

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Obtención de oligosacáridos a partir del mucílago de
Opuntia streptacantha y su caracterización química, física y
funcional”**

T E S I S

Que presenta

MÓNICA REYES REYES

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGIA**

Directora de Tesis:

Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez

CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2018

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el laboratorio de Toxicología de Alimentos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Zacatenco, bajo la dirección de la Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez por todo el apoyo y tutoría brindada durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya por la asesoría y consejos durante el desarrollo del presente trabajo y por todo su apoyo.

A la Dra. Lorena Rodríguez Páez por sus revisiones, críticas, sugerencias y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Fernando Esparza García por sus sugerencias y acertada revisión del trabajo

Al Dr. Graciano Calva Calva, por su apoyo profesional durante la realización de esta tesis.

A la Biól. María del Pilar Méndez Castejón por su apoyo y colaboración en el trabajo de laboratorio y por sus consejos brindados.

Al Ing. Miguel Márquez Robles por su apoyo brindado en el desarrollo del trabajo experimental.

Al Sr. Alejandro Aranda Olvera por todo el apoyo brindado dentro del laboratorio.

**La sustentante agradece al Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología (CONACyT) por la beca con registro número
203788.**

**Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología
(COMECyT) y a Soutech de México por el apoyo brindado.**

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Nopal (<i>Opuntia spp</i>).....	4
2.2 Oligosacáridos	7
2.2.1 Oligosacáridos no digeribles (OND)	9
2.3 Microbiota gastrointestinal	12
2.3.1 Microbiota colónica	13
2.3.1.1 Género <i>Lactobacillus</i>	14
2.3.1.2 Género <i>Bifidobacterium</i>	14
2.3.2 Efecto de OND en la microbiota colónica.....	15
2.3.3 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	16
2.4 Efecto prebiótico.....	18
2.5 Nutraceuticos y alimentos funcionales	19
2.6 Separación y purificación de oligosacáridos	20
2.6.1 Precipitación con disolventes	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL	25
5.1 Objetivos específicos.....	25
6. METODOLOGÍA	27
6.1 Etapa I: Extracción de mucílago de <i>Opuntia streptacantha</i> y obtención de oligosacáridos.....	28
6.1.1 Acondicionamiento de materia prima.....	28

6.1.2 Extracción del mucílago.....	28
6.1.3 Análisis químico proximal.....	29
6.1.3.1 Humedad.....	29
6.1.3.2 Cenizas.....	29
6.1.3.3 Fibra cruda	30
6.1.3.4 Nitrógeno total	31
6.1.3.5 Azúcares totales	33
6.1.4 Hidrólisis del mucílago de <i>Opuntia streptacantha</i>	33
6.1.4.1 Hidrólisis enzimática parcial.....	33
6.1.5 Obtención de oligosacáridos	35
6.1.5.1 Cromatografía de permeación en gel	35
6.1.5.2 Obtención de oligosacáridos con pesos moleculares menores a 1000 Da	35
6.2 Etapa II: Caracterización química y física de oligosacáridos	36
6.2.1 Análisis de oligosacáridos	36
6.2.1.1 Purificación de oligosacáridos	36
6.2.1.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC) de fracciones oligosacáridas	37
6.2.1.3 Grado de polimerización (GP) de las fracciones oligosacáridas	37
6.2.1.4 Análisis de la morfología de oligosacáridos.....	37
6.3 Etapa III: Caracterización funcional de oligosacáridos	37
6.3.1 Actividad prebiótica <i>in vitro</i>	38
6.3.1.1 Activación de las cepas probióticas LaA y LaC	38
6.3.1.2 Propagación y conservación de las cepas prebióticas	38
6.3.1.3 Activación, propagación y conservación de la cepa probiótica BiL.....	39
6.3.2 Crecimiento bacteriano.....	39
6.3.2.1 Medio de cultivo	39
6.3.2.2 Fermentación de las fracciones oligosacáridas.....	39
6.3.2.3 Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	40
6.3.2.4 Cuantificación de biomasa y determinación de pH	40
6.3.3 Actividad prebiótica <i>in vivo</i>	41
6.3.3.1 Selección de los animales	41

6.3.3.2	Formulación de los pellets	41
6.3.3.3	Estrategia experimental del ensayo <i>in vivo</i>	42
6.3.3.4	Recolección de muestras de ciego	42
6.3.3.5	Análisis de muestras de ciego	43
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
7.1	Extracción del mucílago.....	47
7.2	Análisis químico proximal.....	47
7.3	Contenido de carbohidratos (azúcares totales, AT) en el mucílago	49
7.4	Hidrólisis enzimática parcial	49
7.5	Cromatografía de permeación en gel	51
7.6	Obtención de oligosacáridos	52
7.6.1	Separación de oligosacáridos de 3 a 9 unidades	52
7.6.1.1	Tratamientos enzimáticos efectuados con α -amilasa	52
7.6.1.2	Tratamientos enzimáticos efectuados con dextranasa	54
7.7	Caracterización química y física de oligosacáridos	57
7.7.1	Purificación de oligosacáridos	57
7.7.2	Grado de polimerización (GP) de los oligosacáridos.....	62
7.3	Análisis de la morfología de las fracciones oligosacáridas seleccionadas	64
7.8	Estudios <i>in vitro</i>	65
7.8.1	Evaluación del crecimiento celular	65
7.9	Selección de la fracción oligosacárida para estudios <i>in vivo</i>	78
8.	CONCLUSIONES	85
9.	RECOMENDACIONES	88
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de <i>Opuntia</i> spp. Modificado de Anderson, 2001.	5
Figura 2. <i>Opuntia streptacantha</i> . http://www.desert-tropicals.com/Plants/Cactaceae/ (2018). ...	6
Figura 3. Carbono anomérico. Modificado de Mitch y Ikizler, 2012.	9
Figura 4. A) Enlace α -glicosídico, B) Enlace β -glicosídico, C) Estructuras propuestas de algunos oligofruetosacáridos. Modificado de Mitch y Ikizler, 2012 y Benkeblia, 2013.	10
Figura 5. Composición y concentraciones luminales de las especies microbianas dominantes en disrintas regiones del tracto gatrointestinal (TG). Modificado de Sartor, 2008.....	13
Figura 6. Estructuras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).	17
Figura 7. Cinética de hidrólisis total del mucílago de <i>Opuntia streptacantha</i>	49
Figura 8. Azúcares reductores obtenidos por los tratamientos de hidrólisis enzimática parcial bajo diferentes condiciones utilizando α -amilasa pancreática.	50
Figura 9. Azúcares reductores obtenidos por los tratamientos de hidrólisis enzimática parcial bajo diferentes condiciones utilizando dextranasa.....	51
Figura 10. Curva de calibración de GPC.....	51
Figura 11. Cromatogramas del mucílago de <i>Opuntia streptacantha</i> posterior a la hidrólisis enzimática parcial con α -amilasa pancreática. A) Tratamiento enzimático HE 1 (15UI-10 min), B) Tratamiento enzimático HE 3 (15UI-30 min), C) Tratamiento enzimático HE 5 (10UI-15 min), D) Tratamiento enzimático HE 7 (25UI-10 min), E) Tratamiento enzimático HE 8 (25UI-15 min), F) Tratamiento enzimático HE 9 (25UI-30 min).....	53
Figura 12. Cromatogramas del mucílago de <i>Opuntia streptacantha</i> posterior a la hidrólisis enzimática parcial con dextranasa. A) Tratamiento enzimático HE A (5 UI-10 min), B) Tratamiento enzimático HE B (5 UI-20 min), C) Tratamiento enzimático HE C (5 UI-30	

min), D) Tratamiento enzimático HE E (10 UI-20 min), E) Tratamiento enzimático HE I (15 UI-30 min).	55
Figura 13. Cromatogramas de la fracción OLI 9 de <i>Opuntia streptacantha</i> del tratamiento enzimático HE 9 (25UI-30 min, α -amilasa pancreática), posterior la precipitación secuencial selectiva con diferentes concentraciones de etanol A) 65-95% de etanol, B) 70-95% de etanol, C) 75-95% de etanol, D) 80-95% de etanol, E) 85-95% de etanol.....	58
Figura 14. Cromatogramas de la fracción OLII de <i>Opuntia streptacantha</i> en el tratamiento enzimático HE I (15UI-30 min, dextranasa), posterior la precipitación secuencial selectiva con etanol. A) 75-95% de etanol, B) 80-95% de etanol, C) 85-95% de etanol.	61
Figura 15. Micrografías en SEM por electrones secundarios de la fracción oligosacárida OLI9. a) 100X y b) 1000X.....	65
Figura 16. Cinética de crecimiento celular de LaC, (<i>Lactobacillus casei</i>) en presencia GLU (glucosa), INU (inulina), oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9)...	66
Figura 17. Variación del pH en el medio durante la cinética de crecimiento LaC, (<i>Lactobacillus casei</i>) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9).....	67
Figura 18. Ruta heterofermentativa Embden-Meyerhof-Parnas.	68
Figura 19. Producción de ácido láctico y AGCC por LaC (<i>Lactobacillus casei</i>) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9). A) Ácido láctico, B) Ácido acético, C) Ácido propiónico.....	69
Figura 20. Cinética de crecimiento celular de LaA (<i>Lactobacillus acidophillus</i>) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9).....	70
Figura 21. Variación del pH durante el crecimiento de LaA (<i>Lactobacillus acidophillus</i>) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9).....	71

Figura 22. Ruta fosfogluconato.....	72
Figura 23. Producción de ácido láctico por y AGCC por LaA (<i>Lactobacillus acidophillus</i>) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9). A) Ácido láctico, B) Ácido propiónico.....	73
Figura 24. Cinética de crecimiento celular de BiL (<i>Bifidobacterium lactis</i>) en presencia de diferentes fuentes de C. GLU (Glucosa), INU (Inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OS) (OLI1, OLI5 y OLI9).	74
Figura 25. Variación del pH durante el crecimiento de BiL (<i>Bifidobacterium lactis</i>) en presencia GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9).....	75
Figura 26. Esquema de la ruta bifida en <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> . Modificado de González-Rodríguez et al., 2013.....	76
Figura 27. Producción de ácido láctico, fórmico y AGCC por de BiL (<i>Bifidobacterium lactis</i>) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de <i>Opuntia streptacantha</i> (OLI1, OLI5 y OLI9). A) Ácido láctico, B) Ácido acético, C) Ácido Propiónico, D) Ácido fórmico. .	77
Figura 28. Población de bacterias presentes en heces de ratas Wistar sometidas a diferentes dietas (CON, MUC, INU-P y OLI-P) durante seis semanas. A) <i>Lactobacillus</i> spp, B) <i>Bifidobacterium</i> spp, C) <i>Clostridium</i> spp, D) <i>Bacteroides</i> spp.	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición y localización de oligosacáridos de origen vegetal	8
Tabla 2. Efectos y beneficios de los AGCC en el organismo	16
Tabla 3. Arreglo experimental de la hidrólisis enzimática parcial utilizando α -amilasa pancreática	34
Tabla 4. Arreglo experimental de la hidrólisis enzimática parcial utilizando dextranasa	34
Tabla 5. Concentraciones iniciales (C_i) y finales (C_f) de etanol utilizadas para la precipitación selectiva de fracciones oligosacáridas	36
Tabla 6. UFC/mL presentes en los inóculos de las cepas probióticas	40
Tabla 7. Composición química proximal del mucílago extraído de <i>Opuntia streptacantha</i> (OS)..	48
Tabla 8. Grado de polimerización de azúcares control.....	62
Tabla 9. Grado de polimerización de fracciones oligosacáridas purificadas.....	63
Tabla 10.- Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) ($\mu\text{mol}/100\text{ g heces}$) en contenido intestinal (ciego) de ratas Wistar alimentadas con diferentes dietas: CON, MUC, INU-P, OLI9-P; durante el estudio <i>in vivo</i>	83

ABREVIACIONES

AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AR	Azúcares reductores
AT	Azúcares totales
BiL	<i>Bifidobacterium animalis</i> subesp <i>lactis</i>
CON	Dieta control
GLU	Glucosa
GP	Grado de polimerización
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HE	Hidrolizado enzimático
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
INU	Inulina
INU-P	Dieta adicionada con Inulina comercial
LaA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LaC	<i>Lactobacillus casei</i>
MON	Fracción de azúcares de peso molecular entre 342 y 180 Da
MUC	Dieta adicionada con mucílago de <i>Opuntia streptacantha</i>
OLI	Fracción de azúcares de peso molecular entre 342 y 1000 Da
OLI-P	Dieta adicionada con la fracción oligosacárida purificada
OS	<i>Opuntia streptacantha</i>
PM	Peso molecular
POL	Fracción de azúcares de peso molecular mayores a 1000 Da
UFC	Unidades formadoras de colonia
V ₀	Volumen vacío (mL)
V _e	Volumen de elución (mL)
V _t	Volumen total (mL)

RESUMEN

Opuntia streptacantha (OS) es una especie nativa de México poco estudiada, cuyo mucílago presenta un contenido de 90 % de carbohidratos y valores de fibra dietaria soluble de 57.62%, además posee propiedades funcionales importantes. El objetivo de este estudio fue obtener oligosacáridos a partir del mucílago de OS, realizar su caracterización química, física y funcional. Para la obtención de oligosacáridos con grado de polimerización (GP) menor a 10, el mucílago se sometió a procesos de hidrólisis enzimática empleando α -amilasa pancreática y dextranasa de *Penicillium* sp. Se obtuvieron 18 tratamientos de los cuales, con base al porcentaje de azúcares reductores, solo los que presentaron diferencias significativas, fueron analizados por cromatografía de permeación en gel (GPC). De los tratamientos analizados, tres realizados con α -amilasa presentaron fracciones oligosacáridas con GP de 3, 4 y 5. Estas fracciones oligosacáridas se purificaron mediante precipitación secuencial selectiva con etanol. Una vez purificadas se evaluó el efecto prebiótico *in vitro* utilizando 3 cepas probióticas comerciales. Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* indicaron un potencial efecto prebiótico de las fracciones oligosacáridas, debido a que se encontró que los probióticos en presencia de estas fracciones mostraron un aumento en el crecimiento celular, una disminución de pH, así como la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Se seleccionó una fracción oligosacárida (GP=3) para la evaluación del efecto prebiótico *in vivo* empleando ratas Wistar. Los resultados obtenidos: aumento de bacterias benéficas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), así como disminución de bacterias potencialmente patógenas (*Clostridium* y *Bacteroides*), en el contenido colónico y la generación de AGCC, confirmaron el potencial efecto prebiótico de la fracción oligosacárida evaluada. Estos resultados indican que los oligosacáridos obtenidos a partir del mucílago de OS mediante vía enzimática, presentan un potencial efecto prebiótico y pueden emplearse como fuente natural de compuestos funcionales, con efectos directos en la microbiota intestinal.

ABSTRACT

Opuntia streptacantha (OS) is a species native barely studied to Mexico whose mucilage possesses functional properties and has a high content of soluble fiber of 57.62%. The aim of this study was to obtain oligosaccharides from the mucilage of OS and their chemical, physical and functional characterization. For the development of this work the mucilage of OS was extracted, and its chemical composition was determined, resulting more than 90% carbohydrate. To obtain oligosaccharides with a degree of polymerization, $DP < 10$, the mucilage was subjected to enzymatic hydrolysis using: α -amylase from porcine pancreas and dextranase from *Penicillium* sp. 18 treatments were obtained, those that showed minimal differences in the percentage of reducing sugars, were analyzed by GPC. From the treatments analyzed, three of the treatments with α -amylase generated oligosaccharide fractions with GP of 3, 4 and 5. These oligosaccharide fractions were purified by selective sequential ethanol precipitation. After these oligosaccharide fractions were purified, the prebiotic effect was evaluated *in vitro* using 3 commercial probiotic strains. The results obtained in the *in vitro* assays indicated a potential prebiotic effect of the oligosaccharide fractions, because probiotics in the presence of these fractions showed an increase in cell growth, a decrease in pH, as well as the generation of acids short chain fatty acid (SCFA). An oligosaccharide fraction (GP = 3) was selected for the evaluation of prebiotic effect *in vivo* using Wistar rats. The results obtained were an increase of beneficial bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and decrease of potentially pathogenic bacteria of the genus *Clostridium* and *Bacteroides* in the colonic content, as well as the generation of SCFA, which confirm the potential prebiotic effect of the oligosaccharide fraction evaluated. These results indicate that oligosaccharides from mucilage of OS obtained by enzymatic hydrolysis may have prebiotic effects and could be used as a natural source of functional compounds with direct effects on the intestinal microbiota.

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocoloides pueden ser considerados como un grupo de polímeros de cadena larga, principalmente carbohidratos, solubles en agua e insolubles en alcohol y otros disolventes orgánicos. La elevada solubilidad de estos compuestos se debe a la presencia de un gran número de grupos hidroxilo (-OH) a lo largo de la cadena compuesta por monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos. El uso de estos hidrocoloides en la industria de alimentos es muy variada y se basa en las características químicas, físicas y funcionales, de los mismos. Se emplean esencialmente para incrementar la viscosidad de un sistema y/o formar geles, así como para modificar o controlar la textura de alimentos y bebidas (BeMiller, 1996; Philips y Williams, 2000; Saha y Bhattacharya, 2010).

La mayoría de los hidrocoloides utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica son carbohidratos de origen vegetal y actualmente se ha incrementado el estudio de estos compuestos obtenidos a partir de fuentes vegetales no convencionales, los cuales pueden presentar propiedades funcionales de interés tanto a nivel alimentario como de salud. Dentro de las fuentes no convencionales se encuentra el mucílago de nopal cardón (*Opuntia streptacantha*), que en estudios previos (Reyes-Reyes, 2009) mostró ser una buena fuente de mucílago con una pureza mayor al 90%. Presentó un comportamiento reológico a concentraciones menores a 0.5% de un fluido Newtoniano y a concentraciones mayores a 1.0% de un fluido no Newtoniano, de tipo reofluidificante. A su vez, también presentó propiedades funcionales como capacidad de absorción de agua (CAA), capacidad de absorción de moléculas orgánicas (CAMO) y solubilidad (SOL) significativamente mayores a las que presentan los aditivos comerciales más utilizados en la industria de alimentos. Por ello en este estudio se propuso obtener oligosacáridos a partir del mucílago de *Opuntia streptacantha* los cuales pudieran llegar a actuar como prebióticos.

Gibson *et al.*, (2010) definió el término prebiótico como “*un ingrediente selectivamente fermentado que propicia cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficio(s) sobre las salud del huésped*”. Entre este tipo de compuestos se encuentran principalmente carbohidratos y oligosacáridos no digeribles (OND) los cuales presentan importantes propiedades físicas, químicas y fisiológicas benéficas, por ello su consumo es importante para la salud. Los OND pueden ser obtenidos al someter a carbohidratos complejos a procesos de hidrólisis ya sea mediante vía enzimática y/o ácida.

El objetivo de esta investigación fue obtener fracciones oligosacáridas de bajo peso molecular de OS y evaluar sus propiedades químicas, físicas y funcionales. Para ello, el estudio fue dividido en tres etapas, en la primera etapa se caracterizó químicamente el mucílago de *Opuntia streptacantha* y se establecieron condiciones de hidrólisis enzimática parcial para la generación de fracciones oligosacáridas menores a 10 unidades; las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía de permeación en gel (GPC). En la segunda etapa, se llevó a cabo la caracterización física y química de las fracciones oligosacáridas y en la etapa tres se evaluó la actividad prebiótica de dichas fracciones mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. La evaluación *in vitro* se efectuó utilizando 3 fracciones oligosacáridas y 3 probióticos comerciales, se determinó el crecimiento microbiano, la variación del pH y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). El ensayo *in vivo* se realizó utilizando como modelos experimentales ratas Wistar que fueron alimentadas con diferentes dietas, las cuales contenían mucílago de *Opuntia streptacantha* como fuente de fibra dietaria (MUC), una fracción oligosacárida (OLI), un prebiótico comercial (INU) y una dieta control (CON). Durante este ensayo se evaluó la modificación de la microbiota y la generación de AGCC en el contenido cecal.

2. ANTECEDENTES



2. ANTECEDENTES

2.1 Nopal (*Opuntia* spp)

El nopal (*Opuntia* spp) es una planta perteneciente a la familia de las cactáceas, es endémico de América y existen 377 especies reconocidas, 104 de las cuales se encuentran en México (Anaya-Pérez, 2001). Todas las variedades del género *Opuntia* son comestibles debido a que no presentan compuestos tóxicos para el ser humano. Sin embargo, algunas especies son más fáciles de utilizar que otras, debido básicamente al número de espinas que presentan. Cabe resaltar que los nopales silvestres desarrollan mayor cantidad de espinas, puesto que éste es su medio de defensa y supervivencia, mientras que las especies domesticadas, como *Opuntia ficus indica*, son variedades seleccionadas en función a una menor cantidad de espinas (Martínez, 2007). Como parte de sus adaptaciones a la vida en climas secos, el cuerpo de las *Opuntias* está constituido por un tallo columnar, ovalado o aplanado (cladodio), que está engrosado debido a que los tejidos de almacenamiento (parénquima) están muy desarrollados. Carecen de hojas para reducir la superficie de contacto con el ambiente y evitar la evotranspiración; en cambio, sobre sus tallos se presentan estructuras de aspecto algodonoso constituidas por tejido meristemático, de las que se desarrollan las flores y espinas, además de diversas fibras o vellos denominados tricomas. Debido a su origen las espinas son hojas modificadas que protegen contra depredadores, producen sombra y dan protección al tallo reflejando los rayos del sol, incluso pueden formar una coraza, la cual condensa la humedad y la dirige hacia las raíces (Figura 1)(Arreola, 1997; Arias et al., 2012).

