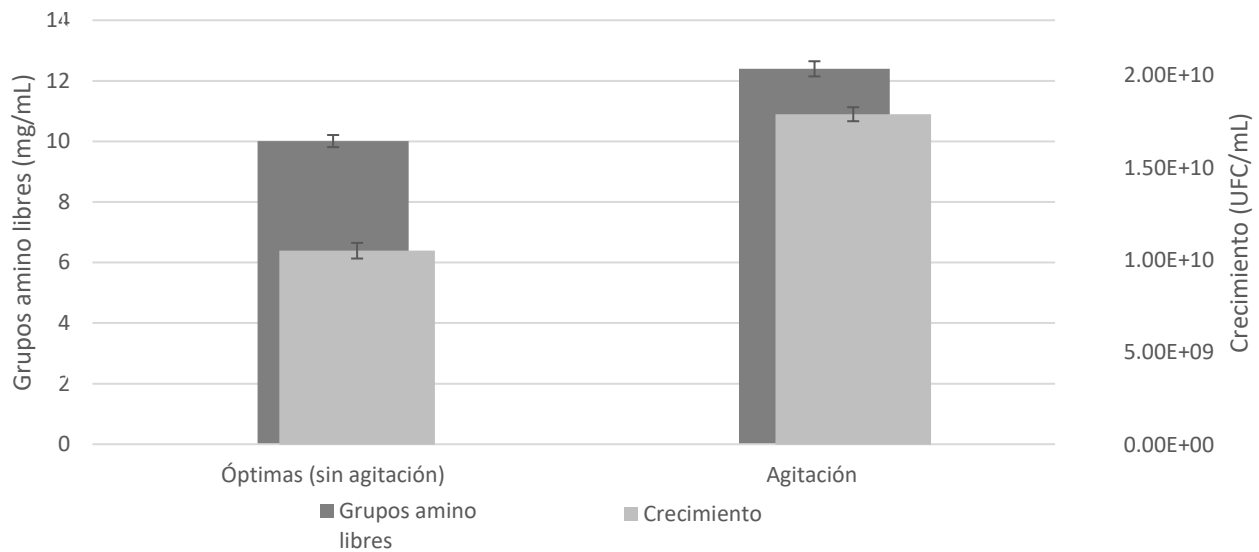


Figura 15. Comparación de condiciones de fermentación

Se observa una mejoría en los resultados de crecimiento y producción de péptidos cuando se implementó la agitación (100 rpm), esto debido a que las células y el sustrato se encuentran en constante movimiento y con mejor disponibilidad de los componentes del medio de cultivo.

Se ha demostrado que la agitación durante la fermentación influye en el crecimiento microbiano, gracias a que los nutrientes del medio se encuentran distribuidos homogéneamente en todo el reactor, así como las células (Foliaco-Sandoval *et al.*, 2018). Yáñez-Tisalema (2016) reporta que, en una fermentación en suero de leche, *L. casei* creció 52% más en condiciones de agitación, mientras que en la presente tesis crecimiento en agitación tuvo un aumento de 41%. En cuanto a los grupos amino libres, la generación de los mismos está estrechamente ligada al crecimiento del probiótico, por lo que se esperaba un aumento de los mismos.

Sin embargo, en cuanto al rendimiento de grupos amino libres producidos por UFC, se obtuvo con las condiciones óptimas sin agitación, un rendimiento de 9.51×10^{-10} mg de grupos amino libres/UFC, mientras que con agitación se

obtuvo un rendimiento de 6.92×10^{-10} mg de grupos amino libres/UFC. Por lo tanto, en este caso particular, no es factible utilizar la agitación para la producción de grupos amino libres.

7 CONCLUSIONES

- ⇒ Se cuantificó el β -glucano de las fracciones obtenidas de la molienda de avena, de las cuales, la cascarilla fue la fracción con mayor concentración de β -glucano con 3.35 g/L, representando el 71.12% del total del prebiótico en el grano.
- ⇒ Se comparó el método de extracción de β -glucano por solubilización con el método de extracción con inactivación enzimática y, con este último se obtuvo un aumento en la concentración del prebiótico de 517%.
- ⇒ Se optimizó la actividad proteolítica y el crecimiento de *L. rhamnosus* GG en función de la concentración de inóculo y de la concentración de β -glucano, obteniendo que con 22.46 g/L de β -glucano y 4.38% de inóculo se generaron experimentalmente 10.01 mg/mL de grupos amino libres y 1.05×10^{10} UFC/mL, sin diferencia significativa con los valores óptimos arrojados por el modelo ($\alpha=0.05$).
- ⇒ En fermentación con agitación *L. rhamnosus* GG produjo 25% más biomasa y 41% más de grupos amino libres en comparación con la fermentación sin agitación.
- ⇒ La presencia del β -glucano promovió el crecimiento de *L. rhamnosus* GG y estimuló su sistema proteolítico al aumentar la producción de grupos amino libres.

8 PERSPECTIVAS

- ⇒ Determinar el consumo de lactosa durante las fermentaciones para comprobar su participación en el crecimiento y la producción de péptidos en presencia de β -glucano.
- ⇒ Determinar la bioactividad de los péptidos generados durante la fermentación.
- ⇒ Determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos generados.

9 REFERENCIAS

- Adams, C., Sawh, F., Green-Johnson, J. M., Taggart, H. J., & Strap, J. L. (2020). Characterization of casein-derived peptide bioactivity: Differential effects on angiotensin-converting enzyme inhibition, cytokine, and nitric oxide production. *Journal of Dairy Science*.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27 (6): 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Alm, L. (1982). Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *Journal of dairy science*, 65(3), 346-352.
- Arena, M. P., Caggianiello, G., Fiocco, D., Russo, P., Torelli, M., Spano, G., & Capozzi, V. (2014). Barley β -glucans-containing food enhances probiotic performances of beneficial bacteria. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 3025-3039. <https://doi.org/10.3390/ijms15023025>
- Arora, T., & Sharma, R. K. (2011). Prebiotic effectiveness of galactooligosaccharides and β -glucan in stimulation of growth of *Lactobacillus acidophilus* NCDC 13 in vitro. *Current Topics in Nutraceuticals Research*, 9(1/2), 67.
- Barac, M., Pesic, M., Zilic, S., Smiljanic, M., Stanojevic, S., Vasic, M., Despotovic, S., Vucic, T., & Kostic, A. (2016). Protein profiles and total antioxidant capacity of water-soluble and water-insoluble fractions of white brined goat cheese at different stages of ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(5), 1140-1149.
- Barreto, R. (2019). Prebiotics for the prevention of gastrointestinal diseases. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 69(6).

- Beck, E. J., Tosh, S. M., Batterham, M. J., Tapsell, L. C., Huang, X. F. (2009) Oat β -glucan increases postprandial cholecystokinin levels, decreases insulin response and extends subjective satiety in overweight subjects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 1343-1351.
- Beer, M. U., Arrigoni, E., & Amado, R. E. N. A. T. O. (1996). Extraction of Oat Gum from Oat Bran: Effects of Process on Yield, Molecular Weight Distribution, Viscosity and (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -D-Glucan Content of the Gum. *Cereal Chemistry*, 73(1), 58-62.
- Benito-Román, O., Alonso, E., & Lucas, S. (2011). Optimization of the β -glucan extraction conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of cereal science*, 53(3), 271-276. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2011.01.003>
- Bhat, Z. F., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2017). Antihypertensive peptides of animal origin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3), 566-578.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Khan, M. K. I., Shabir, R., & Butt, M. S. (2008). Oat: unique among the cereals. *European journal of nutrition*, 47(2), 68-79.
- Canani, R. B., Sangwan, N., Stefka, A. T., Nocerino, R., Paparo, L., Aitoro, R., & Nagler, C. R. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *The ISME Journal*, 10(3), 742-750.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., & Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 286-292.