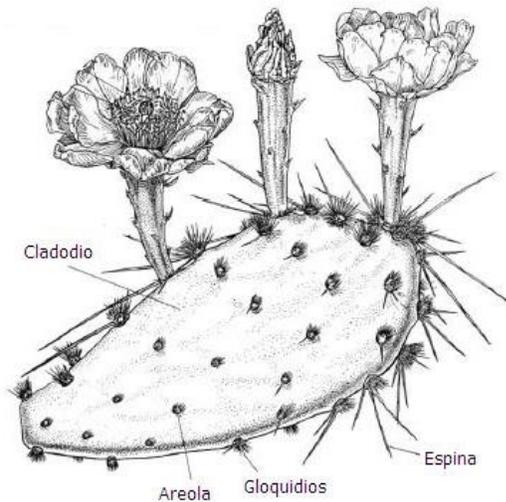


Figura 1. Esquema de *Opuntia* spp. Modificado de Anderson, 2001.

Los tallos o cladodios suculentos y articulados, comúnmente llamados pencas, presentan forma de raqueta ovoide o elongada alcanzando entre 60 a 70 cm de longitud, dependiendo de la especie, de la edad, del agua y de los nutrientes disponibles (Sudzuki et al., 1993). Cuando miden entre 10-12 cm son tiernos y se pueden consumir como verdura. La especie estudiada en este trabajo es *Opuntia streptacantha* (Figura 2) llamado comúnmente nopal cardón, cenizo o chaveño. Esta especie es arbustiva de 2 a 4 metros de alto con tallos de 80 cm de largo y 30 a 40 cm de diámetro. Los cladodios son de forma ovoide, verdes de 18-30 cm de largo y 14-18 cm de ancho. Las areolas presentan gloquidios de color rojo-amarillento. Presentan, en el cladodio, un número espinas de entre 3-7, erectas de color gris blanquecino tornándose oscuras con la edad, de 0.5-2 cm de largo. La flor es de color amarillo a anaranjado. Los frutos son ovoides de 6-7 cm de longitud y de 3.5-5 cm de diámetro, de color amarillo a rojo, con pequeños gloquidios. Se distribuyen generalmente en México en los Estados de Hidalgo, Guanajuato, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas (Lemaire, 1839 citado en Anderson, 2001; Arias et al., 2012). En los cladodios se realiza el proceso de fotosíntesis, debido a que los tallos modificados reemplazan a las hojas en esta función. Estos tallos se encuentran protegidos por una cutícula gruesa, que en

ocasiones está cubierta de cera o pelos que disminuyen la pérdida de agua, además de que poseen una gran capacidad para almacenar agua en los tejidos de reserva (parénquima medular); lo que permite a este tipo de plantas soportar largos periodos de sequía (Nobel et al., 1992). Cabe destacar que el hidrocoloide, denominado mucílago, presente en el parénquima medular es el que tiene la capacidad de retener agua (Nobel et al., 1992; Sáenz et al., 1992; Cárdenas et al., 1997)

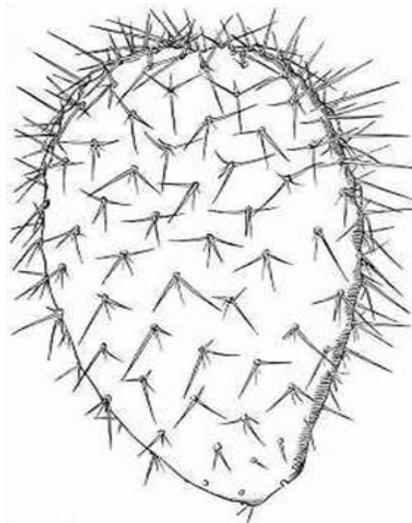


Figura 2. *Opuntia streptacantha*. <http://www.desert-tropicals.com/Plants/Cactaceae/> (2018).

La síntesis del mucílago, específicamente del género *Opuntia*, se lleva a cabo en el aparato de Golgi (Trachtenberg y Mayer 1982), el cual está compuesto por pequeños sáculos aplanados y apilados denominados dictiosomas (Dupree y Sherrier, 1998), en donde los azúcares que constituyen el mucílago se polimerizan (Trachtenberg y Fahn, 1981) y posteriormente se almacenan en las células mucilaginosas del parénquima medular del cladodio (Pimienta, 1990). Esto se ha demostrado citoquímicamente mediante el análisis de autorradiografías realizadas en células mucilaginosas de *Opuntia ficus indica* (Trachtenberg y Fahn, 1981).

Diversos autores han estudiado la composición química del mucílago de *Opuntia* spp, como Amin et al. (1970) quienes encontraron que el mucílago extraído de *Opuntia ficus indica* está conformado por arabinosa, ramnosa, xilosa y ácido galacturónico. Srivastava y Pande (1974) aislaron un polisacárido de los tallos de *Opuntia dillenii*, constituido por una cadena principal de galactosa con ramificaciones de arabinosa. Trachtenberg y Mayer (1981) reportaron que el mucílago extraído de *Opuntia ficus indica* está compuesto por arabinosa, galactosa, ramnosa, xilosa y ácido galacturónico.

2.2 Oligosacáridos

Los carbohidratos pueden ser clasificados de acuerdo a su peso molecular o a su grado de polimerización (GP, número de unidades de monosacáridos unidos) en tres principales grupos: azúcares, este término se emplea convencionalmente para describir mono y disacáridos (GP, 1-2); oligosacáridos (GP, 3-9) y polisacáridos (GP, >10) (Cummings y Stephen, 2007; Mussatto y Mancilla, 2007). Un gran número de oligosacáridos se encuentran de forma natural o son producidos por biosíntesis en diversos alimentos, principalmente en frutas, vegetales y granos (Tabla 1), como el caso de los galactooligosacáridos presentes en leche (Delzenne, 2003). Oligosacáridos con GP mayores a 5 como fructooligosacáridos de cadena corta, son obtenidos por la síntesis de sacarosa o la hidrólisis parcial de inulina (Roberfroid y Slavin, 2000). La inulina es una mezcla de cadenas oligómeras y poliméricas con un número variable de moléculas de fructosa, unidas por enlaces $\beta(2-1)$, que usualmente incluyen una molécula de glucosa al final de la cadena (Bayarri et al., 2011). Las longitudes de la cadena de inulina varían de 2 a 60 unidades con un GP promedio de 10 (Niness, 1999).

Tabla 1. Composición y localización de oligosacáridos de origen vegetal

Nombre	Composición	Fuente
Trisacáridos		
Maltotriosa	α -Glup (1→4)- α -Glup (1→4)- α -Glup	Producto de la degradación de almidón
Panosa	α -Glup (1→6)- α -Glup (1→4)- α -Glup	Compuesto presente en miel; producto de la degradación de amilopectina
Melecitosa	α -Glup (1→3)- β -Frup (2→1)- α -Glup	Compuesto presente en néctares de muchas plantas; en los exudados de árboles como lima, pino y álamo
Rafinosa	α -Galp (1→6)- α -Glup (1→2)- β -Frup	Compuesto presente en plantas particularmente en leguminosas como soya, garbanzos y chicharos
Erlasa	α -Glup (1→4)- α -Glup (1→2)- β -Frup	Compuesto presente en miel
Gencianosa	β -Glup (1→6)- α -Glup (1→2)- β -Frup	Compuesto presente en los rizomas de variedades de <i>Gentiana</i>
Tetrasacáridos		
Maltotetraosa	α -Glup (1→4)- α -Glup (1-4)- α -Glup (1→4)- α -Glup	Compuesto presente en hidrolizados de almidón
Estaquiosa	α -Galp (1→6)- α -Galp (1→6)- α -Glup (1-2)- β -Frup	Compuesto presente en semillas de legumbre, soya y alcachofa
Pentasacáridos		
Verbascosa	α -Galp (1→6)- α -Galp (1→6)- α -Galp (1-6)- α -Glup (1-2)- β -Frup	Compuestos presentes en semillas de legumbres, incluyendo guisantes

Glup= glucopiranososa, Frup= fructopiranososa, Galp= galactopiranososa

Modificado de Izydorczyk (2005)

Las propiedades funcionales de los oligosacáridos dependen de su estructura química y grado de polimerización. Por ejemplo, pueden alterar el punto de congelación, aumentar y proporcionar cuerpo a productos al modificar su viscosidad y funcionar como sustitutos de grasa (Voragen, 1998). La oligofruktosa es empleada en la elaboración de helados, debido a que el punto de congelación es menor en comparación al obtenido al emplear sacarosa (Murphy, 2001). Como sustitutos de grasa, se emplea comúnmente inulina debido a que posee la capacidad de formar microcristales, que interactúan entre sí, formando pequeños agregados que ocuyen una gran cantidad de agua y que finalmente pueden aglomerarse en una red de gel (Franck, 2002; Kaur y Gupta, 2002; Bot et al., 2004).

A su vez los oligosacáridos, basados en sus propiedades fisiológicas se pueden clasificar en digeribles y no digeribles (Sako et al., 1999).

2.2.1 Oligosacáridos no digeribles (OND)

El concepto de oligosacáridos no digerible (OND) se origina a partir del análisis de que el átomo del carbono anomérico (C1 o C2) (Figura 3) de los monosacáridos, que conforman los oligosacáridos, presentan una configuración que hace que sus enlaces glicosídicos no sean digeribles por la actividad hidrolítica de las enzimas digestivas (Roberfroid y Slavin, 2000) (Figura 4).

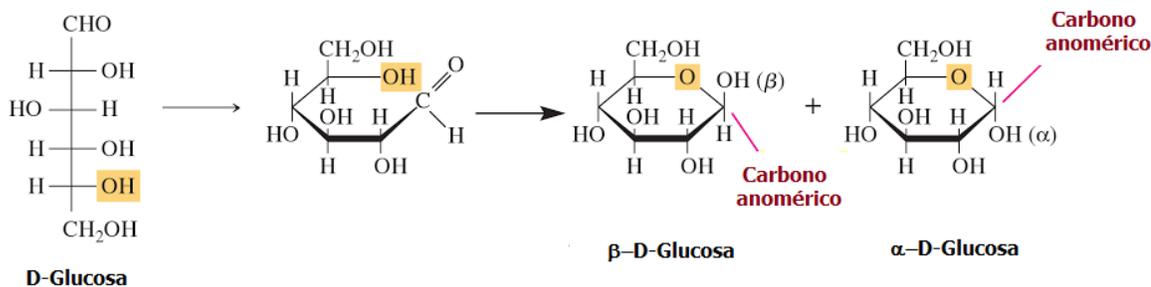


Figura 3. Carbono anomérico. Modificado de Mitch y Ikizler, 2012.

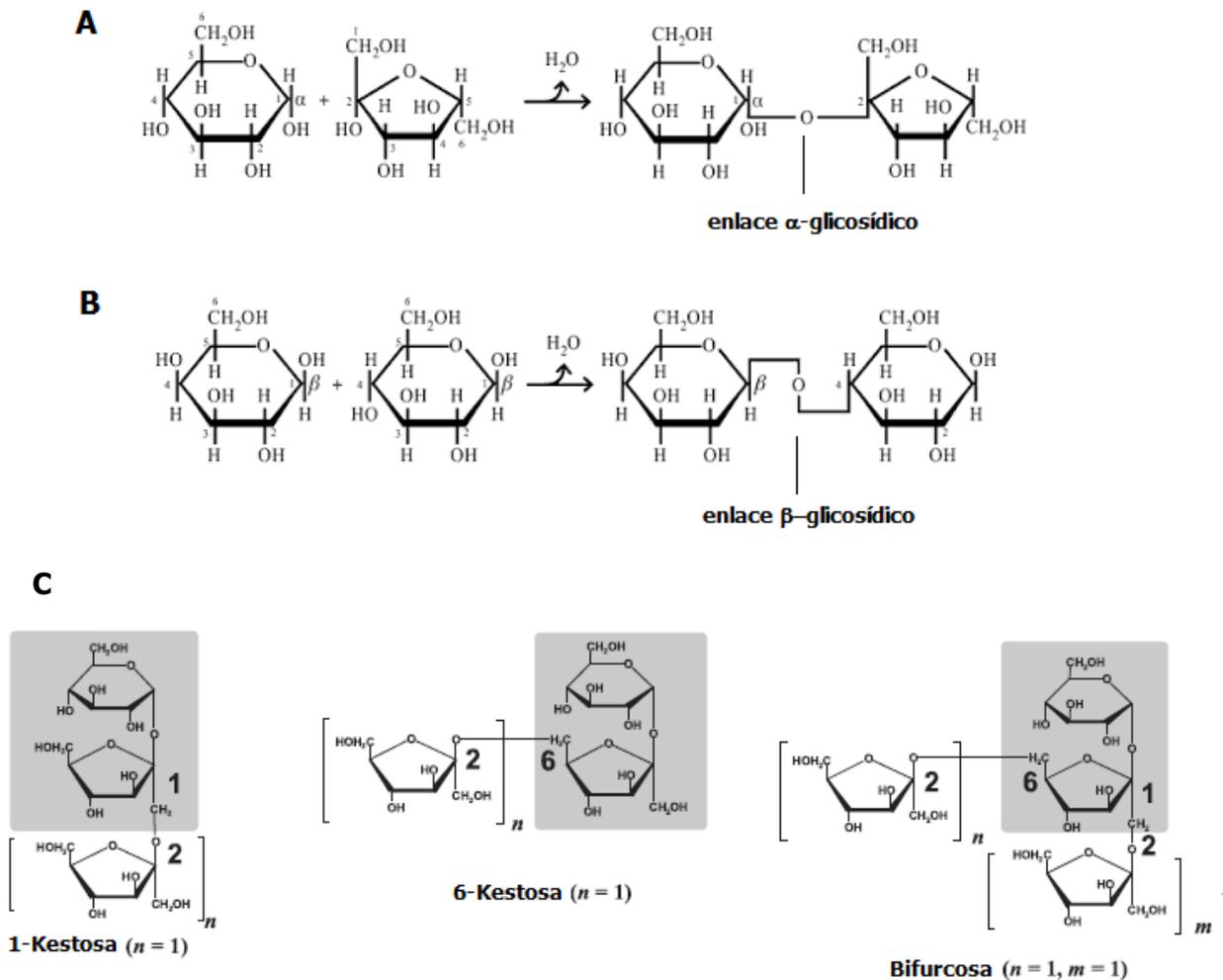


Figura 4. A) Enlace α -glicosídico, B) Enlace β -glicosídico, C) Estructuras propuestas de algunos oligofructosacáridos. Modificado de Mitch y Ikizler, 2012 y Benkeblia, 2013.

Los OND han tenido un gran interés debido a que presentan un reducido valor calórico, el cual ha sido estimado entre 1.0-2.0 kcal g⁻¹ (Roberfroid, Gibson y Delzenne, 1993; Cummings et al., 1997) esto es aproximadamente el 30-50% de los carbohidratos digeribles tales como la sacarosa. El valor calórico determinado para galactooligosacáridos es de 1.73 kcal g⁻¹ (Watanuki *et al.*, 1996 citado en Sako *et al.*, 1999). Así mismo los OND presentan propiedades bifidogénicas al estimular el incremento de bacterias benéficas en el intestino, principalmente del genero *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y al reducir el nivel de bacterias

patógenas principalmente del género *Clostridium* y *Bacteroides*, así como sus efectos de fibra dietaria al ser fermentadas en el colon y producir metabolitos como ácidos grasos de cadena corta (AGCC). (Roberfroid, 1993; Playne y Cittenden, 1996). Existen fuentes naturales de oligosacáridos como los galactooligosacáridos presentes en la leche humana, los fructanos encontrados en cebolla (*Allium cepa*), puerro o poro (*Allium porrum*) y ajo (*Allium sativum*), y la estaquiosa en la soya, entre otros. Debido a los beneficios que aportan, desde el punto de vista nutricional y funcional, se han aplicado diversos métodos para obtener y caracterizar nuevos oligosacáridos (Delzenne, 2003) que pudieran presentar propiedades de interés biológico, nutricional y/o nutracéutico, como la síntesis enzimática a partir de azúcares simples (monosacáridos) y/o hidrólisis ácida o enzimática de carbohidratos complejos (Murphy, 2001). Las cadenas cortas de fructo-oligosacáridos, pueden ser obtenidas a partir de la síntesis de moléculas de sacarosa, o a través de hidrólisis parcial de raíces de achicoria (*Cichorium intybus*) (Roberfroid y Slavin, 2000). Hu et al. (2006), a partir de agarosa y empleando α -amilasa y amiloglucosidasa, obtuvieron fracciones oligosacáridas con un grado de polimerización de entre 4 y 12; de Menezes et al. (2009), utilizaron xilanasas obtenidas a partir de *Pleurotus* sp y *Pleurotus taiandia* para hidrolizar xilana y generar xilooligosacáridos y xilosa. Otros hidrocoloides que han sido sometidos al fraccionamiento por vías enzimáticas son: alginato de sodio utilizando α -amilasa salival, pancreática y amiloglucosidasa; pectina cítrica de alto y bajo metoxilo empleando la enzima endo-poligalacturanasa, la cual rompe los enlaces glicosídicos internos en las cadenas de pectina de modo aleatorio (Oleano-Martin et al., 2002; Wang et al., 2006;). Alguno de los métodos de hidrólisis ácida que se emplean para la obtención de oligosacáridos, a partir de polisacáridos que estén constituidos esencialmente por azúcares neutros, como por ejemplo carragenanos y galactanos, es el uso de ácidos diluidos o concentrados como HCl, H₂SO₄, C₂HF₃O₂ o HNO₃, bajo condiciones de calentamiento entre 50 y 90°C (Delattre et al., 2005).

Como se mencionó anteriormente una característica importante de los OND es que cuando se ingieren son resistentes a la digestión por enzimas secretadas en el tracto gastrointestinal con actividad hidrolítica (α -glucosidasa, maltasa e isomaltasa). Los isomaltooligosacáridos presentan una buena resistencia cuando presentan un grado de polimerización mayor a 3 (Delzenne, 2003). Los oligosacáridos que en su mayoría logran escapar a la digestión en el tracto gastrointestinal superior, actúan como una fuente importante de energía para las bacterias residentes en el colon (microbiota colónica), debido a que presentan una configuración de enlaces β en la cadena glicosídica y ésta microbiota en específico, sintetiza enzimas como la β -fructosidasa, β -galactosidasa, xilanasas que pueden hidrolizar estos tipos de enlaces (Bernalier et al., 1999).

2.3 Microbiota gastrointestinal

El tracto gastrointestinal (TG) humano alberga una microbiota compleja la cual es crítica para un estado de salud normal (Tan et al., 2014). La superficie de la mucosa del TG humano es de aproximadamente 200-300 m² y esta colonizada por 10^{13-14} microorganismos de diferentes especies y subespecies (Hao y Lee, 2000). La prevalencia del género de bacterias en diferentes partes de TG depende de varios factores, como el pH, el peristaltismo, secreción de mucina, disponibilidad de nutrientes y dieta, entre otros (Tan et al., 2014). Debido los valores de pH del estómago y el rápido peristaltismo presente en el estómago, duodeno y yeyuno, en estas secciones solo se encuentra un reducido número de microorganismos (entre 10^2 - 10^4 bacterias/mL de contenido gástrico o intestinal), principalmente lactobacilos ácidotolerantes y estreptococos. En el íleon, la microbiota se asemeja a la del colon con una mayor diversidad de especies y una población alrededor de 10^7 - 10^8 bacterias/mL de contenido intestinal (Tannock, 1983). El contenido aumenta a 10^{11} - 10^{12} bacterias/mL en el ciego y colon (Sartor, 2008) (Figura 5).

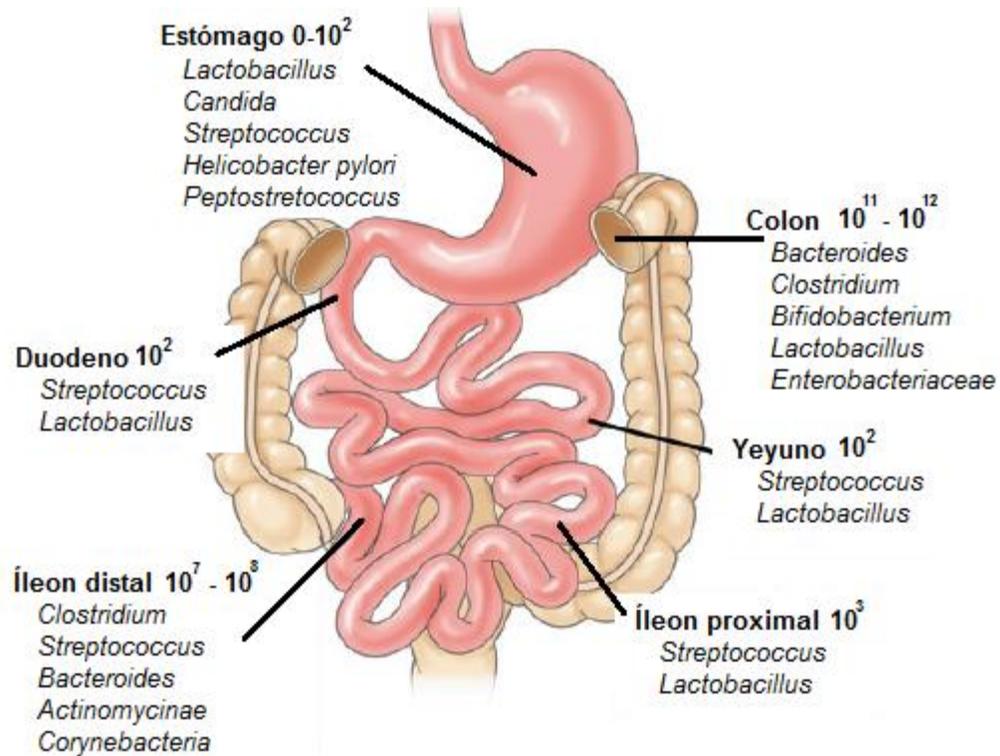


Figura 5. Composición y concentraciones luminales de las especies microbianas dominantes en distintas regiones del tracto gastrointestinal (TG). Modificado de Sartor, 2008.