- Cao, Y., Miao, J., Liu, G., Luo, Z., Xia, Z., Liu, F., Yao, M., Cao, X., Sun S., Lin, Y., Lan, Y. & Xiao, H. (2017). Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides enhance calcium and magnesium uptake in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2307-2314.
- Capurso, L. (2019). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 53, S1-S41.
- Castañeda-Guillot, C. (2018). Probióticos, puesta al día: an update. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(2), 286-298.
- Castro L.A., De-Rovetto C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4) 308-314.
- Chalamaiah, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205-222.
- Cheng, S., Tu, M., Liu, H., Zhao, G., & Du, M. (2019). Food-derived antithrombotic peptides: Preparation, identification, and interactions with thrombin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(sup1), S81-S95.
- Chugh, B., & Kamal-Eldin, A. (2020). Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 76-82.
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 99-118.
- Crippa, G., Zabzuni, D., Bravi, E., Piva, G., De Noni, I., Bigli, E., & Rossi, F. (2018). Randomized, double-blind, placebo-controlled study on the antihypertensive effects of Grana Padano DOP cheese consumption in

mild-moderate hypertensive subjects. *European Review For Medical And Pharmacological Sciences*.

Cruz-Guerrero, A., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Figueroa-González, I. (2014). Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2246-2252.

Dib W., Biscola V., Choiset Y., Chobert J.M., Haertlé T., Chekroun A., Saidi D., Kheroua O. (2014). Characterization of a new isolate of *Lactobacillus brevis* WD19 from Algerian goat milk with proteolytic activity. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 3(12): 423-432.

Doeven M.K., Kok J., Poolman B. (2005). Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*. 57(3): 640-649.

Dong, J. L., Yu, X., Dong, L. E., & Shen, R. L. (2017). In vitro fermentation of oat β -glucan and hydrolysates by fecal microbiota and selected probiotic strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 4198-4203. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8292>

Douillard, F. P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T. E., Järvinen, H. M., Messing, M., & Caggia, C. (2013). Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genetics*, 9(8), e1003683.

Dwivedi, S., & Sheth, M. (2018). Fermented Milk Derived Biogenic Metabolites and Their Probable Impact on Cortisol Levels and Depression Scores. *International Journal of Research and Analytical Reviews*. 6(1)

Elvir, J. R. (2003). Efecto del etanol sobre las membranas biológicas. *Rev. Med. Hondureña*, 61(1), 20-24.

- Ewaschuk, J.B., & Dieleman, L.A. (2006). Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 12(37), 5941
- Ferrer, J., Parra, V., Bendaño, T., Montes, P., & Solorzano, P. (2017). Utilidad del Suplemento de Probioticos (*Lactobacillus acidophilus* y *bulgaricus*) en el Tratamiento del Síndrome de Intestino Irritable. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 32(4), 387-93.
- Figueroa-Gonzalez, I., Rodríguez-Serrano, G., Gomez-Ruiz, L., Garcia-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products. *Food Science and Technology*, 39(3), 747-753.)
<https://doi.org/10.1590/fst.07318>
- Figueroa-Hernández, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Jiménez-Guzmán, J. (2012). Producción de péptidos fijadores de calcio y hierro por *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NCFB 712. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(2), 259-267.
- Foliaco Sandoval, D. J., Valdez Barros, L. M., Gómez Nussbaumer, S. J., & Ganem Torres, Y. P. (2018). Determinación de parámetros claves en el proceso de escalamiento para la producción de *Lactobacillus* spp. *Mente Joven*, 7, 45-58.
- Fuentes, F., Poblete, C., Huerta, M., & Palape, I. (2011). Evaluación de la producción y calidad nutritiva de avena como forraje verde hidropónico en condiciones de desierto. *Idesia (Arica)*. 29(3), 75-81.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292011000300011>
- Fuller, R. (Ed.). (2012). *Probiotics: the scientific basis*. Springer Science & Business Media.

- Gangopadhyay, N., Hossain, M. B., Rai, D. K., & Brunton, N. P. (2015). Optimisation of yield and molecular weight of β -glucan from barley flour using response surface methodology. *Journal of Cereal Science*, 62, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.10.007>
- Goldin, B. ., Gorbach, S. ., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., and Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*. 37, 121-128. doi: 10.1007/BF01308354
- Gómez-Carus, A., Ceballos-Walls, I., Ruiz-Moreno, E., Rodríguez-Alonso, P., Valero-Gaspar, T., Ávila-Torres, J. M., Varela-Moreiras, G. (2017) INFORME Datos actuales sobre las propiedades nutricionales de la avena. *Fundación Española de la Nutrición*. Recuperado de <https://www.fen.org.es/storage/app/media/>
- González-Olivares, L. G., López-Cuellar, Z. L., Añorve-Morga, J., Franco-Fernández, M. J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2014). Viability and Proteolytic Capacity of *Lactobacillus bulgaricus* 2772 and *Lactobacillus rhamnosus* GG during cheese ripening. *The Journal of Bioscience and Medicine*, 2014, 7-12.
- Gorbach, S. L., & Newton, I. (1996). The discovery of *Lactobacillus* GG. *Nutrition Today*, 31(6), 5S.
- Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A.G, Kim, N., De Paula, J. A., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., & Le Mair, A. (2017). Probióticos Prebióticos. Guía Mundial de la World Gastroenterology Organization.(WGO). Milwaukee, EE. UU.: WGO.
- HabibiNajafi, M. B., Fatemizadeh, S. S., & Tavakoli, M. (2017). Effect of fat percentage and prebiotic composition on proteolysis, ace-inhibitory and antioxidant activity of probiotic yogurt. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*. 11(8).

- Havrlentova, M., Petrulakova, Z., Burgarova, A., Gago, F., Hlinkova, A., & Šturdík, E. (2011). β -glucans and their significance for the preparation of functional foods-a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(1), 1-14.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44(2), 121-129.
- Hernandez-Campuzano, A. V., Martínez-Rueda, C. G., Estrada-Campuzano, G., & Dominguez-López, A. (2018). Efecto de la fertilización nitrogenada y del genotipo sobre el rendimiento y el contenido de nitrógeno y β -glucanos en el grano de la avena (*Avena sativa* L.). *RIA Repositorio Institucional Biblioteca Digital*. 44 (2) : 88-95
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2018). The *Lactobacillus casei* group: history and health related applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2107.
- Jacobs, S.E., Tobin, J.M., Opie, G.F., Donath, S., Tabrizi, S.N., Pirotta, M., & Garland, S. M. (2013). Probiotic effects on late-onset sepsis in very preterm infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics*, 132(6), 1055-1062.
- Jaimez-Ordaz, J., Martinez-Ramirez, X., Cruz-Guerrero, A. E., Contreras-Lopez, E., Ayala-Nino, A., Castro-Rosas, J., & González-Olivares, L. G. (2019). Survival and proteolytic capacity of probiotics in a fermented milk enriched with agave juice and stored in refrigeration. *Food Science and Technology*, 39(1), 188-194. <https://doi.org/10.1590/fst.41117>
- Jäkälä, P., & Vapaatalo, H. (2010). Antihypertensive peptides from milk proteins. *Pharmaceuticals*, 3(1), 251-272.
- Jarmołowska, B., Bukało, M., Fiedorowicz, E., Cieślińska, A., Kordulewska, N. K., Moszyńska, M., Swiatecki, A., & Kostyra, E. (2019). Role of milk-

derived opioid peptides and proline dipeptidyl peptidase-4 in autism spectrum disorders. *Nutrients*, 11(1), 87.

Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T., & Poutanen, K. (1998). Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(2), 175-181.