2.3.1 Microbiota colónica

Las funciones biológicas del intestino grueso incluyen almacenamiento de desechos así como su excreción y la absorción de agua además de minerales. Debido a la cantidad de microorganismos residentes en este órgano, el colon tiene un papel muy importante en la nutrición y bienestar del huésped. La modulación dietética de la microbiota colónica puede ejercer efectos beneficiosos a nivel luminal y sistémico. La microbiota colónica fermenta una serie de sustancias, principalmente proporcionadas por la dieta, las cuales no pueden ser digeridas ni absorbidas directamente por el huésped en el TG superior. Dentro de ellas se encuentran: almidón resistente, fibra dietaria y oligosacáridos no digeribles (OND) entre otros (Manning y Gibson, 2004). Especies de bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se han asociado con una mejora en la salud del huésped, enfatizando su función y la

administración de la dieta que promueven el crecimiento de estas bacterias con funciones metabólicas definidas (Hijova y Chmelarova, 2007).

2.3.1.1 Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* contiene cerca de 110 especies las cuales están clasificadas en tres grupos: homofermentativo estricto, en donde al fermentar hexosa se produce únicamente ácido láctico, las pentosas no son fermentadas; heterofermentativo facultativo, donde como productos además del ácido láctico se genera ácido acético, etanol y ácido fórmico bajo limitación de glucosa; y el grupo heterofermentativo obligado produciendo, al fermentar hexosas: ácido láctico y acético, etanol y CO₂, pero al fermentar pentosas producen solo ácido láctico y acético (Amin et al., 2009). Éste género de bacterias están presentes en la microbiota humana del TG y son *Lactobacillus acidophilus* y *casei* las especies dominantes (Ahrné et al., 1998). *Lactobacillus acidophilus* es un bacilo Gram-positivo de 2-10 µm con temperaturas óptimas de crecimiento de 37 a 42 °C (Altermann et al., 2005). Ésta especie alcanza su mayor tasa de crecimiento en medios con valores de pH de 5.5-6.0 y el crecimiento decrece por debajo de un pH de 4.0 (Shah, 2007), es una bacteria heterofermentativa obligada y se encuentra dentro de los lactobacilos menos tolerantes al oxígeno (Claesson et al., 2007)

2.3.1.2 Género *Bifidobacterium*

El género *Bifidobacterium* pertenece a la clase *Actinomyces*, son bacterias Gram-positiva consideradas como bacterias ácido lácticas (Schleifer y Ludwig, 1996). Morfológicamente, no forman esporas y son de tamaño variables, aunque son consideradas como bacterias anaeróbicas, el grado de tolerancia de oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo (Doleyres y Lacroix, 2005). Las bifidobacterias pueden metabolizar un amplio rango de mono y disacáridos, así como también oligosacáridos (Schell et al., 2002), produciendo

teóricamente ácido láctico y acético en una relación 2:3 mediante la vía F6PPK (Doleyres y Lacroix, 2005). Estos microorganismos son considerados como probióticos, que al estar presentes en el TG ayudan a modular la microbiota, principalmente del colon, en donde pueden llegar a ejercer efectos benéficos para la salud, actuando como un factor de protección contra patógenos y estimulando el sistema inmunológico. Entre las especies que se han descrito: *Bifidobacterium animalis*, *breve*, *longum*, *bifidum* e *infantis* han sido las más estudiadas por sus efectos sobre la salud humana e incorporadas en productos lácteos y en preparaciones terapéuticas (Biavati y Mattarelli, 2001, Doleyres y Lacroix, 2005)

2.3.2 Efecto de OND en la microbiota colónica

Los OND son sustratos para la microbiota colonica, principalmente para bifidobacterias y lactobacilos, debido a que estas bacterias son capaces de metabolizarlos, provocando una inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (*Clostridium*, *Staphylococcus*, *Proteus* y algunos *Bacteroides*, *Enterococcus* y *Streptococcus*), al provocar la disminución del pH en el colon, resultado de la producción de AGCC (Mussatto y Mancilha, 2007). Las bacterias patógenas son a las que se le atribuyen la producción de sustancias potencialmente nocivas para el huésped, productos de la putrefacción, toxinas y carcinógenos, que pueden generar efectos perjudiciales como diarrea, infecciones, carcinogénesis y putrefacción intestinal entre otros (Gibson y Robertfroid, 1995; Gibson, 1998; Mussatto y Mancilha, 2007). Se ha evaluado el efecto del consumo de OND en la inhibición de patógenos y la disminución de compuestos y enzimas que juegan un rol importante en la carcinogénesis de colon, además de la generación de AGCC durante la fermentación de OND (Sako et al., 1999; van Dokkum et al., 1999; Johnson, 2004). Dentro de las enzimas que contribuyen a la producción de sustancias carcinogénicas en el colon se tienen la β -glucuronidasa, la nitroreductasa y la azoreductasa (Weisburger et al., 1970; Simon y Gorbach, 1986). Dos de los principales efectos benéficos que han sido estudiados en la microbiota son la producción de ácidos grasos de cadena corta

(AGCC), como algunos de los productos finales del proceso de fermentación de OND y la generación de un efecto prebiótico (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos y beneficios de los AGCC en el organismo

AGCC	Efecto específico	Beneficio
AGCC totales	Disminuye el pH	Reduce la biodisponibilidad de compuestos alcalinos citotóxicos Inhibición del desarrollo de organismos sensibles al pH
Ac. acético	Incremento potencial de la absorción de Ca^{2+} y Mg^{2+}	Disminución de la pérdida de Ca^{2+} y Mg^{2+} en heces
Ac. propiónico	Mejora la contracción muscular del colon	Efecto tipo laxante, ayuda al alivio de la constipación
	Estimula el transporte de electrolitos en el colon Aumenta la proliferación de las células colónicas epiteliales	Aumenta la absorción de iones y líquido; previene la diarrea Probablemente aumente la capacidad de absorción
Ac. butírico	Metabolizado por los colonocitos	Mantenimiento de la mucosa, ayuda a problemas de diverticulosis y las úlceras, proliferación de colonocitos
	Mantiene el fenotipo normal de colonocitos	Disminuye riesgos de enfermedad
	Estimula el transporte de electrolitos en el colon	Incrementa la absorción de iones y líquido, previene la diarrea

(Modificado de Topping, 1996)

2.3.3 Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Los AGCC son un subconjunto de ácidos grasos saturados que contienen seis o menos átomos de carbono y son los aniones primordiales producidos durante la fermentación de ciertos carbohidratos (fibra dietaria, OND, entre otros) por las bacterias presentes en el colon

(Hijova y Chmelarova, 2007; Tan et al., 2014). Los principales AGCC son ácido acético (C2), propiónico (C3) y butírico (C4) (Figura 6), pero otros metabolitos importantes producidos en la fermentación incluyen ácido láctico, succínico, etanol y ácido fórmico (Binder et al., 1994, Cummings, 1995; Cummings et al., 1995).

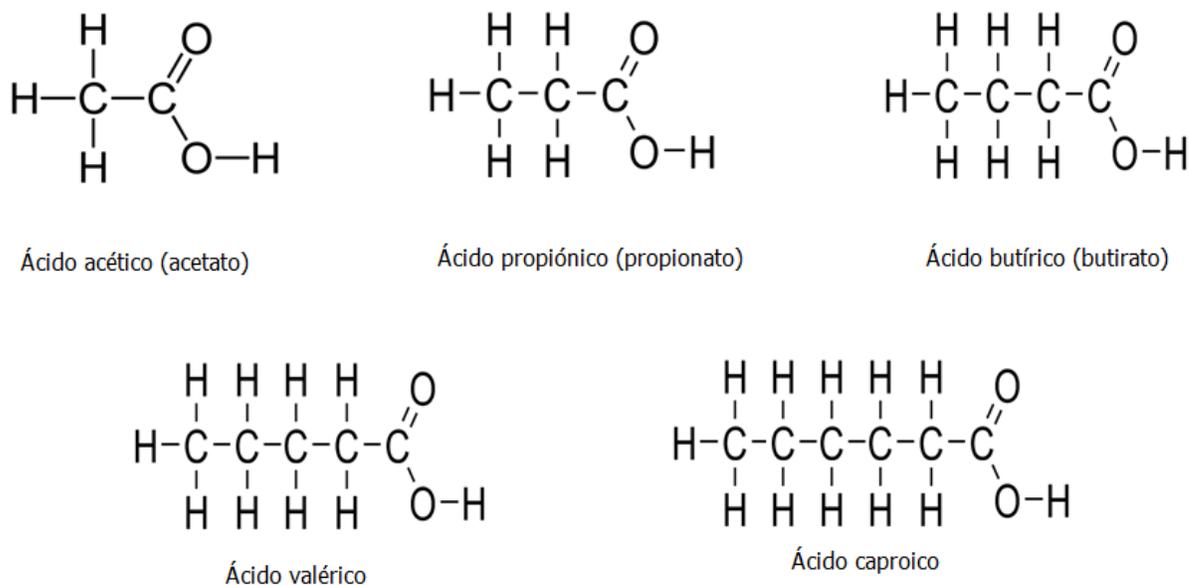


Figura 6. Estructuras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).
Modificado de Adom y Nie, 2013.

El principal sitio de la fermentación en el TG humano de carbohidratos no digeribles como los OND, es el ciego y el colon proximal (Hijova y Chmelarova, 2007). La cantidad y tipo de AGCC (Tabla 1) producidos en el colon dependen del tipo de OND que se consuman así como de la composición de la microbiota intestinal (Sako et al., 1999). Estos metabolitos ocasionan una disminución en el pH luminal influenciando directamente la composición de la microbiota colónica. Un pH bajo estimula el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias, las cuales están adaptadas a pH bajos; mientras que a un pH menor el crecimiento de bacterias patógenas es reducido. Además este cambio de pH está relacionado con la protección contra la carcinogénesis, es por ello que los AGCC juegan un papel muy importante en el

funcionamiento óptimo del epitelio colónico (Topping, 1996; Blaut, 2002). Los AGCC se absorben rápidamente en el ciego y el colon; solo un 5 a 10% se excretada en las heces. Una vez absorbidos son metabolizados principalmente en 3 tipos de células (Hijova y Chmelarova, 2007), estas son:

1. Células epiteliales colónicas. Utilizan butirato (ácido butírico) como principal sustrato para la obtención de energía.
2. Células hepáticas. Metabolizan el butirato (ácido butírico) residual y propionato (ácido propiónico) en la gluconeogénesis, también un 50 a 70% de acetato es metabolizado en el hígado.
3. Células musculares. Usan el acetato (ácido acético) residual para la obtención de energía.

2.4 Efecto prebiótico

Gibson et al. (2010) establecieron el término prebiótico como "un ingrediente selectivamente fermentado que propicia cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficios sobre la salud del huésped".

Para que un alimento o un ingrediente alimentario pueda ser considerado y/o clasificado como prebiótico es necesario:

1. No ser hidrolizado, ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal;
2. Actuar como sustrato para una o varias bacterias comensales benéficas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) para el colon, las cuales son estimuladas a crecer y/o activar su metabolismo;
3. Ser capaz de alterar la flora colónica en favor de una composición más saludable; e inducir efectos sistémicos o lumbales que sean benéficos para el organismo.

Estos criterios se han utilizado para determinar si un compuesto, ingrediente o alimento puede ser catalogado como prebiótico. Diversos estudios se han centrado en el potencial efecto prebiótico de los oligosacáridos y han sido evaluados *in vivo* e *in vitro*. Bouhnik et al. (1996) estudiaron el efecto de fructooligosacáridos de cadena corta en el cambio de la microbiota de personas adultas, encontrando que después de suministrar una dosis de 12.5 g/día durante 12 días que la población de bifidobacterias se incrementó cerca de 10 veces. Rao (2001), al proporcionar una dosis de inulina de 5 g/día por 3 semanas a personas jóvenes, observó un aumento de la población de bifidobacterias en heces. Oleano-Martin et al. (2002), estudiaron el efecto *in vitro* de la pectina y oligosacáridos pécticos en mezclas de *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides*, observando que el número de bifidobacterias se incrementó mientras que el de *Bacteroides* y *Clostridium* se mantuvo constante; además las bifidobacterias mostraron un crecimiento en presencia de oligosacáridos pécticos, indicando así que los oligosacáridos podrían tener un efecto prebiótico por no estimular el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas y promover el crecimiento de bacterias benéficas.

2.5 Nutraceúticos y alimentos funcionales

El término alimento funcional fue acuñado por primera vez en Japón en 1984 (Martirosyan y Singh, 2015). Actualmente la definición más aceptada por organizaciones internacionales es la propuesta por el Instituto de Tecnólogos de Alimentos, que define un alimento funcional como: "*sustancia que proporciona nutrientes esenciales a menudo más allá de las cantidades necesarias para el mantenimiento normal, crecimiento y desarrollo, y/u otros compuestos biológicamente activos que impartan beneficios a la salud o efectos fisiológicos deseables*" (Clydasdale, 2015). A medida que fue incrementado el interés en el estudio, desarrollo y aplicación de los alimentos funcionales se introdujo el concepto de nutraceútico (Martirosyan y Singh, 2015). El término nutraceútico está definido como, "*un alimento o parte del alimento que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de*

una enfermedad' (Das et al., 2012). Los nutraceuticos cubren la mayor parte de las áreas terapéuticas tales como trastornos del sueño, prevención de ciertos cánceres, control de colesterol, diabetes y problemas digestivos como tránsito lento, indigestión, estreñimiento, entre otros (Sami Labs, 2000; Pandey et al., 2010). Dentro de los compuestos usados como nutraceuticos y alimentos funcionales se encuentran: la fibra dietaria, probióticos, prebióticos, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, polifenoles y antioxidantes, entre otros (Kokate et al., 2002).

En las últimas décadas se ha incrementado la investigación y desarrollo en el campo de productos nutraceuticos y alimentos funcionales. La mayor necesidad científica se refiere a la estandarización de compuestos y estudios clínicos para proporcionar la base de sus propiedades y efectos en la salud humana y producir un impacto en los consumidores, así como en las empresas de alimentos (Das et al., 2012).

2.6 Separación y purificación de oligosacáridos

Se han desarrollado diversos métodos para separar y purificar oligosacáridos presentes en mezclas de carbohidratos, como es el uso de resinas de intercambio iónico, carbón activado, cromatografía de exclusión por tamaño o de permeación en gel, precipitación con disolventes y nanofiltración, entre otras (Goulas et al., 2003; Ku et al., 2003; Sanz y Martinez-Castro, 2007; Botelho-Cunha et al., 2010)

2.6.1 Precipitación con disolventes

El conocimiento y aplicación de las diferencias en la solubilidad de los compuestos presentes en una mezcla, permite la purificación de los mismos por el método de precipitación con solventes. Este método tiene ventajas como la factibilidad y los bajos costos al escalar los procesos (Sen et al., 2011). El uso de disolventes orgánicos, principalmente alcoholes, ha sido estudiado para el fraccionamiento y purificación de oligosacáridos. Cleemplit et al.

(1995) realizaron la purificación de la fracción soluble en agua de arabinosilanos extraídos de trigo, mediante la adición de etanol en diferentes concentraciones (20, 30, 40, 50 y 65 %), por su parte Swennen et al. (2005) empleando etanol en diversas concentraciones, 0-60, 60-90 y >90%, obtuvieron fracciones de arabinosilooligosacáridos con diferentes estructuras y pesos moleculares. También se han precipitado con alcohol (50 y 75%) maltodextrinas obtenidas a partir del almidón de papa (Defloor et al., 1998), oligoglucosas e inulinas (Ku et al., 2003) y galactosil-oligosacáridos (Sen et al., 2011). La precipitación de los polisacáridos con alcohol depende de la concentración de éste, ya que los polisacáridos no precipitan en presencia de disoluciones de etanol muy diluidas y también depende del peso molecular del carbohidrato a precipitar; debido a que compuestos de bajo peso molecular pueden precipitar en presencia de concentraciones altas de alcohol (Ku et al., 2003; Izydorczyk, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN



3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la industria de alimentos se ha enfocado en el desarrollo de productos que impartan beneficios a la salud del consumidor, además de ser aceptados organoléptica y visualmente. Es por ello que el estudio de compuestos o ingredientes nutraceúticos, así como la incorporación de éstos a matrices alimenticias son de gran importancia, debido a los beneficios que aportan a los consumidores. Dentro de este tipo de compuestos destacan los oligosacáridos no digeribles (OND) por las propiedades prebióticas que poseen como es modificar la microbiota colónica e inducir efectos benéficos a nivel sistémico y/o luminal. Las principales fuentes para la obtención de OND son carbohidratos complejos que pueden ser fraccionados mediante procesos hidrolíticos; por ello es de gran interés intensificar la búsqueda de nuevas fuentes naturales que puedan aportar propiedades importantes, respecto a los ya conocidos y que apoyen o fomenten el desarrollo sustentable de la industria de alimentos en México. *Opuntia streptacantha* es una especie silvestre abundante, nativa del altiplano mexicano y poco aprovechada. El mucílago presente en esta especie es una fuente alternativa de carbohidratos, el cual presenta un contenido de fibra dietaria mayor al 50%, lo que lo posiciona como candidato para la generación de nuevos OND con posibles efectos prebióticos.

4. HIPÓTESIS

5. OBJETIVOS

4. HIPÓTESIS

Con base a lo anterior expuesto y dada la importancia de la búsqueda de nuevas fuentes de OND con efecto prebiótico, se formularon las siguientes hipótesis:

H1: Es posible controlar el fraccionamiento del mucílago de *Opuntia streptacantha* empleando un proceso enzimático para producir compuestos con pesos moleculares específicos.

H2: Los oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* se comportarán como fracciones no digeribles con efecto prebiótico.

5. OBJETIVO GENERAL

Fraccionar el mucílago de *Opuntia streptacantha* para obtener oligosacáridos menores a 10 unidades y caracterizar sus propiedades químicas, físicas y prebióticas

5.1 Objetivos específicos

- Extraer y caracterizar el mucílago de *Opuntia streptacantha*
- Establecer condiciones para la hidrólisis parcial enzimática del mucílago
- Seleccionar e identificar fracciones de oligosacáridos de 3 a 9 unidades
- Realizar la caracterización química y física de las fracciones oligosacáridas
- Evaluar la actividad prebiótica *in vitro* e *in vivo* de las fracciones oligosacáridas seleccionadas

6. METODOLOGÍA



6. METODOLOGÍA

La materia prima utilizada fueron cladodios de *Opuntia streptacantha* a los cuales se les extrajo el mucílago. El polisacárido que compone al mucílago se sometió a análisis químico proximal y a procesos de hidrólisis enzimática parcial, para obtener oligosacáridos con un peso molecular menor a 1000 Da (9 monosacáridos) para su posterior caracterización química, física y funcional mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. El desarrollo del proyecto fue dividido en tres etapas.

Etapa I. Extracción de mucílago de *Opuntia streptacantha* y obtención de oligosacáridos

En esta etapa se acondicionaron los cladodios de OS eliminando la pared celular para obtener el parénquima medular. A partir del parénquima medular se realizó la extracción del mucílago y su caracterización química mediante un análisis químico proximal. Posterior a esto, se realizó la hidrólisis parcial enzimática empleando α -glicosidasas para obtener oligosacáridos menores a 1000 Da de peso molecular, estableciendo 18 tratamientos enzimáticos. Los tratamientos enzimáticos se analizaron por cromatografía de permeación en gel para determinar el perfil de pesos moleculares y seleccionar aquellas fracciones oligosacáridas que fueran menores a 1000 Da.

Etapa II. Caracterización química y física de oligosacáridos

A continuación se purificaron las fracciones oligosacáridas presentes en los tratamientos enzimáticos seleccionados mediante la precipitación secuencial selectiva con diferentes concentraciones de etanol. Se determinó el grado de polimerización de las fracciones oligosacáridas purificadas y su morfología mediante microscopía electrónica de barrido.

Etapa III. Caracterización funcional prebiótica de oligosacáridos

Se evaluó el efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo* de las fracciones oligosacáridas purificadas. Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo utilizando 3 cepas probióticas comerciales, un control prebiótico comercial (inulina) y una fuente simple de carbono (glucosa). Se analizó el crecimiento celular, pH y la producción de AGCC y ácido láctico. Para los estudios *in vivo* se utilizó como modelo biológico ratas Wistar las cuales fueron alimentadas durante 6 semanas, evaluando la modificación de la microbiota colónica durante la duración del estudio.

A continuación se describen detalladamente las etapas.

6.1 Etapa I: Extracción de mucílago de *Opuntia streptacantha* y obtención de oligosacáridos

6.1.1 Acondicionamiento de materia prima

Se recolectaron cladodios de *Opuntia streptacantha* de 2 años de edad en el valle de Apan, Hidalgo, en el mes de julio (verano del 2009). La edad de los cladodios se determinó mediante la observación de los anillos de crecimiento en la base de los mismos. Los cladodios frescos se limpiaron de espinas, posteriormente se les retiró mecánicamente el parénquima medular que se almacenó en congelación (Torrey, USA)(-20°C) para la posterior extracción de mucílago.

6.1.2 Extracción del mucílago

Para la extracción del mucílago se utilizó el parénquima medular. Las muestras se homogeneizaron con agua destilada (homogeneizador Osterizer, México) en relación 1:1.5. Posteriormente, se calentó la mezcla (90°C) y se centrifugó (centrifuga Hettich Zentrifugen, Alemania) a 10 000 rpm. Al sobrenadante se le adicionó etanol absoluto para obtener un precipitado, el cual se deshidrató para su posterior análisis químico proximal y la obtención de oligosacáridos.

6.1.3 Análisis químico proximal

Para llevar a cabo el análisis químico proximal se realizó una deshidratación en una estufa a 50°C (Boekel Scientific, USA) y una reducción del tamaño de partícula del mucílago (250 µm) en un molino de aspas (Janke & Kunkel, A10, Alemania).