Jiménez Careaga, M. G. (2015). Superficies de respuesta mediante un diseño central compuesto. *Revista Varianza*, 11, 31-36.

Johnston B.C., Goldenberg J.Z., Vandvik P.O., Sun X., Guyatt G.H. (2011) Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database System Reviews*. (11).

Kameli Alamdari, E., & Ehsani, M. R. (2017). Antimicrobial peptides derived from milk: A review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 49-56.

Kent, N.L. (1987), Tecnología de los cereales: Introducción para estudiantes de ciencia de los alimentos y agricultura, 3ª edición, España, ACRIBIA. pp 28

Knuckles, B. E., Yokoyama, W. H., & Chiu, M. M. (1997). Molecular characterization of barley β - glucans by size - exclusion chromatography with multiple - angle laser light scattering and other detectors. *Cereal Chemistry*, 74(5), 599-604.

Kumari, P., & Vij, S. (2015). Growth and antimicrobial activity of proteolytic probiotic *Lactobacillus rhamnosus* C6 in soymilk and whey. *Indian Journal of Dairy Science*, 68(3).

Kumperscak, H. G., Gricar, A., Ülen, I., & Micetic-Turk, D. (2020). A pilot randomized control trial with the probiotic strain *Lactobacillus*

rhamnosus GG (LGG) in ADHD: Children and Adolescents Report Better Health-Related Quality of Life. *Frontiers in Psychiatry*, 11.

Lam, K. L., Keung, H. Y., Ko, K. C., Kwan, H. S., & Cheung, P. C. K. (2018). In vitro fermentation of beta-glucans and other selected carbohydrates by infant fecal inoculum: An evaluation of their potential as prebiotics in infant formula. *Bioactive carbohydrates and dietary fibre*, 14, 20-24.

Lazaridou, A., Serafeimidou, A., Biliaderis, C. G., Moschakis, T., & Tzanetakis, N. (2014). Structure development and acidification kinetics in fermented milk containing oat β -glucan, a yogurt culture and a probiotic strain. *Food Hydrocolloids*, 39, 204-214.

Lim, E. S. (2018). Preparation and functional properties of probiotic and oat-based synbiotic yogurts fermented with lactic acid bacteria. *Applied Biological Chemistry*, 61(1), 25-37.

Liu M, Bayjanov JR, Renckens B, Nauta A, Siezen RJ. (2010). The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* 297: 164-172.

Liu, Z., & Udenigwe, C. C. (2019). Role of food-derived opioid peptides in the central nervous and gastrointestinal systems. *Journal of food Biochemistry*, 43(1), e12629.

Martínez-Medina, G. A., Prado-Barragán, A., Martínez-Hernández, J. L., Ruíz, H. A., Rodríguez, R. M., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Péptidos Bio-funcionales: bioactividad, producción y aplicaciones. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 13(22).

Medved'ová, m. K. J. M. A., & Valík, e. Š. L. (2013). Cereals and pseudocereals as substrates for growth and metabolism of a probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Food and Nutrition Research*, 52(1), 25-36.

- Miller, S. S., Fulcher, R. G., Vincent, D. J., & Weisz, J. (1993). Oat β -glucans: An evaluation of eastern Canadian cultivars and unregistered lines. *Canadian journal of plant science*, 73(2), 429-436.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health-A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577-583.
- Nongonierma, A. B., O'keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2016). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In *Advanced Dairy Chemistry* (pp. 417-482). Springer, New York, NY.
- Oh, N. S., Lee, J. Y., & Kim, Y. (2016). The growth kinetics and metabolic and antioxidant activities of the functional synbiotic combination of *Lactobacillus gasseri* 505 and *Cudrania tricuspidata* leaf extract. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(23), 10095-10106. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7863-3>
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33.
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), 482-494. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>
- Park, Y. W., & Nam, M. S. (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: a review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 831.
- Pastar, I., Tonic, I., Golic, N., Kojic, M., Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Topisirovic, L., & Jovanovic, G. (2003). Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate

Lactobacillus rhamnosus BGT10. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5802-5811.

Pérez, N. R., Caballero, C. D., & López, E. R. (2016). Efecto hipocolesterolémico del consumo de avena (*Avena sativa*) en un grupo de adultos de Chaclacayo. *Revista Científica de Ciencias de la Salud*, 9(1), 51-60.

Pérez-Escalante, E., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Añorve-Morga, J., & González-Olivares, L. G. (2018). Antithrombotic activity of milk protein hydrolysates by lactic acid bacteria isolated from commercial fermented milks. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61.

Pizarro, S., Ronco, A., & Gotteland, M. (2014). Beta-glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? *Revista Chilena de Nutrición*, 41(4), 4339-446.

Planas, A. (2000). Bacterial 1, 3-1, 4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 361-382.

Rendon-Rosales, M. Á., Torres-Llenez, M. J., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Mazorra-Manzano, M. A., & Vallejo-Cordoba, B. (2019). In Vitro Antithrombotic and Hypocholesterolemic Activities of Milk Fermented with Specific Strains of *Lactococcus lactis*. *Nutrients*, 11(9), 2150.

Rodríguez-Hernández, G., & Chávez-Martínez, A. (2018). Actividad proteolítica y concentración peptídica en yogur de leche de cabra adicionado con probióticos. *Interciencia*, 43(1), 50-54.

Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, M., Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A., & González-Olivares, L. G. (2018). Proteolytic system of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 1581-1588.

- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 1-12.
- Sanz, Y., Collado, M. C., & Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*, 61(9), 476-482.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.
- Shu, G., Shi, X., Chen, L., Kou, J., Meng, J., & Chen, H. (2018). Antioxidant peptides from goat milk fermented by *Lactobacillus casei* L61: preparation, optimization, and stability evaluation in simulated gastrointestinal fluid. *Nutrients*, 10(6), 797.
- Sterna, V., Zute, S., & Brunava, L. (2016). Oat grain composition and its nutrition benefice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 252-256.
- Szajewska, H., Kołodziej, M., Gieruszczak-Białek, D., Skórka, A., Ruszczyński, M., & Shamir, R. (2019). Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for treating acute gastroenteritis in children—a 2019 update. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 49(11), 1376-1384.
- Tellez, A., Corredig, M., Brovko, L. Y., & Griffiths, M. W. (2010). Characterization of immune-active peptides obtained from milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Research*, 77(2), 129-136.
- Torres-Llanez, M. D. J., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. (2005). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 55(2), 111-117.

- Torres-Salas, V. (2014). Determinación de péptidos antihipertensivos, antitrombóticos y bacteriocinas durante la fermentación de leche con *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB 2772. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.
- Mejía, S. M. V., de Francisco, A., & Bohrer, B. (2020). A comprehensive review on cereal β -glucan: extraction, characterization, causes of degradation, and food application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-12.
- World Gastroenterology Organization (WGO) (2011). En: Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos (<http://www.worldgastroenterology.org>). 2011.
- Yáñez-Tisalema, G.D., (2016). Uso de distintos sustratos para el desarrollo de la biomasa bacteriana Tesis de Licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Yépez, B. C., Ballinas, A. M., Herrera, E. M. S., Lobato, A. C. Z., Hernández, I. C., Villanueva, A. L. A., & Brito, R. S. (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, (12), 133-144.
- Yoo, H. U., Ko, M. J., & Chung, M. S. (2020). Hydrolysis of beta-glucan in oat flour during subcritical-water extraction. *Food chemistry*. 308, 125670. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125670>
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: Conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*.