6.1.3.1 Humedad

La humedad es la pérdida de masa que sufre un material cuando se calienta a la temperatura cercana al punto de ebullición del agua, durante un determinado tiempo. Para llevar a cabo la cuantificación de humedad del mucílago, se colocaron 500 mg en crisoles, a peso constante, en una estufa una temperatura de 90-95°C durante 5 h, posteriormente, los crisoles se enfriaron en un desecador y se pesaron (AOAC, 14.003, 1984). El porcentaje de humedad se calculó empleando la siguiente relación:

$$\% H = \frac{PI - PF}{PI - PC} \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

en dónde:

% H = Porcentaje de humedad

PI = Peso del crisol con muestra húmeda (g)

PF = Peso de crisol con muestra seca (g)

PC = Peso del crisol sin muestra (g)

6.1.3.2 Cenizas

El material mineral se cuantificó mediante la incineración de la muestra hasta la obtención de un residuo inorgánico correspondiente a la fracción de cenizas. La determinación de cenizas se efectuó en las muestras a las que previamente se les determinó el contenido de humedad,

pre-calcinándolas a fuego directo; posteriormente, se colocaron en una mufla a una temperatura de 550-600 °C por un lapso de 3-4 h (14.006, AOAC, 1984). El cálculo del contenido de cenizas se llevó a cabo empleando la ecuación 2:

$$\% C = \frac{B - A}{M} \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

en dónde:

% C = Porcentaje de cenizas

A = Peso del crisol vacío (g)

B = Peso del crisol con cenizas (g)

M = Peso de la muestra (g)

6.1.3.3 Fibra cruda

El tratamiento de las muestras desengrasadas con ácidos solubilizó completamente almidón, proteína, lignina y la mayor parte de la hemicelulosa, pero no afectó la celulosa, la cual se puede cuantificar después del tratamiento ácido, separándola por filtración. Para esta determinación se emplearon 500 mg de mucílago, previamente desengrasado y seco, los cuales se colocados en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 0.5 g de ácido tricloroacético, 1.25 mL de ácido nítrico concentrado y 17.5 mL de ácido acético al 70%. Este sistema se mantuvo a reflujo con agitación constante por 30 min. Enseguida, se filtró empleando crisoles Gooch (a peso constante), residuo obtenido se lavó con agua destilada caliente hasta eliminar por completo el ácido acético. El crisol Gooch se secó en una estufa a 90°C por 12 h y se pesó. La fibra cruda real se calculó restándole a la fracción retenida en el filtro, el contenido de cenizas insolubles, obtenidas por calcinación (Van de Kamer, 1952).

$$\% FC = \frac{(Pr - Pv) - (Pf - Pc)}{M} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

en dónde:

% FC = Porcentaje de fibra cruda

Pr = Peso del crisol Gooch con residuo (g)

Pv = Peso del crisol Gooch vacío (g)

Pf = Peso de crisol Gooch con fibra a peso constante (g)

Pc = Peso del crisol Gooch a peso constante (g)

M = Peso de la muestra

6.1.3.4 Nitrógeno total

La muestra se digirió con H_2SO_4 concentrado y un agente catalítico que favoreció la reacción convirtiendo todo el nitrógeno orgánico e inorgánico en nitrógeno amoniacal. El amonio se libero al agregar un álcali y destilando la muestra por arrastre de vapor en ácido bórico; con lo cual se forman los iones amonio y borato. La titulación se efectuó con ácido clorhídrico que en forma indirecta proporciona el contenido de nitrógeno. La cuantificación del contenido de nitrógeno total de las muestras se efectuó de la siguiente manera: se pesaron 50 mg de mucílago en un matraz Kjeldahl, adicionando 2 g de mezcla catalizadora y 2.5 mL de H_2SO_4 , esta mezcla fue digerida hasta que se clarificó manteniendo el calentamiento de 1.5 -2 h y se dejó enfriar. El residuo obtenido se disolvió en agua destilada y se transfirió a un tubo para su destilación, lavando el matraz de 2-3 veces. Subsecuentemente, en un matraz Erlenmeyer se colocaron 5 mL de la solución de ácido bórico al 5% con 2 gotas de indicador en la terminal del condensador. El tubo con la muestra, se colocó en el destilador y se adicionaron 10 mL de una solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio. Se procedió a la destilación por arrastre de vapor, colectando aproximadamente entre 75 y 100 mL de destilado. Esta solución se tituló con HCl 0.01N hasta que se observó un vire de color de verde a violeta.

Para cada determinación se utilizó un blanco de reactivos siguiendo el mismo procedimiento (42.014, AOAC, 1970). Los cálculos se llevaron a cabo de la siguiente forma:

$$\% N = \frac{(V_2 - V_1)(eqN)(N)}{M} \times 100 \quad \text{Ec. 4}$$

en donde:

% N = Porcentaje de nitrógeno total

V_1 = Volumen de HCl empleado en titular el blanco (mL)

V_2 = Volumen de HCl empleado en titular la muestra (mL)

eqN = 14.007

N = Normalidad de HCl (0.01 N)

M = Peso de la muestra (mg)

6.1.3.4.1 Proteína cruda

Para conocer el valor de proteína cruda a partir del contenido de nitrógeno total se empleó un factor, que varía según el origen de la proteína, en este caso se optó por utilizar el empleado para vegetales que está establecido en 5.7 (42.014, AOAC, 1970), efectuando los siguientes cálculos:

$$\% P = (\% N)(f) \quad \text{Ec. 5}$$

en dónde:

% P = Porcentaje de proteína

% N = Porcentaje de nitrógeno total

f = factor de conversión

6.1.3.5 Azúcares totales

Para determinar el contenido de azúcares totales en el mucílago, la muestra fue previamente hidrolizada con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M (Sigma-Aldrich, USA) (Clifford *et al.*, 2002). Se efectuó una cinética de hidrólisis ácida, en donde se cuantificaron los azúcares en estado reductor empleando el método de Miller (1959). Este método se fundamenta en que todos los azúcares reductores (AR) presentan un grupo aldehído o cetona libre, que actúan como agentes reductores frente a reactivos oxidantes como es el caso del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Como producto de la reacción entre los AR y el DNS, los AR se oxidan y forman un compuesto de color rojo marrón (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico), el cual presenta su máxima absorbancia a 575 nm. La intensidad del color desarrollado es proporcional a la cantidad de AR presentes en la mezcla de reacción.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado

6.1.4 Hidrólisis del mucílago de *Opuntia streptacantha*

6.1.4.1 Hidrólisis enzimática parcial

Para realizar la hidrólisis enzimática parcial se utilizaron 2 enzimas: α -amilasa pancreática (EC 3.2.1.1) (Sigma-Aldrich A3176) y dextranasa de *Penicillium* sp (EC 3.2.1.11) (Sigma-Aldrich D 4668). Como sustrato se usaron dispersiones de mucílago al 1%, de acuerdo a los siguientes arreglos experimentales (Tabla 3 y Tabla 4). La liberación de los azúcares reductores se determinó por el método de Miller (1959).

Tabla 3. Arreglo experimental de la hidrólisis enzimática parcial utilizando α -amilasa pancreática

Concentración de enzima (UI/mL)*	Tiempo (min)		
	10	15	30
15	1	2	3
20	4	5	6
25	7	8	9

*Buffer de fosfato de sodio 20 mM, 6.7 mM de NaCl, pH 6.9, 20 °C

Tabla 4. Arreglo experimental de la hidrólisis enzimática parcial utilizando dextranasa

Concentración de enzima (UI/mL)*	Tiempo (min)		
	10	20	30
5	A	B	C
10	D	E	F
15	G	H	I

*Buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH 6, 37 °C

6.1.5 Obtención de oligosacáridos

6.1.5.1 Cromatografía de permeación en gel

Para llevar a cabo la cromatografía de permeación en gel (GPC) se utilizó una columna C-10 (C 10/40, 10 x 400 mm, GE Healthcare, USA) empleando buffer de fosfato de sodio 20 mM recién preparado (pH 6.9) como fase móvil y como fase estacionaria Sephadex G-15 (Sigma-Aldrich, USA). Se determinó el volumen vacío (V_0) con 150 μ L de una disolución de Dextran azul (Sigma-Aldrich, USA) al 3%. La columna se calibró utilizando D-ribosa, D-glucosa, α -lactosa, Dextran 1000 (Sigma-Aldrich, USA) y acarbosa (Bayer, México) como estándares de peso molecular. Se monitoreó el volumen de elución de los estándares por el método de Luzon (1948) para la construcción de la curva de calibración.

6.1.5.2 Obtención de oligosacáridos con pesos moleculares menores a 1000 Da

Se inyectaron 100 μ L de los hidrolizados enzimáticos (HE) de mucílago de OS, obtenidos en los tratamientos enzimáticos, en la columna C-10 empleando buffer de fosfatos (20mM, pH 6.9) como fase móvil, operando a una velocidad de flujo de 0.21 mL/min. Se colectaron fracciones de un mililitro, en las que se cuantificó el contenido de azúcares totales (AT) por el método de Luzon (1948). El método se basa en la reacción química que se efectúa al estar en contacto el derivado hidroximetilfurfural, obtenido mediante la deshidratación de un azúcar (en medio ácido caliente), con antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno), para formar un compuesto de color verde con una absorción máxima a 630 nm (Hodge and Hofreiter, 1962). Los resultados obtenidos se utilizaron para la posterior obtención de los cromatogramas.

6.2 Etapa II: Caracterización química y física de oligosacáridos

6.2.1 Análisis de oligosacáridos

6.2.1.1 Purificación de oligosacáridos

Las fracciones oligosacáridas menores a 10 unidades fueron separadas de los HE mediante precipitación secuencial selectiva con la adición de etanol. En la primera etapa, el etanol se adicionó al HE hasta alcanzar una concentración inicial (C_i), de 65% (Tabla 5) (Cleemput et al., 1995; Ku et al., 2003; Swennen, et al., 2005). Una vez que se ajustó la C_i de etanol, la mezcla se mantuvo en agitación por 5 min, posteriormente se dejó en reposo toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para obtener un primer precipitado, en el cual se encuentran fracciones de polisacáridos y de oligosacáridos con pesos moleculares mayores a 1000 Da. En la segunda etapa de purificación al sobrenadante obtenido se le adicionó etanol absoluto para ajustar la concentración final (C_f) a 95% de etanol. Las muestras se sometieron a las mismas condiciones de agitación y reposo. Los precipitados obtenidos en las etapas mencionadas fueron analizados por cromatografía de permeación en gel (GPC).

Tabla 5. Concentraciones iniciales (C_i) y finales (C_f) de etanol utilizadas para la precipitación selectiva de fracciones oligosacáridas

C_i etanol (%)	C_f etanol (%)	Fracción oligosacárida
65	95	OLI ₆₅₋₉₅
70	95	OLI ₇₀₋₉₅
75	95	OLI ₇₅₋₉₅
80	95	OLI ₈₀₋₉₅
85	95	OLI ₈₅₋₉₅

6.2.1.2 Cromatografía de permeación en gel (GPC) de fracciones oligosacáridas

Para la selección del rango de concentración de etanol adecuado para purificar fracciones oligosacáridas con un PM menor a 1000 Da, se llevó a cabo el análisis por GPC de las fracciones oligosacáridas obtenidas mediante precipitación secuencial selectiva con etanol. Se trabajó con dispersiones al 0.4% (p/v) de cada fracción purificada, las cuales se inyectaron en una columna C-10 con Sephadex G-15 (Sigma-Aldrich, USA) como fase estacionaria, empleando agua destilada como fase móvil. Se inyectaron 200 µL de cada dispersión en la columna, operando a una velocidad de flujo de 0.18 mL/min. Se colectaron fracciones de un mililitro a las cuales se les determinó el contenido de AT por el método de Luzon (1948) para la posterior obtención de los cromatogramas.

6.2.1.3 Grado de polimerización (GP) de las fracciones oligosacáridas

Se determinó el GP de las fracciones oligosacáridas purificadas por precipitación secuencial selectiva con etanol, usando la metodología propuesta por Greenwood (1976), el cual emplea la relación entre AR y AT. Para ello se solubilizaron las fracciones a una concentración conocida (1000 µg/mL) y se determinó la presencia de AR y AT (Dubois *et al.*, 1956; Somogy, 1952), usando la ecuación 6:

$$GP = \frac{AT}{AR} \quad Ec. 6$$

6.2.1.4 Análisis de la morfología de oligosacáridos

Se realizó el análisis morfológico en muestras secas (liofilizadas) de las fracciones oligosacáridas purificadas. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*) HRSEM-AURIGA (Alemania). Las condiciones de operación fueron 1kV, como voltaje de aceleración, en modo de electrones secundarios.

6.3 Etapa III: Caracterización funcional de oligosacáridos

6.3.1 Actividad prebiótica *in vitro*

Para la evaluación de la actividad prebiótica *in vitro* de las fracciones purificadas se utilizaron tres probióticos comerciales: *Lactobacillus casei* (LaC), (BGP 93, C042584A, Sacco); *Lactobacillus acidophilus* (LaA), (LA-5[®], 3017523, Probio-Tech) y *Bifidobacteria animalis* subesp *lactis* (BiL), (BLC 1, C042753A, Sacco).

6.3.1.1 Activación de las cepas probióticas LaA y LaC

La activación de las cepas probióticas liofilizadas se realizó en matraces de 100 mL conteniendo 40 mL de medio TPY (pH 7): (g/L) peptona de caseína (10); peptona de soya (5); extracto de levadura (2.5); glucosa (5); tween 80 (polisorbato) (1); cisteína (0.5); K₂HPO₄ (2); MgCl₂ (0.5); ZnSO₄ (0.25); CaCl₂ (0.15); FeCl₃ (0.03). El medio fue esterilizado previo a la adición de la cepa probiótica liofilizada. Una vez adicionada la cepa, se incubó a 37°C bajo agitación (150 rpm) durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 5 mL y se adicionó en 50 mL de medio y se incubó por 48 h. Posteriormente se hizo una siembra masiva en cajas Petri (Agar TPY) e incubó por 48 h a 37 °C (Azaola et al., 1999; Mayorga-Reyes et al., 2009).

6.3.1.2 Propagación y conservación de las cepas probióticas

Las cepas probióticas activadas se recuperaron adicionando 1 mL de caldo TPY a las cajas Petri, este mililitro fungió como inóculo. Este inóculo se colocó en un matraz de 10 mL con caldo TPY y se incubó bajo las condiciones descritas anteriormente, para cada cepa. El siguiente paso fue tomar 5 mL del caldo de fermentación y adicionarlo a un matraz con 50 mL de caldo TPY, el cual se incubó por 24 h. Posteriormente, se le adicionó glicerol (30%) y se almacenaron a -70 C (Bustamante *et al.*, 2006; Mayorga-Reyes et al., 2009). Estas muestras sirvieron como inóculo para los ensayos *in vitro*.

6.3.1.3 Activación, propagación y conservación de la cepa probiótica BiL

Para la activación de la cepa BiL, se utilizó el medio de cultivo TPY descrito anteriormente usando botellas serológicas, bajo condiciones anaerobias, debido a que este género de bacteria es anaerobia estricta. Por ello, el medio de cultivo se burbujeó con CO₂ por un minuto (Mayorga-Reyes *et al.*, 2009) antes de adicionar la cepa liofilizada. Se incubó a 37 °C bajo agitación (150 rpm) durante 24 h. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se adicionó a una botella serológica con 50 mL de medio y se incubó por 48 h. Trascendido este tiempo, se realizó el tercer y último pase (5 mL) del caldo de fermentación a una botella serológica, se incubó por 24 h y se le adicionó glicerol (30%), para su conservación. Se tomó 1 mL de la suspensión en viales estériles que fueron almacenados a -70 °C (Azaola *et al.*, 1999; Mayorga-Reyes *et al.*, 2009). Estos viales mantuvieron el inóculo para los estudios *in vitro*.

6.3.2 Crecimiento bacteriano

6.3.2.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para llevar a cabo los ensayos *in vitro* fue el propuesto por Oleano-Martin *et al.* (2000 y 2002) (g/mL): agua peptonada, 2; extracto de levadura, 2; NaCl, 0.1; K₂HPO₄, 0.04; KH₂PO₄, 0.04; MgSO₄·7H₂O, 0.01; CaCl₂·2H₂O, 0.01; NaHCO₃, 2.0; HCl cisteína, 0.5; sales biliares, 0.5. A este medio (pH 7) (Rycroft *et al.*, 2001) se le agregó: Tween 80 (polisorbato) (2 mL); vitamina K1 (10 µL), y solución de hemina, 0.05; los carbohidratos que se emplearon como control fueron: glucosa, GLU (J.T. Baker, USA) e inulina de achicoria, INU (Orafti®GR) al 1%.

6.3.2.2 Fermentación de las fracciones oligosacáridas

Se estandarizó el método de Palframan *et al.* (2003). Se prepararon botellas serológicas con medio de cultivo adicionado con 1% (p/v) de las fracciones oligosacáridas purificadas, las

cuales fueron adicionadas con 1 mL de la suspensión bacteriana correspondiente (LaC, LaC y BiL), (Tabla 6) y se incubaron a 37°C bajo agitación constante (150 rpm) en condiciones anaerobias. Los controles (GLU e INU) fueron adicionados de igual manera. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (de 0 a 72 h) posterior a la inoculación, para realizar la cuantificación directa de biomasa (cuenta en placa), monitoreo de pH y análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Tabla 6. UFC/mL presentes en los inóculos de las cepas probióticas

Bacteria	UFC/mL
LaA	1.7×10^8
LaC	7.4×10^7
BiL	5.3×10^7

LaA (*Lactobacillus acidophilus*,), LaC (*Lactobacillus casei*), BiL (*Bifidobacteria animalis* subesp *lactis*)

6.3.2.3 Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Para la determinación de AGCC y ácido láctico producidos durante la fermentación, la muestra se centrifugó a 8000 rpm por 5 min, para remover las bacterias presentes. El análisis de AGCC se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna Aminex HPX-87H (BioRad, USA) y como estándares: ácido láctico, acético, propiónico y fórmico (Sigma-Aldrich, USA), utilizando como eluyente H₂SO₄ 0.005 M a 0.6 mL/min y 40°C. La longitud de onda empleada fue de 210 nm con un detector UV (Waters, 2996, USA), (Oleano-Martin et al., 2000; Palframan et al., 2003).

6.3.2.4 Cuantificación de biomasa y determinación de pH

La cuantificación de biomasa se llevó a cabo por el método directo de cuenta en placa (vaciado en placa), empleando agar MRS (Difco, USA), para el género *Lactobacillus* y agar

BSM (Difco, USA) para el género *Bifidobacterium*. Se tomó muestra cada 6 h de los fermentados control y problema (fracciones oligosacáridas purificadas). Se realizaron las diluciones correspondientes de las muestras tomadas a cada tiempo y se inocularon en cajas Petri. Las placas Petri inoculadas se incubaron a 37°C por 72 h. El pH se determinó a cada muestra utilizando un potenciómetro (Radiometer analytical, Pioneer 10, Francia).

6.3.3 Actividad prebiótica *in vivo*

6.3.3.1 Selección de los animales

El estudio se realizó con ochenta y cuatro ratas macho Wistar (120 ± 20 g, 6 semanas de edad) proporcionadas por el Bioterio del CINVESTA-IPN unidad Zacatenco, las cuales fueron alojadas individualmente en jaulas suspendidas bajo condiciones controladas (temperatura 25 °C, ciclos de luz-oscuridad de 12 h c/u y acceso libre a agua) (Bielecka et al., 2002; Wang et al., 2006). Las ratas se mantuvieron en un periodo de adaptación de 7 días (Semana 0) antes de iniciar el estudio. Durante este periodo fueron alimentadas con dieta especial para roedores proporcionada por el Bioterio (Labdiet 5008, Purina) y con pellet control (CON).

6.3.3.2 Formulación de los pellets

Se utilizaron 4 formulaciones diferentes de *pellets*, cada uno con un peso de 1 gramo, nombrados de la siguiente manera:

- 1.- CON: Control. Elaborado únicamente con grenetina (Pagsa 11) al 7% p/v.
- 2.- OLI-P: Conteniendo grenetina (7% p/v) como vehículo y con la fracción oligosacárida purificada seleccionada previamente en los estudios *in vitro*. La concentración utilizada de la fracción fue variable durante todo el estudio, ya que se dosificó de acuerdo a la variación del peso corporal del individuo de estudio, tomando como referencia los valores de IRD de la FAO de 20 g/día por kg de peso corporal.

3.- INU-P. Con grenetina (7% p/v) como vehículo e INU (Orafti®GR), la cual también varió la concentración considerando la variación del peso corporal a un consumo igual al del pellet OLI, teniendo como referencia los valores de IRD de la FAO de 20 g/día por kg de peso corporal.

4.- MUC-P: Grenetina (7% p/v) como vehículo y mucílago de OS al 5%, en función del peso corporal inicial (120 ± 20 g). De igual forma se consideró como referencia los valores de IRD de la FAO de 30 g/día por kg de peso corporal. Esta concentración de mucílago se usó durante todo el estudio, debido a que a mayores concentraciones se encontraron problemas en la solubilidad de este hidocoloide.

6.3.3.3 Estrategia experimental del ensayo *in vivo*

Las ratas fueron divididas en 4 grupos con 21 ratas cada uno y fueron alimentadas (10% en función del peso corporal) con dietas especiales para roedores y con *pellets* específicos para cada grupo: CON, OLI-P, INU-P, MUC-P.

La duración del protocolo experimental fue de 6 semanas, en las cuales se sacrificaron 3 individuos del estudio por grupo cada semana.

6.3.3.4. Recolección de muestras de ciego

Transcurrido el tiempo establecido en el protocolo para cada grupo, se sacrificaron 3 individuos de estudio mediante una inyección de pentobarbital de sodio (PiSA, México) (Le Blay et al., 1999). Se removió inmediatamente el ciego (parte que comunica al intestino delgado con el grueso, tiene forma de saco) con sumo cuidado de no acarrear grasa y/o parte del mesenterio. Posteriormente el contenido del ciego se utilizó para los análisis correspondientes.

6.3.3.5 Análisis de muestras de ciego

El contenido del ciego, para su análisis, se dividió en 2 partes:

a) para la determinación de bacterias: la muestra fue inmediatamente homogeneizada con agua peptonada al 1%. Posteriormente se realizó una serie de diluciones para análisis microbiológico. Se utilizó un medio selectivo para el recuento de *Lactobacillus* sp (MRS agar, Difco, USA), Bile Esculin Agar (Difco, USA) para bacteroides, BSM (Fluka, USA) agar para bifidobacterias y Reinforced Clostridial Agar (Fluka, USA) para el recuento de *Clostridium*. Las siembras se efectuaron por triplicado, en cajas Petri, usando como inóculo 100 µL de las respectivas diluciones. Las cajas se incubaron bajo condiciones anaerobias a 37 °C por 72 h (Le Blay et al., 1999; Bielecka et al., 2002; Wang et al., 2006). Después de transcurrido el tiempo de incubación, las colonias fueron contadas y expresadas como UFC/g heces (unidades formadoras de colonias/gramo de contenido fecal);

b) para la determinación de ácido láctico y AGCC: la muestra se centrifugó a 8000 rpm por 60 min a 4 °C utilizando filtros Amicon® Ultra (Milipore, USA) de un volumen de 500 µL, de un rango de peso molecular de 3000 Da para remover las bacterias presentes. A continuación se recolectó el sobrenadante para su análisis en HPLC de acuerdo a las condiciones establecidas previamente, usando como estándares, ácido láctico, acético, propiónico y fórmico (Sigma-Aldrich, USA), (Oleano-Martin et al., 2000; Palframan et al., 2003).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta investigación se presentan de acuerdo al orden descrito en el capítulo de metodología.

7.1 Extracción del mucílago

El rendimiento del mucílago de OS obtenido a partir del parénquima medular fue de 1.14 ± 0.5 % en base húmeda y 19.01 % en base seca. Los rendimientos reportados en estudios anteriores (Reyes-Reyes, 2009) con la misma especie de *Opuntia* fueron de 1.05 ± 0.08 % en base húmeda y 18.81% en base seca, lo que confirma que los rendimientos en esta especie se encuentran dentro de un mismo intervalo independientemente del año de cosecha, esto puede deberse a que la materia prima fue recolectada bajo las mismas condiciones en cuanto edad y temporada (verano), así como el método de extracción. Los rendimientos reportados en diversos estudios, para distintas variedades de *Opuntia*, partiendo del cladodio completo o de la cáscara del mismo y empleando diferentes métodos de extracción oscilan, entre 0.07 y 1.6 % en base húmeda (Cárdenas, 1997; Sáenz et al., 1997; Sepúlveda et al., 2007; Abraján-Villaseñor, 2008). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, el rendimiento de extracción del mucílago de OS es comparable con el de otras variedades de este tipo de cactáceas, posicionándose en los límites superiores, considerándose así una buena fuente de obtención de mucílago.

7.2 Análisis químico proximal

La harina resultante presentó una humedad de 9.275 ± 0.233 %. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos, en donde el extracto etéreo mostró un valor de 0.24 ± 0.05 %. En cuanto a los demás componentes, el que predominó con más de un 90% fueron los carbohidratos y en menor cantidad, en orden decreciente: cenizas, proteínas y fibra cruda.

Abraján-Villaseñor (2008), realizó AQP en mucílago obtenidos por distintos métodos de extracción, empleando cladodios completos de *Opuntia ficus-indica*, obteniendo 75 % de carbohidratos y un alto contenido de cenizas (alrededor del 25 %). Por su parte, Sepúlveda et al. (2007) reportaron mayores valores de cenizas (39.3 %) disminuyendo el contenido de azúcares. Estas diferencias tan marcadas en el contenido de carbohidratos y cenizas dependen primordialmente del uso del cladodio completo para la obtención del mucílago. Estos autores no describen claramente el método de extracción del mucílago, ni otros factores como la edad del cladodio, la variedad y el tipo de suelo del cultivo. En esta tesis se trabajó con el parénquima medular, que es en donde se lleva a cabo la síntesis del mucílago y se eliminó la epidermis del cladodio para evitar o eliminar impurezas por lo que se obtuvo un mucílago con alta pureza con un contenido mayor al 90% de carbohidratos.

Tabla 7. Composición química proximal del mucílago extraído de *Opuntia streptacantha* (OS)

(Porcentaje de materia seca)

COMPONENTE	%
Extracto etéreo	0.24 ± 0.05
Cenizas	3.458 ± 0.233
Proteína	1.779 ± 0.107
Fibra cruda	0.099 ± 0.017
Carbohidratos	94.592 ± 0.810

7.3 Contenido de carbohidratos (azúcares totales, AT) en el mucílago

En la Figura 7 se observa la cinética de hidrólisis ácida del mucílago de OS a partir de la cuantificación de AT, utilizando el método propuesto por Clifford *et al.* (2002). Se puede apreciar que el porcentaje de AR se incrementó al aumentar el tiempo de hidrólisis, obteniéndose como máximo un 94.592 ± 0.810 % (BS) . A partir del minuto 180 el contenido de AR se mantuvo constante.

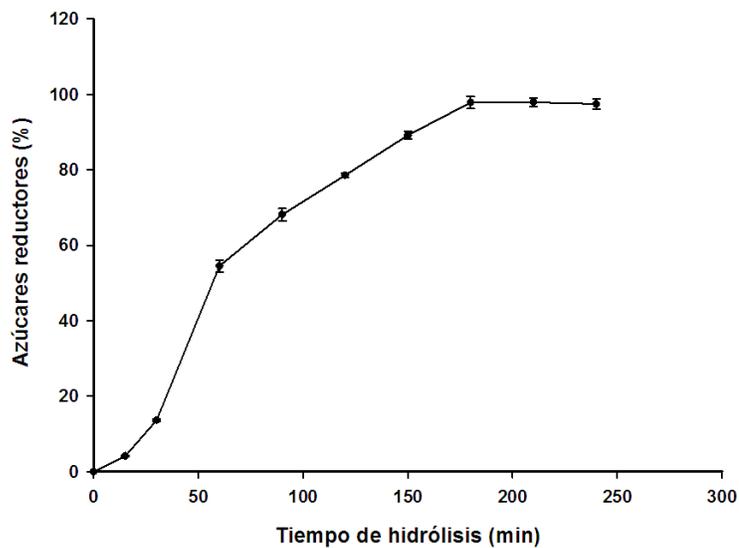


Figura 7. Cinética de hidrólisis total del mucílago de *Opuntia streptacantha*.

7.4 Hidrólisis enzimática parcial

Los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática parcial se analizaron estadísticamente aplicando la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95% ($\alpha=0.05\%$), observando que el porcentaje de AR aumentó al incrementar las condiciones de hidrólisis (tiempo y concentración de enzima, Tabla 3 y 4). En la Figura 8 se presentan los AR obtenidos en los tratamientos con α -amilasa, en donde HE 8 y HE 9 (20 y 25 % de AR) presentaron una mayor cantidad de AR. Los tratamientos enzimáticos que produjeron menos AR fueron los HE 1, HE 2 y HE 4, los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos. En cuanto a los tratamientos enzimáticos efectuados con dextranasa (Figura 9) se puede observar que los

tratamientos en los cuales el tiempo de reacción fue de 10 min (HE A, HE D y HE G) se obtuvo aproximadamente un 3% de AR, sin presentar diferencias significativas entre ellos, a pesar de que las concentraciones de la enzima son diferentes (5, 10 y 15 UI, respectivamente). Las concentraciones mayores de AR la presentaron los tratamientos HE E, HE F, HE H y HE J.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la hidrólisis parcial enzimática con α -amilasa, se analizaron por CPG los tratamientos: HE 1 (15 UI-10 min), HE 3 (15 UI-15 min), HE 5 (20 UI-15 min), HE 7 (25 UI-10 min), HE 8 (25 UI-15 min) y HE 9 (25 UI-30 min) debido a que presentaron diferencias significativas en la cantidad de AR liberados. Con respecto a los AR obtenidos en la hidrólisis enzimática parcial utilizando dextranasa (Figura 9), se determinó el perfil de pesos moleculares obtenidos de los tratamientos: HE A (5 UI-10 min), HE B (5 UI-20 min), HE C (5 UI-30 min), HE E (10 UI-20 min) e HE I (15 UI-30 min).

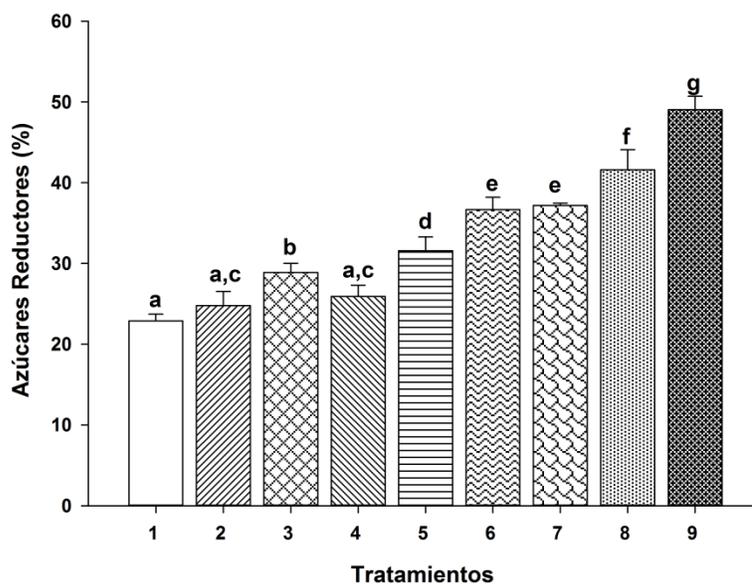


Figura 8. Azúcares reductores obtenidos por los tratamientos de hidrólisis enzimática parcial bajo diferentes condiciones utilizando α -amilasa pancreática.

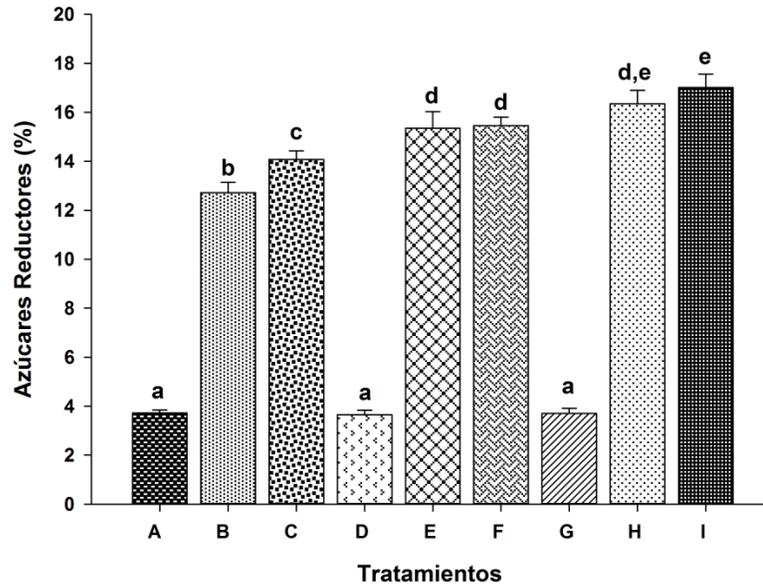


Figura 9. Azúcares reductores obtenidos por los tratamientos de hidrólisis enzimática parcial bajo diferentes condiciones utilizando dextransasa.

7.5 Cromatografía de permeación en gel

En la Figura 10 se presenta la curva de calibración para la columna C-10 empacada con Sephadex G-15. Con base a esta curva se determinó el volumen vacío (V_0) correspondiente a 11 mL, así como el volumen total (V_t) de 26 mL.

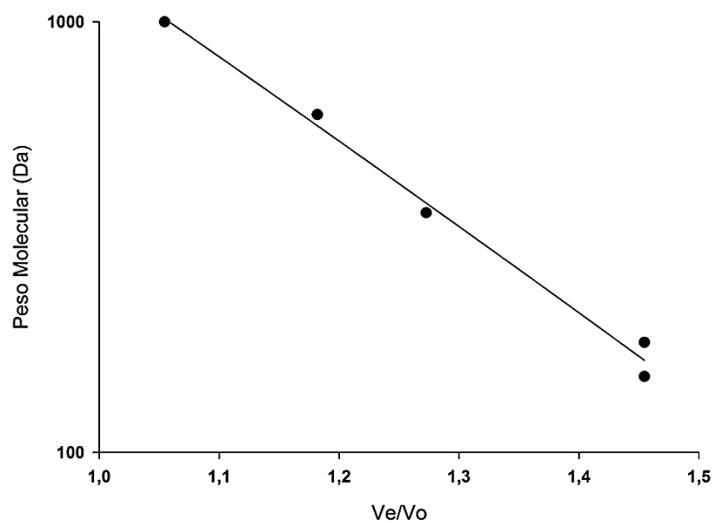


Figura 10. Curva de calibración de GPC.

La relación de volumen de elución (V_e) y peso molecular (PM) fue utilizada para el establecimiento y obtención de 3 fracciones las cuales fueron denominadas: POL (5-11 mL), la cual comprendió fracciones de peso molecular mayores a 1000 Da; OLI (11-14 mL), en la que presentaron fracciones de pesos moleculares de oligosacáridos que varían entre 1000 a 342 Da y MON (14-23 mL), en donde compuestos de peso molecular presentes son mono y disacáridos (180 y 342 Da).

7.6 Obtención de oligosacáridos

7.6.1 Separación de oligosacáridos de 3 a 9 unidades

7.6.1.1 Tratamientos enzimáticos efectuados con α -amilasa

Se determinó la concentración de AT de los HE seleccionados previamente durante todo el V_e de la GPC. Con base a las fracciones establecidas POL, OLI y MON, se obtuvieron los cromatogramas correspondientes para cada HE. En el HE 1 (15 UI-10 min) (Figura 11), la fracción predominante es la de OLI (35 $\mu\text{g/mL}$ AT) en menor proporción las fracciones POL y MON. Estas condiciones de hidrólisis con la menor concentración de enzima y menor tiempo de reacción establecidos generó el menor porcentaje de hidrólisis.

Al analizar por GPC el HE 3 (15UI-30 min), se obtuvo el cromatograma presentado en la Figura 11, en donde se puede apreciar que la fracción POL presenta una concentración de AT cercana a 15 $\mu\text{g/mL}$, OLI a 20 $\mu\text{g/mL}$ y MON a 100 $\mu\text{g/mL}$. La de mayor cantidad de AT bajo estas condiciones, la hidrólisis produjo una mayor cantidad de mono y disacáridos, en menor proporción la fracción de nuestro interés (OLI).

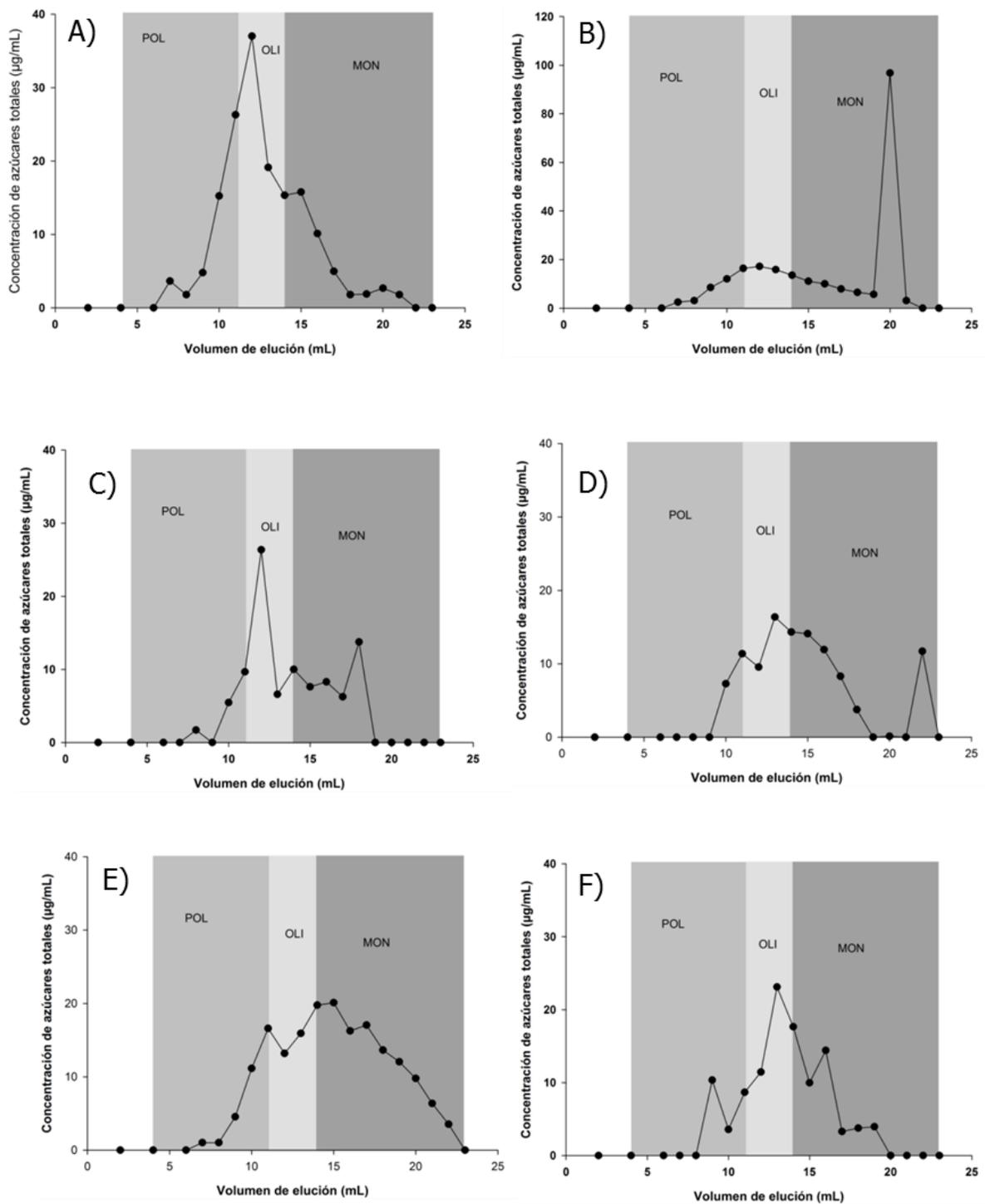


Figura 11. Cromatogramas del mucílago de *Opuntia streptacantha* posterior a la hidrólisis enzimática parcial con α -amilasa pancreática. A) Tratamiento enzimático HE 1 (15UI-10 min), B) Tratamiento enzimático HE 3 (15UI-30 min), C) Tratamiento enzimático HE 5 (10UI-15 min), D) Tratamiento enzimático HE 7 (25UI-10 min), E) Tratamiento enzimático HE 8 (25UI-15 min), F) Tratamiento enzimático HE 9 (25UI-30 min).

El análisis de HE 5 (10UI-15 min), representado en la Figura 11, muestra un incremento de la fracción POL (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las fracciones de OLI y MON se encontraron en proporciones menores (10 y 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente). En el cromatograma obtenido después del análisis de HE 7 (25UI-10 min) (Figura 11), se observa que las fracciones OLI y MON presentan valores similares en la concentración de AT (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la fracción de POL cercana a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el tratamiento enzimático HE 8 (25UI-15 min) (Figura 11) se obtuvo una mayor fracción de mono y disacáridos (MON) cercana a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, similar a la fracción POL y en menor concentración, en relación a las otras dos fracciones, se presentó OLI. En el cromatograma presentado en la Figura 11 corresponde al análisis del HE 9 (25UI-30 min), se aprecia que las fracciones POL y MON (10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) fueron menores en comparación OLI, la cual presentó una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AT.

7.6.1.2 Tratamientos enzimáticos efectuados con dextranasa

En la hidrólisis parcial realizada por la acción de la enzima dextranasa, se puede apreciar que en los tratamientos enzimáticos HE A, HE B y HE C (Figura 12), en donde la concentración de la enzima se mantuvo constante y solo fue variable el tiempo de hidrólisis, la fracción predominante es la de pesos moleculares mayores a 1000 Da (POL). A medida que se incrementa el tiempo de hidrólisis en los tratamiento enzimáticos, se observó la fragmentación de la fracción POL. Con respecto a la concentración de AT en la fracción OLI, los HE A y HE B presentaron menores concentraciones (entre 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) puede ser debido a que se emplearon condiciones de hidrólisis con menores concentraciones de enzima y tiempos de reacción.

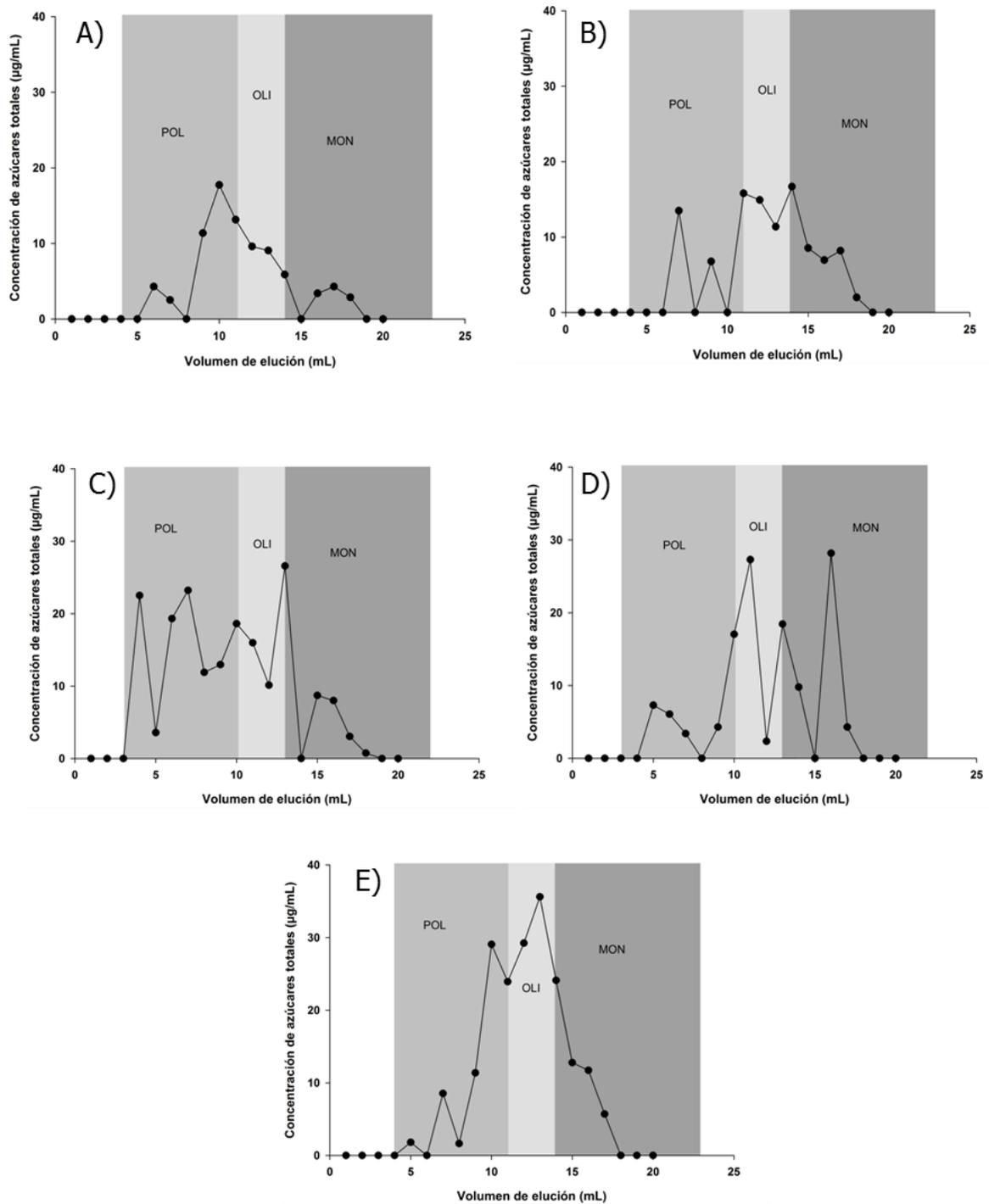


Figura 12. Cromatogramas del mucílago de *Opuntia streptacantha* posterior a la hidrólisis enzimática parcial con dextranasa. A) Tratamiento enzimático HE A (5 UI-10 min), B) Tratamiento enzimático HE B (5 UI-20 min), C) Tratamiento enzimático HE C (5 UI-30 min), D) Tratamiento enzimático HE E (10 UI-20 min), E) Tratamiento enzimático HE I (15 UI-30 min).

El tratamiento HE C (Figura 12) produjo mayores cantidades de la fracción POL cercanos a los 22 $\mu\text{g/mL}$, aunque también se obtuvieron concentraciones cercanas a 25 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción OLI. Esta cantidad de AT en la fracción OLI fue similar a la obtenida por los HE 1 y HE 9 efectuados con α -amilasa pancreática. La fracción MON en los tres tratamientos enzimáticos con dextranasa, HE A, HE B y HE C se encontró dentro de los valores de 4 a 10 $\mu\text{g/mL}$ de AT respectivamente. En la Figura 12 se presenta el cromatograma obtenido del análisis del tratamiento enzimático HE E (10UI-20 min) donde las fracciones mayoritarias fueron OLI y MON (cercanos a los 30 $\mu\text{g/mL}$), mientras que POL fue la fracción con menor concentración de AT (20 $\mu\text{g/mL}$). A su vez en el HE I (15UI-30 min) (Figura 12) la fracción MON presento una baja concentración de AT (10 $\mu\text{g/ml}$), seguida por POL cercana a los 30 $\mu\text{g/ml}$, siendo OLI la que presentó una mayor cantidad de AT (35 $\mu\text{g/ml}$).

Con base a los resultados obtenidos mediante el análisis de los perfiles de PM de los HE por GPC, los tratamientos enzimáticos seleccionados para la purificación de las fracciones oligosacáridas menores a peso molecular menor a 1000 Da fueron los que produjeron una mayor concentración de AT en la fracción de interés OLI efectuados con α -amilasa pancreática fueron los tratamientos enzimáticos HE 1, HE 5 y HE 9. Aunado a ello, estos tratamientos enzimáticos presentaron una menor de concentración de AT en la fracción MON (180-360 Da). En cuanto a los tratamientos enzimáticos realizados con dextranasa los seleccionados para su posterior purificación con etanol fueron los HE C e HE I. La selección de estos hidrolizados enzimáticos se realizó basándonos en que la fracción OLI se encontró en mayor concentración que las fracciones POL y MON, mismos criterios que con los estudios efectuados con α -amilasa pancreática. Estos cinco tratamientos enzimáticos fueron purificados mediante precipitación secuencial selectiva con etanol, para la obtención purificada de OLI1, OLI5, OLI9, OLIC y OLII presentes en los tratamientos enzimáticos HE 1, HE 5, HE 9, HE C y HE I respectivamente. El uso de α -glicosidasas para la generación de OLI

fue seleccionado con base a buscar la ruptura de enlaces α -glicosídicos y mantener en la estructura de los OLI enlaces tipo β , para lograr que presenten propiedades de OND, como lo es el mantener configuraciones β en los enlaces entre los monosacáridos constituyentes, debido a que en el tracto gastrointestinal humano no se cuentan con enzimas que rompan enlaces glicosídicos tipo β (Roberfroid y Slavin, 2000, Kaur y Gupta, 2002). Es deseable que estas muestras continúen siendo estudiadas para determinar los azúcares que la constituyen, así como el tipo de enlaces presentes.

7.7 Caracterización química y física de oligosacáridos

7.7.1 Purificación de oligosacáridos

Se utilizó el tratamiento enzimático HE 9 (25UI-30 min, α -amilasa pancreática) como modelo para el establecer el rango de concentraciones de etanol en la precipitación secuencial selectiva para purificar la fracción OLI, en este caso OLI9. En la Figura 13 se presenta el cromatograma obtenido con 65-95% de etanol, la fracción POL es la de mayor concentración. OLI y MON presentaron valores de AT similares (9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al aumentar un 5% la C_i , es decir usando un rango concentración de 70-95% de etanol (Figura 13) la fracción POL tiende a disminuir. Este comportamiento continúa a los rangos de 75-95% y 80-95% de etanol (Figura 13). La fracción OLI se pudo aislar empleando el rango de concentración de etanol del 70-95% (Figura 13), presentando 2 picos, aunque bajo estas condiciones aún se presentó la fracción MON de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AT.

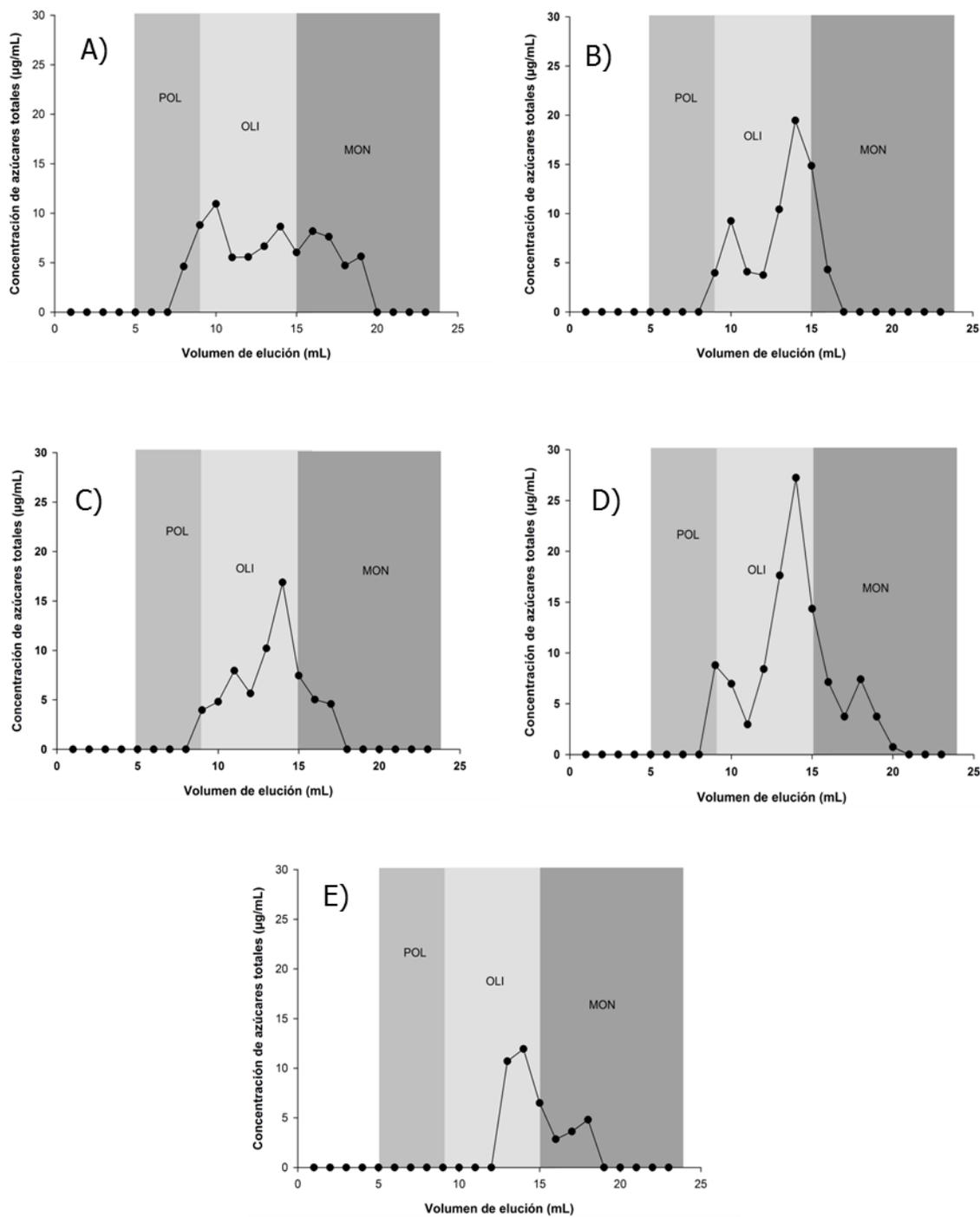


Figura 13. Cromatogramas de la fracción OLI 9 de *Opuntia streptacantha* del tratamiento enzimático HE 9 (25UI-30 min, α -amilasa pancreática), posterior la precipitación secuencial selectiva con diferentes concentraciones de etanol A) 65-95% de etanol, B) 70-95% de etanol, C) 75-95% de etanol, D) 80-95% de etanol, E) 85-95% de etanol.

En la Figura 13 se muestra el cromatograma correspondiente al rango de concentración de etanol 75-95%, en donde se observa que la fracción OLI aún presenta dos picos, similar a lo encontrado en el rango de 70-95%. La fracción MON, disminuye con respecto a los rangos de etanol 70-95%, presentando valores de 5 $\mu\text{g/mL}$ de AT. Al incrementar el rango de concentración de etanol a 80-95%, se observó un solo pico en la fracción OLI (Figura 13). Este comportamiento continua al incrementar la C_1 a 85% (Figura 24), en donde la fracción OLI solo presentó 1 pico. Esto demuestra que al utilizar rangos de concentración de etanol mayores a 80-95% parte de los compuestos presentes en OLI son eliminados en el primer paso de la precipitación secuencial selectiva con etanol.

El comportamiento que mostraron las fracciones POL y OLI en los diferentes rangos de concentración de etanol puede deberse a la insolubilidad que presentaron en el disolvente, debido a que la constante dieléctrica del etanol (24) es menor a la del agua (80). La constante dieléctrica, por definición, es la tendencia del disolvente a oponerse a las fuerzas electrostáticas de atracción entre iones con carga opuesta. El agua por presentar una constante dieléctrica alta, en comparación con la de otros disolventes, favorece la disolución de los compuestos, evitando que sus componentes se unan de nuevo, otros solventes como el etanol, facilitan su asociación, tornándolos insolubles. Este mecanismo aplica principalmente en dispersiones de polisacáridos y proteínas (Badui, 1999). Particularmente, se encuentra reportado que los azúcares de bajo peso molecular son, en general, completamente solubles en agua y alcohol, probablemente debido a sus grupos hidroxilos y su carácter polar, por tanto la solubilidad de estos compuestos disminuye a medida que la polaridad del disolvente disminuye (Balto et al., 2016). Es por ello que polisacáridos y oligosacáridos de alto peso molecular son insolubles en etanol al 80% y fácilmente separados de otros azúcares por sedimentación, filtración o centrifugación. Cuando el peso molecular de los oligosacáridos se incrementa, su solubilidad en alcohol decrece (Wrolstad, 2012). La

obtención y purificación por adición de etanol, de nuevas fuentes de oligosacáridos se encuentra reportada en la literatura. Li et al. (2011), realizaron la hidrólisis de alginato de sodio mediante vía enzimática usando alginato liasa, obtuvieron compuestos de 342 y 504 Da, que corresponden a di y trisacáridos, los cuales se purificaron mediante la precipitación con etanol. Nath et al. (2013), mediante la precipitación selectiva con etanol lograron la purificación de galactooligosacáridos obtenidos por síntesis enzimática usando β -galactosidasa y lactosa como sustrato. Espinosa-Martos y Rupérez (2006) usando etanol, purificaron oligosacáridos de 2 a 4 unidades a partir de semillas de soya.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el rango de concentraciones de etanol para realizar la purificación de la fracción OLI se estableció en el rango de 75-95% de etanol, descartándose rangos mayores (80-95 y 85-95%) debido a que bajo estas concentraciones se observó un solo pico en la fracción OLI.

Se evaluaron los mismos intervalos de concentraciones de etanol para los HE obtenidos con dextranasa utilizando como tratamiento modelo el HE I (15UI-30 min). Al analizar los rangos de concentraciones de 65-95 y 70-95 % de etanol se observó un comportamiento similar al de HE 9 (obtenido con α -amilasa), por lo que, solo se presentan los cromatogramas de las últimos tres rangos de concentraciones (75-95, 80-95 y 85-95%). En la Figura 14, se puede observar que el rango de concentración de 75-85% de etanol, logró aislar la fracción OLI. Al analizar las fracciones purificadas empleando rangos de 80-95 y 95-95% de etanol, se presentó un comportamiento similar en cuanto a la distribución de pesos moleculares, lo cual se puede observar en los cromatogramas de la Figura 14, donde se aprecia la ausencia del fracción POL.

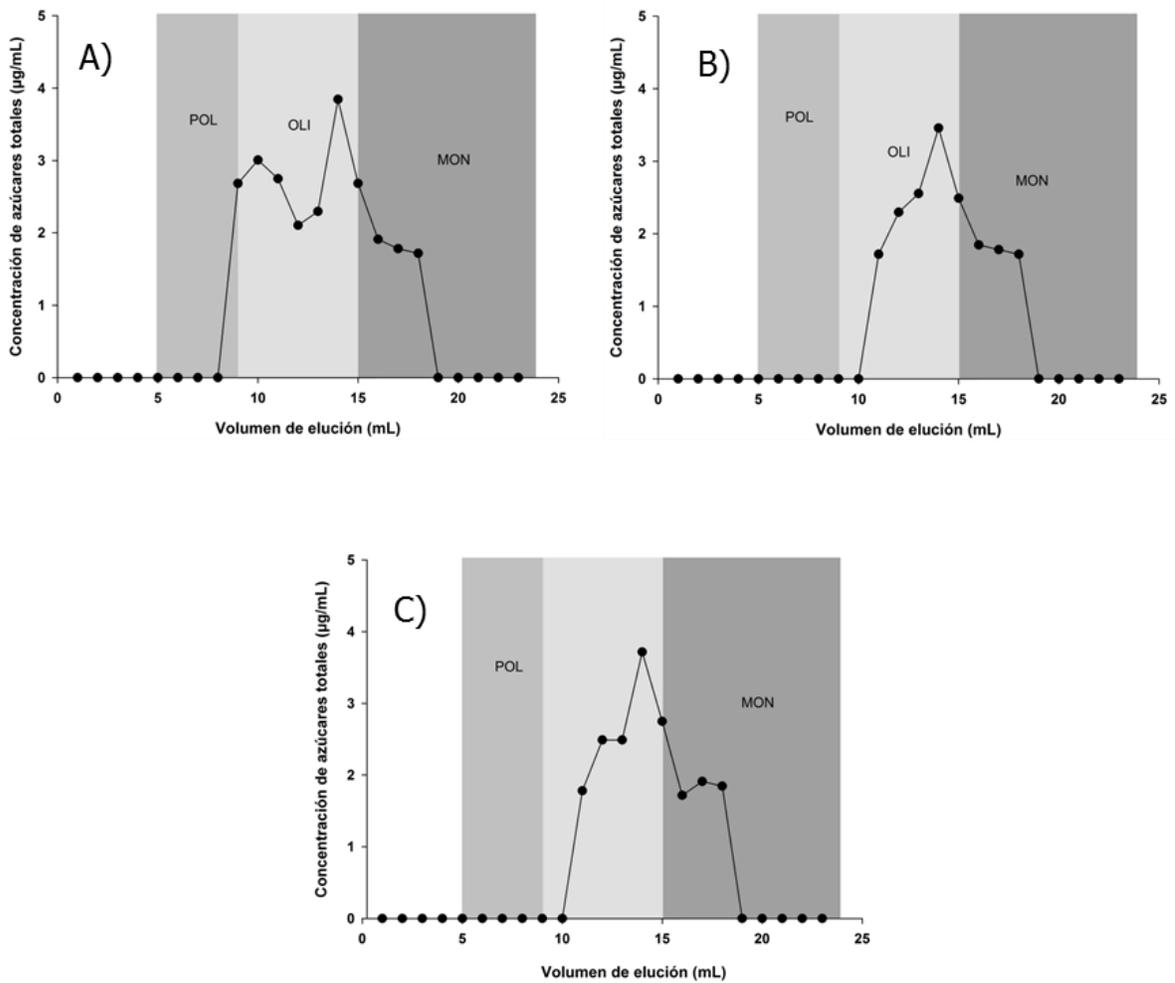


Figura 14. Cromatogramas de la fracción OLII de *Opuntia streptacantha* en el tratamiento enzimático HE I (15UI-30 min, dextranasa), posterior la precipitación secuencial selectiva con etanol. A) 75-95% de etanol, B) 80-95% de etanol, C) 85-95% de etanol.

De acuerdo con los resultados obtenidos, después de analizar los cromatogramas de los tratamientos con dextranasa, se estableció que los intervalos de concentraciones de etanol con los que se logró la purificación de la fracción OLI en los HE C y HE I son a partir de 75-95%.

Una vez establecidos los intervalos de etanol adecuados para la purificación por precipitación secuencial selectiva se llevó a cabo la determinación del GP de los OLI purificados de cada tratamiento enzimático.

7.7.2 Grado de polimerización (GP) de los oligosacáridos

Se realizó la determinación del GP de los OLI purificados mediante la cuantificación de AR y AT de las fracciones oligosacáridas purificadas OLI1, OLI5, OLI9, OLIC, OLII provenientes de los HE 1, HE 5, HE 9, HE C y HE I respectivamente, utilizando la metodología propuesta por Greenwood (1976). Se utilizaron azúcares control con GP conocidos (acarbosa, GP=4, Bayer, México; dextran 1000, GP=6 y maltoheptosa, GP=7, Sigma-Aldrich, USA).

Como se observa en la Tabla 8 los valores de GP corresponden a los reportados para los azúcares control, por lo que se procedió a analizar las fracciones oligosacáridas purificadas.

Tabla 8. Grado de polimerización de azúcares control

Control	AT µg glucosa/mL	AR µg. glucosa/mL	GP (AT/AR)
Acarbosa	426.024	108.739	3.91
Maltoheptosa	503.405	70.806	7.11
Dextran 1000	469.426	78.288	5.99

AT=Azúcares totales, AR= Azúcares reductores, GP= Grado de polimerización

Para la determinación del GP de los OLI purificados se prepararon dispersiones de las fracciones OLI1, OLI5, OLI9, OLIC y OLII, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 9):

Tabla 9. Grado de polimerización de fracciones oligosacáridas purificadas

Fracción	AT	AR	GP
	µg glucosa/mL	µg glucosa/mL	(AT/AR)
OLI1	434.524	84.606	5.13
OLI5	391.270	128.663	3.04
OLI9	449.206	116.262	3.86
OLIC	85.317	11.565	7.38
OLII	109.921	11.420	9.62

AT=Azúcares totales, AR= Azúcares reductores, GP= Grado de polimerización

Las fracciones oligosacáridas purificadas OLI1, OLI5 y OLI9 presentaron un grado de polimerización correspondiente a compuestos que presentan de 3 a 5 moléculas de azúcar (504 a 828 Da) y OLIC y OLII un GP de 7 y 9, respectivamente (1152 y 1476 Da). Aunado a lo anterior, las fracciones OLIC y OLII presentaron una baja cantidad de AT, lo que indica que más del 90% de su composición probablemente sean sales de fosfato de potasio, debido al buffer en donde se lleva a cabo la hidrólisis enzimática. Las fracciones OLI1, OLI5 y OLI9 presentaron una mayor cantidad de AT alrededor del 50% indicando que el porcentaje restante está compuesto en su mayoría por sales, debido posiblemente al uso de buffer fosfato de sodio. Por lo tanto las fracciones seleccionadas para los estudios *in vitro* fueron las que contienen un mayor porcentaje de AT (OLI1, OLI5 y OLI9).

Al someter el mucílago de OS a condiciones de hidrólisis con menor concentración de enzima (α -amilasa) y menor tiempo de reacción (Tratamiento 1, 15 UI-10min) se logró obtener compuestos de mayor peso molecular (OLI1, GP= 5.13, considerado como 5). Al

incrementar la concentración de enzima y el tiempo de hidrólisis se obtuvieron OLI con pesos moleculares menores condiciones de hidrólisis de 20 UI-15min (HE 5), se logró obtener fracciones de OLI (OLI5) con un grado de polimerización de 3.04 (GP=3). En cuanto a la hidrólisis utilizando dextranasa variando concentraciones de (5 y 15 UI) con un tiempo de 30 min se obtuvieron oligosacáridos con GP de 7.38 (GP=7) y 9.62 (GP=9). Aún no ha sido descrita la estructura del mucilago de *Opuntia*'s; sin embargo, no se utilizó una hidrólisis ácida (Trachtenberg y Mayer, 1981) ya que es un método drástico que puede llegar a obtener solo monosacáridos. Otros autores han empleado hidrólisis con enzimas debido a la especificidad y selectividad del tipo de enlace, para obtener oligosacáridos con potencial prebiótico (Oleano-Martin et al., 2002; Babbar et al., 2015).

7.3 Análisis de la morfología de las fracciones oligosacáridas seleccionadas

Las micrografías electrónicas de barrido obtenidas a 100X y 1000X se muestran en la Figura 15, donde se observa la naturaleza laminada de OLI9. Estas láminas o escamas presentan tamaños y formas irregulares con superficie porosa. Los hidrolizados enzimáticos OLI1 y OLI5 presentan el mismo tipo de morfología. Contrario a esto, diversos autores reportan que la morfología de polisacáridos de ciertas especies de cactáceas (*Opuntia ficus indica*, *Hylocereus undatus*) presentan formas esféricas cuando son secados por aspersion (León-Martínez et al., 2010; García-Cruz et al., 2013). Probablemente las características morfológicas de las muestras de OLI de OS sean debidas al empleo del proceso de liofilización para deshidratar la muestra. En el secado por liofilización, la muestra requiere una previa congelación a temperaturas de entre -20 y -40°C para alcanzar la máxima cristalización de agua (Fang y Bhandari, 2012). Posteriormente, el hielo formado se transforma en vapor de agua en condiciones de baja presión y por ultimo este vapor de agua se remueve de la superficie de la muestra mediante sublimación (Oetjen y Haseley, 2004). La etapa de congelación puede

afectar la textura de la matriz congelada y por tanto afecta las características morfológicas del polvo obtenido (Abdelwahed et al., 2006; Fang y Bhandari, 2012).

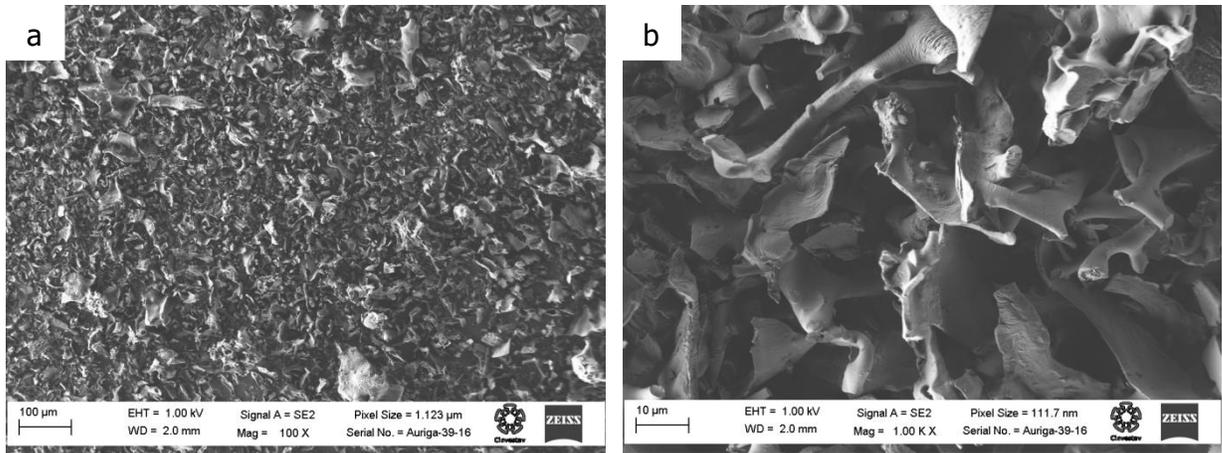


Figura 15. Micrografías en SEM por electrones secundarios de la fracción oligosacárida OLI9. a) 100X y b) 1000X

7.8 Estudios *in vitro*

7.8.1 Evaluación del crecimiento celular

En la figura 16 se observa el crecimiento de LaC en presencia de cinco diferentes fuentes de carbono. La fase lag tiene una duración de 12 h; la fase exponencial se establece a partir de las 12 h y hasta las 24 h, seguida de la fase estacionaria. Es en la fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento celular disminuye debido al agotamiento de la fuente de carbono o a la acumulación de productos tóxicos (Erkmen y Bozoglu, 2016). El crecimiento celular (UFC/mL) a las 12 h asociado a OLI9 fue significativamente mayor (Tukey $\alpha=0.05$), en comparación con lo presentado por OLI1, OLI5 e INU (Figura 16). Esto puede deberse a que OLI9 presentó un bajo grado de polimerización (GP=4), como lo mencionan de Vuyst et al., (2013) en cuanto a la asimilación de oligofructosa en algunas cepas, donde se presentan una absorción consecutiva de fracciones cortas en el orden de 2-3 GP > 4-5 GP > 6-7 GP, lo que

indica una asimilación preferencial de cadenas cortas de este tipo de oligosacáridos. La fuente de carbono OLI5 a las 48 h, fue quien produjo una mayor concentración celular, en ellas.

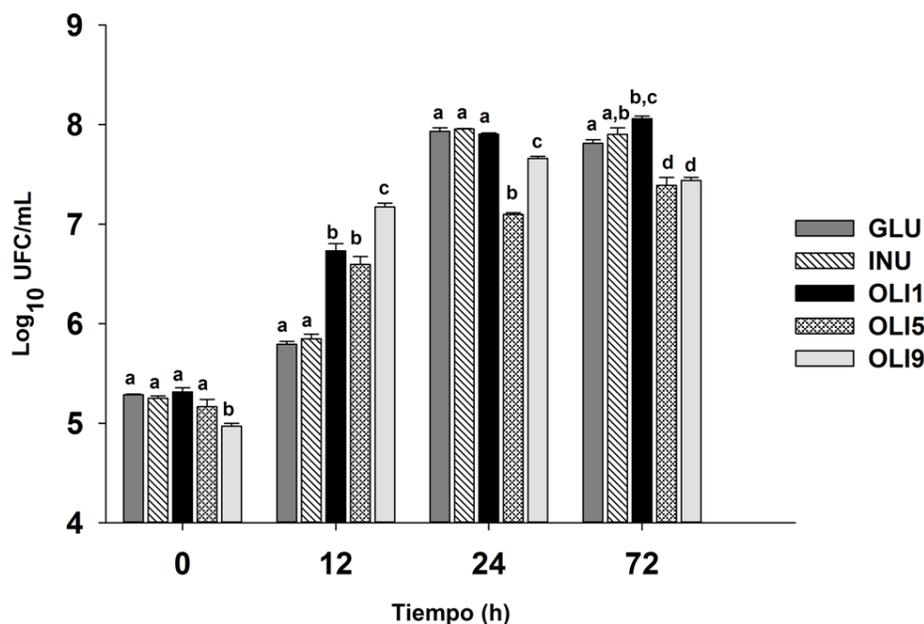


Figura 16. Cinética de crecimiento celular de LaC, (*Lactobacillus casei*) en presencia GLU (glucosa), INU (inulina), oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9).

La disminución del pH (Figura 17) en las cinéticas realizadas con OLI5 Y OLI9 e INU, presentan valores que van del 7 al 5.80, con respecto a la fracción OLI1 que alcanza un valor de pH de 5.01. Estos valores se encuentran dentro de los reportados para diferentes oligosacáridos (xilooligosacáridos, inulina, rafinosa, manooligosacáridos, fructooligosacáridos, entre otros), (Smiricky-Tjardes et al., 2003). En el caso de la GLU como fuente de carbono al 1%, se alcanzaron valores de pH entre 5.0 y 3.8. Goderska et al. (2008) usando medio MRS, trabajó con diferentes cepas de *Lactobacillus acidophilus*, utilizando como fuente de carbono glucosa reportó que después de 48 h los valores de pH variaron entre 3.72 a 3.67. Así mismo, Mandadzhieva et al. (2011) con otras especies de *Lactobacillus* determinaron valores de pH entre 4.05 a 3.72 después de 48 h. En contraste, en esta investigación se obtienen

valores de pH ligeramente mayores (Figura 17) a las 48 h, debido posiblemente a las diferencias con el medio de fermentación utilizado.

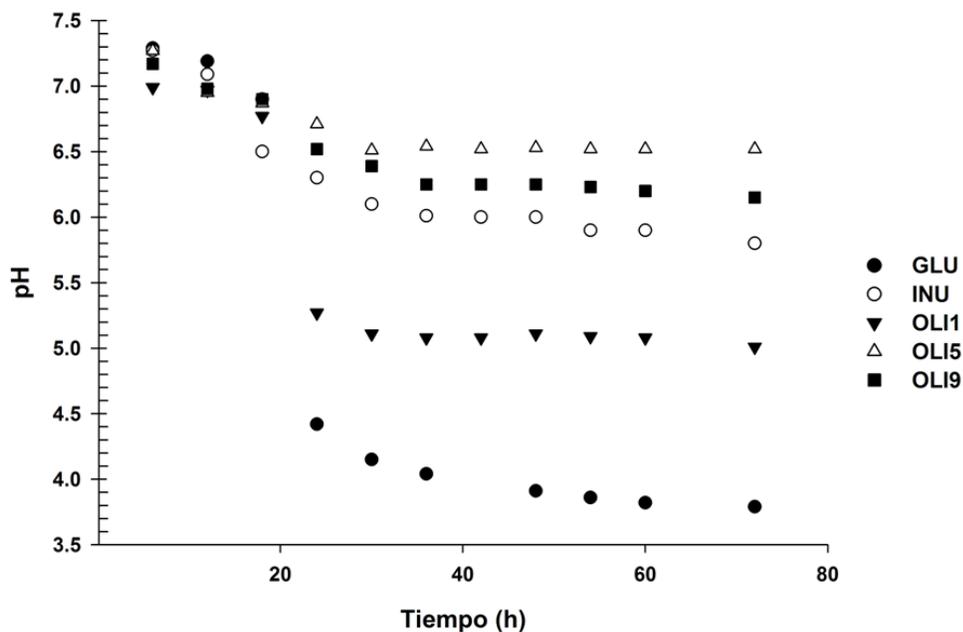


Figura 17. Variación del pH en el medio durante la cinética de crecimiento LaC, (*Lactobacillus casei*) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9).

LaC es una bacteria heterofermentativa facultativa que sigue la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (Figura 18) en donde además de producir ácido láctico también produce ácido acético y etanol al fermentar hexosas y al estar en presencia de pentosas solo ácido láctico y acético. Aunque la vía de producción del ácido propiónico no está de todo elucidada, en algunas especies de lactobacilos como *Lactobacillus casei* puede llegar a presentarse (Stewart et al., 2008).

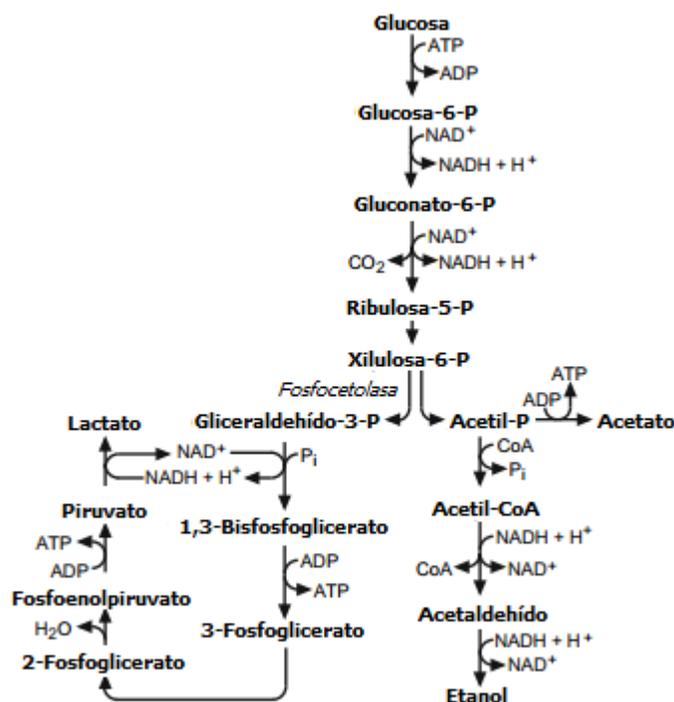


Figura 18. Ruta heterofermentativa Embden-Meyerhof-Parnas.

La producción de ácido acético por LaC (Figura 19) en presencia de GLU y de OLI1 no fue detectada durante el tiempo de fermentación. En el tratamiento con GLU puede deberse a que esta fuente de carbono, al ser tan asimilable, toda la producción de AGCC se fue hacia la producción de ácido láctico (Figura 19) (Kandler, 1983). De igual manera, el ácido acético no fue detectado en la fermentación de la fracción OLI9. Esto pudo deberse al GP (4), composición y/o tipo de enlaces de la fracción oligosacárida.

La producción de ácido propiónico (Figura 19) se presentó en todas las fermentaciones. Se observaron cantidades significativamente mayores de ácido propiónico al metabolizar OLI1 (12 y 24h). La fracción OLI5 a las 24 horas de fermentación presentó menores cantidades, OLI9 mostró una producción similar a GLU a partir de las 24 h. Las concentraciones de ácido propiónico a las 48 h, en las fermentaciones con OLI1, OLI5, OLI9 e INU no presentan diferencias significativas.

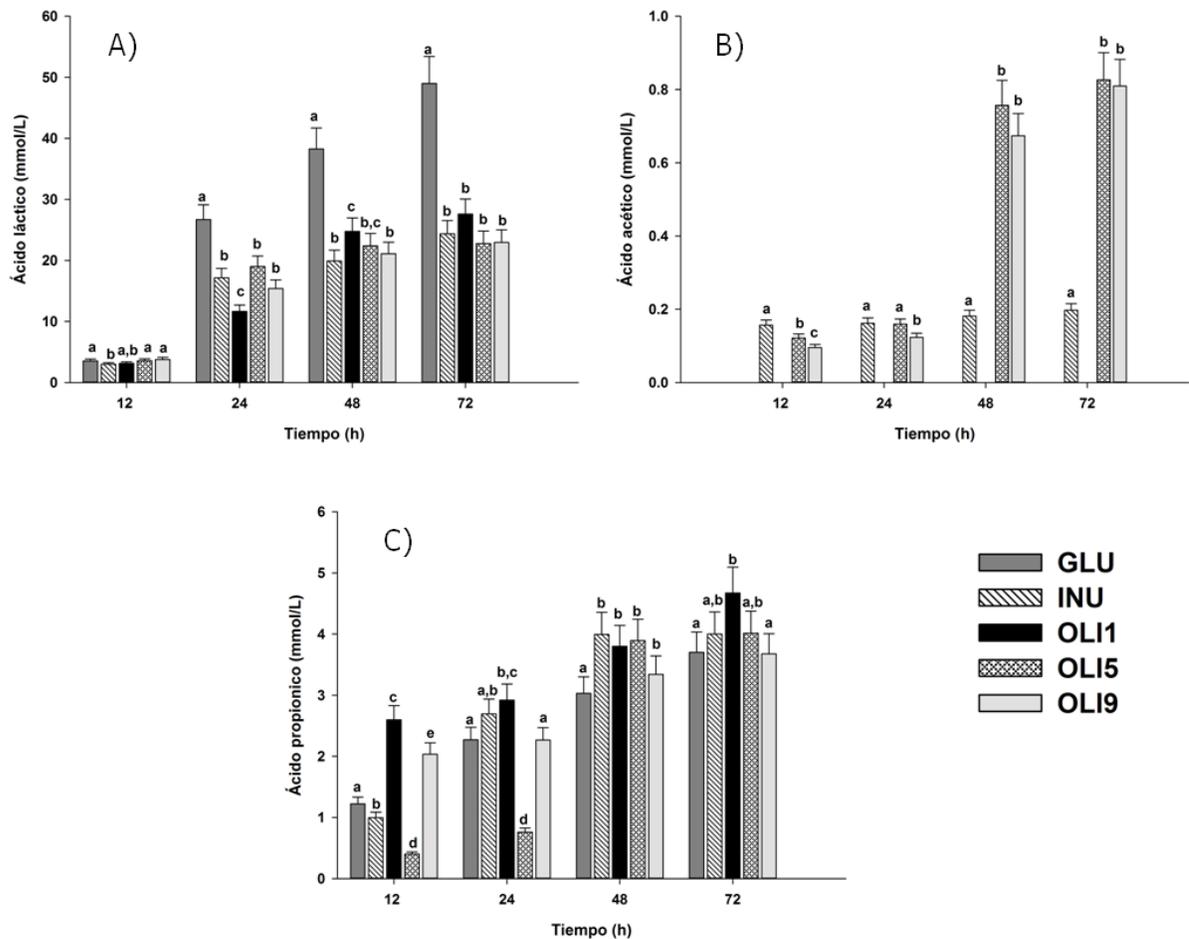


Figura 19. Producción de ácido láctico y AGCC por LaC (*Lactobacillus casei*) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9). A) Ácido láctico, B) Ácido acético, C) Ácido propiónico.

El crecimiento celular de LaA en presencia de las fuentes de carbono evaluadas (Figura 20) presentó un comportamiento similar al de LaC, presentando una fase lag de 0 a 6 h, la fase exponencial a partir de las 6 hasta las 18 h. Una fase estacionaria se estableció entre las 18 a las 48 horas. Finalmente, la fase de muerte celular a partir de las 48 h. Las fuentes de carbono GLU, INU y OLI9 fermentadas por LaA a las 48 h mostraron una mayor población celular en comparación con OLI1 y OLI5. Estos resultados muestran que la fracción purificada OLI9 estimula el crecimiento de LaA al igual que INU. Lo que indican que OLI9 puede llegar a presentar un potencial efecto prebiótico.

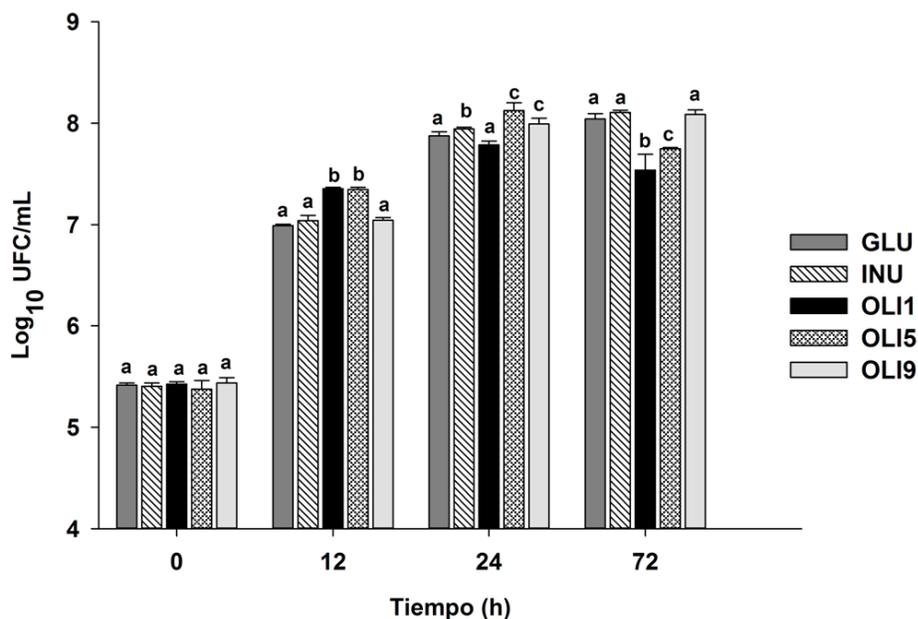


Figura 20. Cinética de crecimiento celular de LaA (*Lactobacillus acidophillus*) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9).

Los cambios del pH (Figura 21) comienzan a presentarse a partir de 12 h (fase exponencial). LaA al fermentar OLI1, OLI5 y OLI9 presentó valores de pH hasta de 5.63 ± 0.07 ; INU de 5.91 ± 0.04 . Estos valores así como los presentados por LaC, se encuentran dentro de los reportados para diferentes oligosacáridos como inulina, rafinosa, xilooligosacáridos, fructooligosacáridos, manooligosacáridos, entre otros (Smiricky-Tjardes et al., 2003).

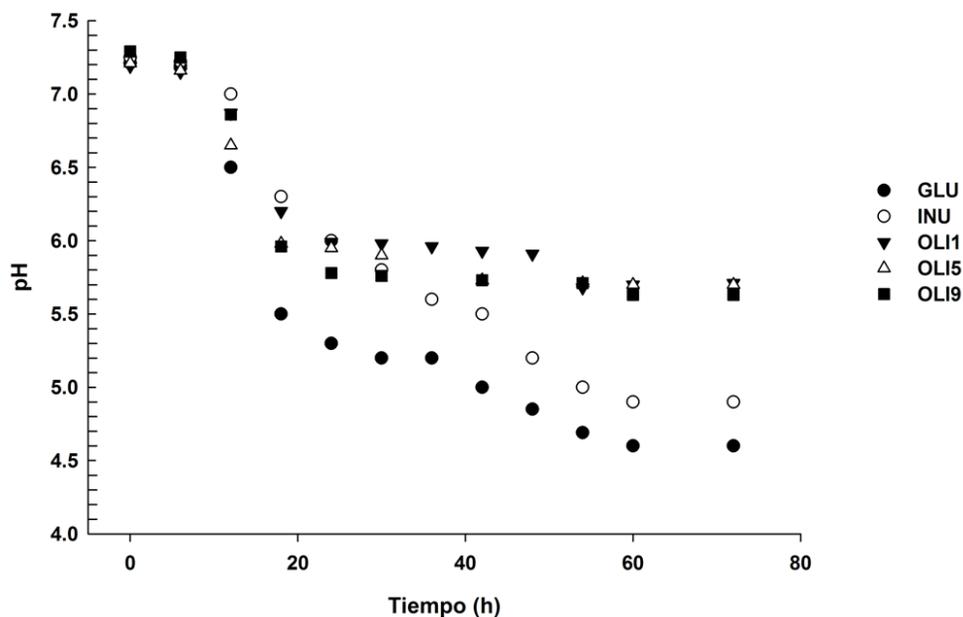


Figura 21. Variación del pH durante el crecimiento de LaA (*Lactobacillus acidophilus*) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9).

LaA es una bacteria heterofermentativa obligada, que degrada hexosas por la vía del fosfogluconato (Figura 22) y produce ácido láctico, acético y dióxido de carbono, a su vez fermentan las pentosas por esta misma vía metabólica (Felis y Dellaglio, 2007).

Los ácidos que intervienen en la disminución del pH son principalmente el láctico y el acético (Ljungh y Wadstrom, 2009). En la Figura 23 se puede apreciar que al alcanzar las 12 h de fermentación, la concentración de ácido láctico en los tratamientos INU, OLI1, OLI5 y OLI9; no mostraron diferencias significativas, a diferencia del control GLU, ya que produjo la mayor cantidad de ácido láctico durante la fermentación.

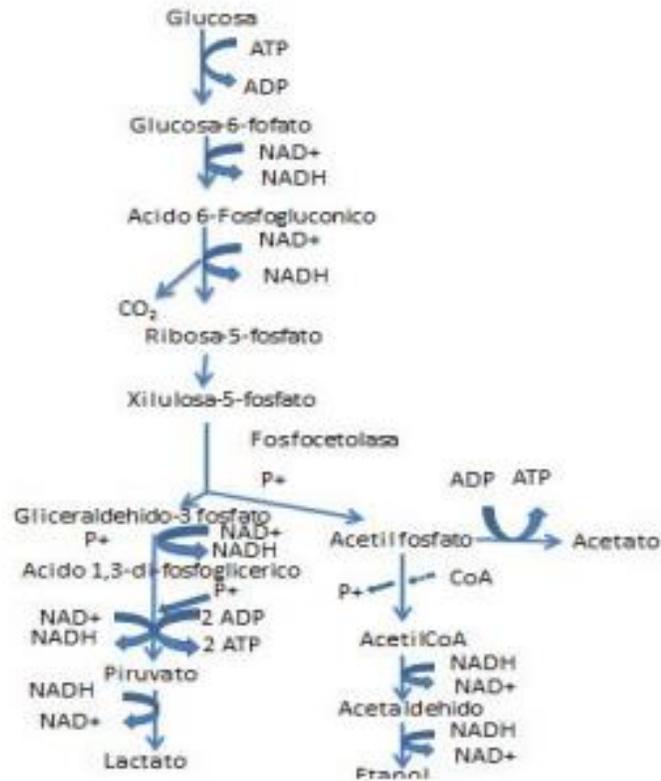


Figura 22. Ruta fosfogluconato

En cuanto a la producción de ácido propiónico (Figura 23) por LaA, solo lo produce al metabolizar las fracciones OLI1, OLI5, OLI9 e INU. A las 48 h de fermentación se tienen valores entre 3.05 ± 0.39 a 3.20 ± 0.24 mmol/L. En presencia de GLU, el ácido propiónico no fue detectado, esto puede deberse a que LaA al metabolizar GLU solo derivó en la producción de ácido láctico. De acuerdo con Macfarlane y Gibson (1996), el ácido láctico no siempre es el único producto final de la fermentación en las bacterias ácido lácticas, como los lactobacilos. Por su parte, Smiricky-Tjardes et al. (2003) mencionan que productos finales de la fermentación dependiendo del tipo de oligosacárido empleado.

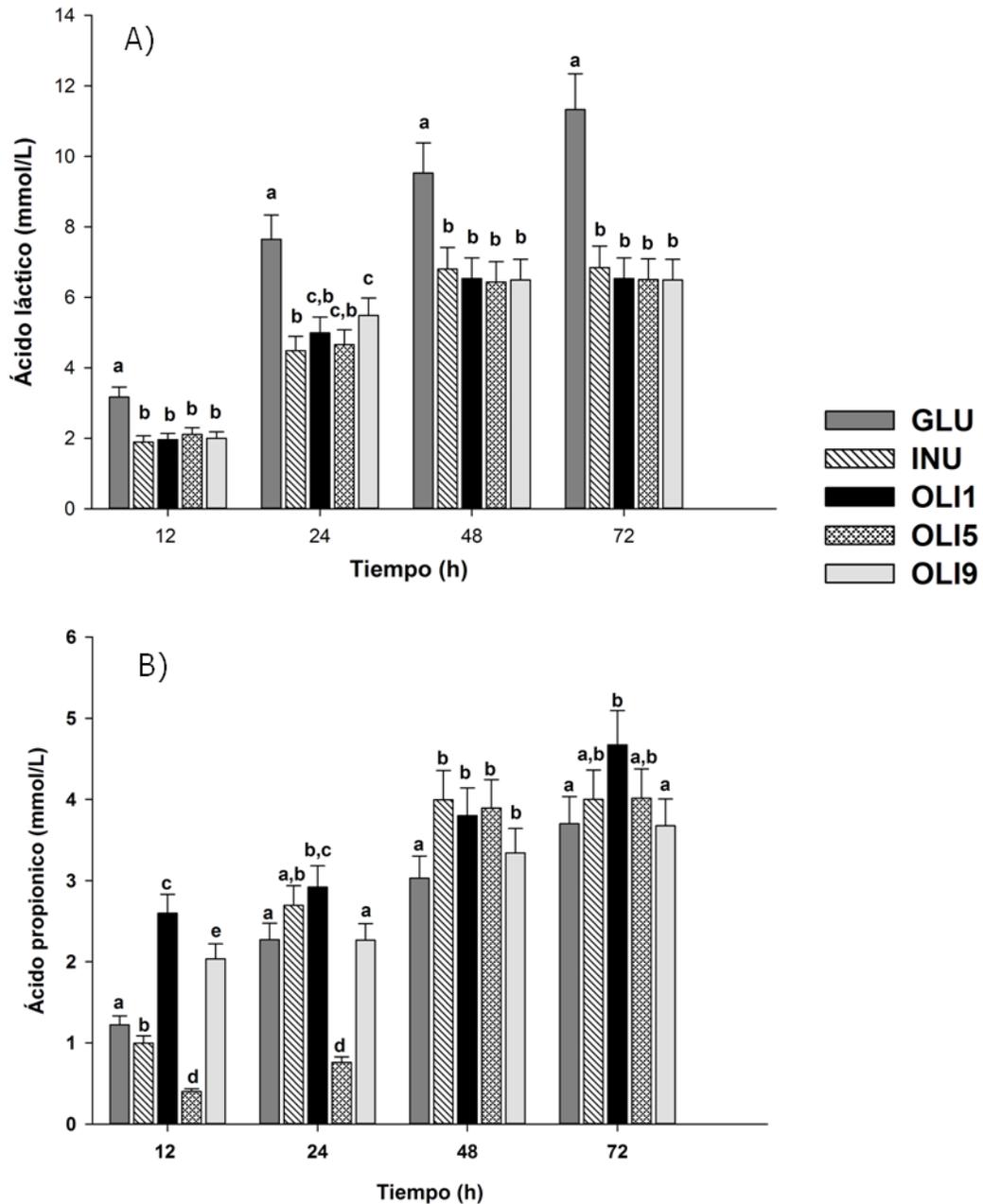


Figura 23. Producción de ácido láctico por y AGCC por LaA (*Lactobacillus acidophullus*) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9). A) Ácido láctico, B) Ácido propiónico

En la figura 24 se presentan las cinéticas obtenidas con BiL, en donde en la fase exponencial se puede apreciar que GLU, INU y OLI1, presentan una mayor población celular (aunque estadísticamente no presentan diferencias significativas). Esto indica que de las 3 fracciones

oligosacáridas evaluadas, OLI1 fue asimilada más rápidamente, al igual que INU. Este comportamiento puede deberse a que en cultivos axénicos, la mayoría de los microorganismos se adaptan para emplear sus fuentes de carbono disponibles presentes en el medio (Roberfroid, 2001)

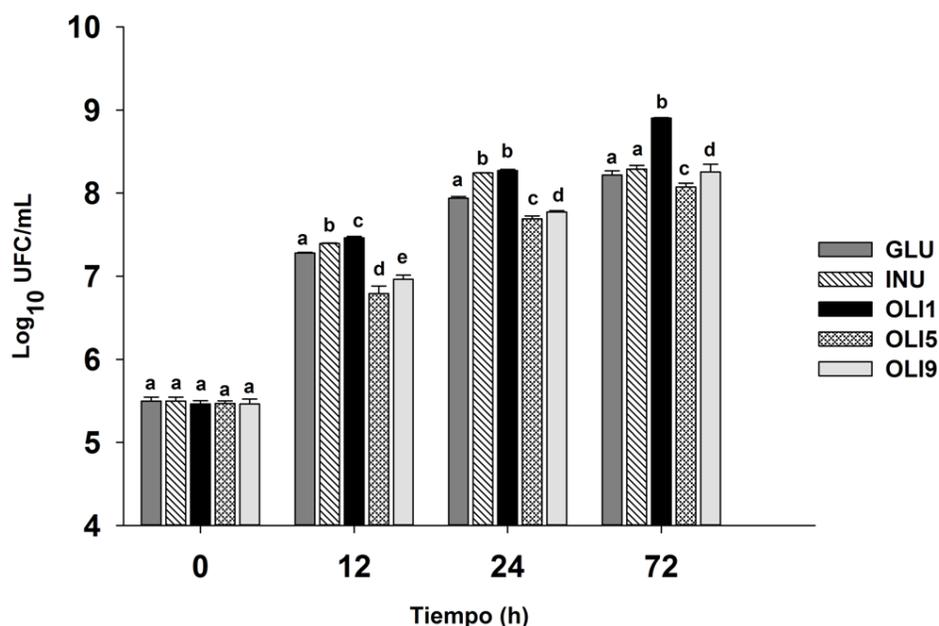


Figura 24. Cinética de crecimiento celular de BiL (*Bifidobacterium lactis*) en presencia de diferentes fuentes de C. GLU (Glucosa), INU (Inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OS) (OLI1, OLI5 y OLI9).

Los valores de pH más bajos que presentó la fermentación de BiL (Figura 25) fue en presencia de las fuentes de carbono GLU e INU (4.45 y 4.74, respectivamente). Las cinéticas efectuadas con OLI1, OLI5 Y OLI9, alcanzan valores de pH entre los rangos de 5.11 y 5.29. Estos valores se encuentran dentro de lo reportado para bacterias del género *Bifidobacterium* al fermentar oligofruktosa y fructooligosacáridos (Bielecka et al., 2002).

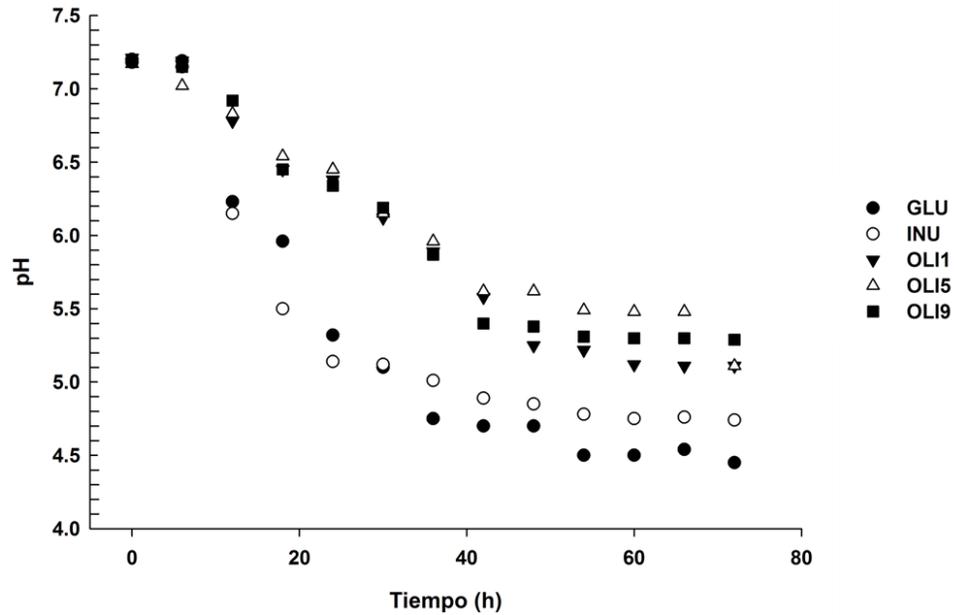


Figura 25. Variación del pH durante el crecimiento de BiL (*Bifidobacterium lactis*) en presencia GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9).

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* metaboliza los carbohidratos por la vía de denominada fructosa-6-fosfato o ruta bífida (Figura 26). En esta ruta se metabolizan tanto hexosas como pentosas y los metabolitos finales producidos son principalmente ácido acético, láctico, etanol y en menor concentración ácido fórmico (González-Rodríguez et al., 2013).

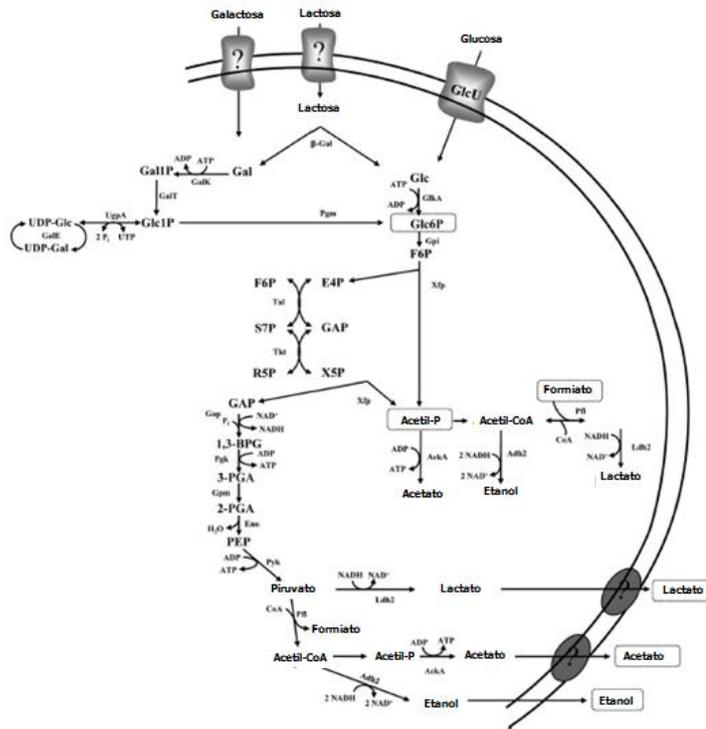


Figura 26. Esquema de la ruta bifida en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Modificado de González-Rodríguez et al., 2013.

La producción de ácido láctico por BIL se observa en la Figura 27, en donde a las 48 horas de fermentación no se observan diferencias significativas entre las 5 fuentes de carbono evaluadas. En cuanto a la producción de ácido acético (Figura 24) GLU e INU presentaron valores máximos de 7.84 y 7.69 mmol/L respectivamente. Con respecto a las fracciones oligosacáridas, las que generaron más cantidad de ácido acético fueron OLI5 y OLI9, esto pudo deberse a la composición del, tipo de enlace y GP de estos dos OLI.

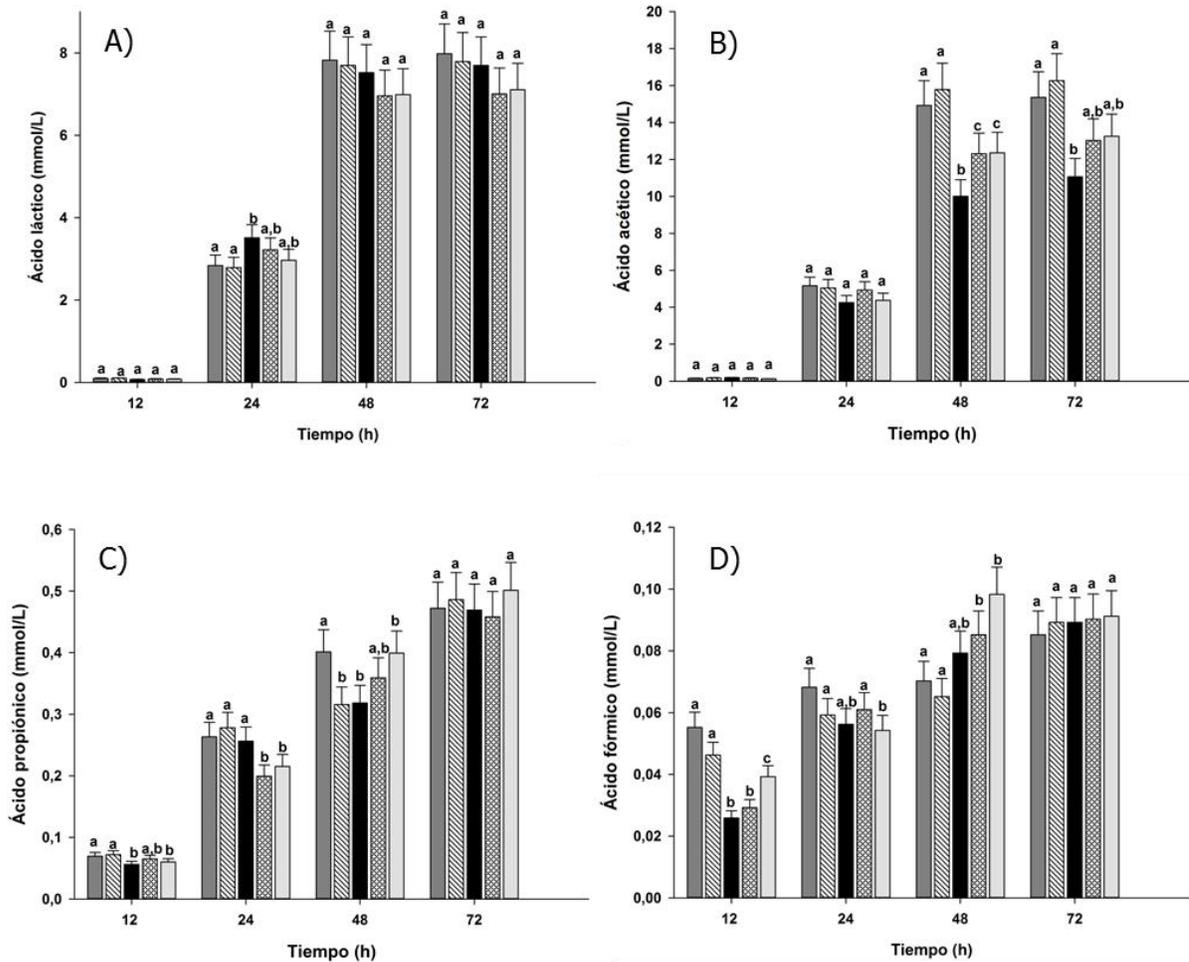


Figura 27. Producción de ácido láctico, fórmico y AGCC por de BiL (*Bifidobacterium lactis*) en presencia de GLU (glucosa), INU (inulina), Oligosacáridos de *Opuntia streptacantha* (OLI1, OLI5 y OLI9). A) Ácido láctico, B) Ácido acético, C) Ácido Propiónico, D) Ácido fórmico.

Con respecto a la producción de ácido propiónico por BiL (Figura 27) a las 48 h, las fuentes de carbono que presentaron mayor concentración fueron GLU y OLI9. Diversos autores han reportado la producción de ácido propiónico en presencia de fibras solubles e insolubles y OND (Farooq et al., 2013).

La generación de ácido fórmico se puede apreciar en la Figura 27, en donde a partir de la hora 12 se empieza a producir mostrando mayores cantidades en las fermentaciones realizadas con OLI9, INU y GLU. A las 48 h OLI9 presentó la mayor cantidad de este

metabolito. Esta reportado en literatura que las bifidobacterias al metabolizar diferentes carbohidratos pueden llegar a producir diversos metabolitos dentro de los cuales se encuentra reportados el ácido láctico, acético, propiónico y fórmico (Paupard et al., 1973; Falony et al., 2009; Fernando et al., 2010; Gullón et al., 2011; Farooq et al., 2013).

De acuerdo a los resultados obtenidos, en esta sección, el crecimiento, los valores finales de pH en las fermentaciones y la producción de AGCC por los diferentes probióticos comerciales evaluados, dependen de la naturaleza de la fuente de carbono; es decir, del tamaño de la cadena, el tipo de constituyentes, tipo de enlaces y peso molecular (Smiricky-Tjardes et al., 2003) . Estos resultados son difíciles de comparar con otros estudios debido a que otros autores analizan otro tipo de oligosacáridos, algunos comerciales y otros obtenidos a partir de hidrólisis de compuestos complejos de alto peso molecular (pectinas, alginatos y fibra de trigo, entre otros) y utilizan mezclas de probióticos y/o microorganismos procedentes de heces humanas.

7.9 Selección de la fracción oligosacárida para estudios *in vivo*

Para los estudios *in vivo* se