10 ANEXOS

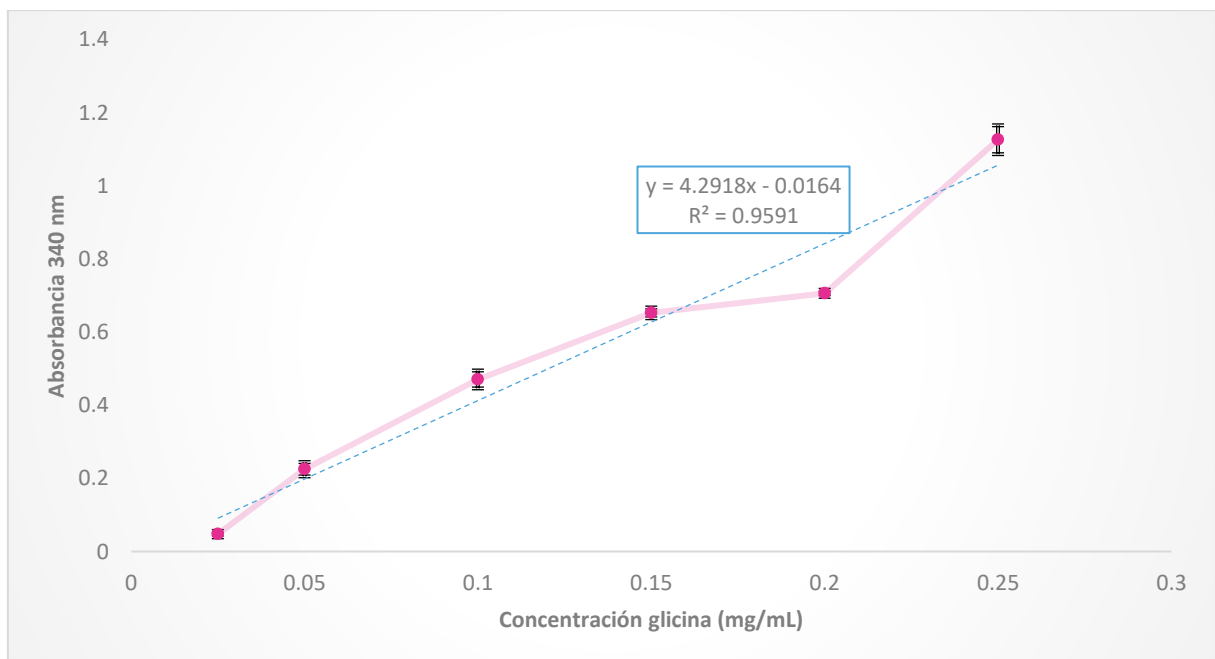
Anexo 1. Curva patrón glicina

Los datos obtenidos para la curva patrón de glicina son los presentados en la Tabla 10 Con los que se construyó la curva de la Figura 16

Tabla 10. Datos para la curva patrón de glicina

Glicina mg/ml	Abs1	Abs2	Prom
0.25	1.102	1.105	1.1035
0.2	0.711	0.709	0.71
0.15	0.66	0.663	0.6615
0.1	0.483	0.484	0.4835
0.05	0.235	0.235	0.235
0.025	0.052	0.05	0.051

Figura 16. Curva patrón TNBS





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00278

Matricula: 2183601598

Evaluación del efecto del β -glucano de avena en la producción de péptidos potencialmente bioactivos por *Lactobacillus rhamnosus* GG



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO
DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN RODRIGUEZ
DRA. MARIA AURORA PINTOR JARDINES
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIA ISABEL CHAVEZ DE LA VEGA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

Maria Isabel Chavez de la Vega
MARIA ISABEL CHAVEZ DE LA VEGA
ALUMNA

REVISÓ
Rosalía Serrano de la Paz
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

Sara Luján Camargoricalde
DRA. SARALUJAN CAMARGORICALDE

PRESIDENTA

Alma Elizabeth Cruz Guerrero
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

VOCAL

Francisco Javier Guzman Rodriguez
DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN
RODRIGUEZ

VOCAL

Maria Aurora Pintor Jardines
DRA. MARIA AURORA PINTOR JARDINES

SECRETARIO

Luis Guillermo Gonzalez Olivares
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella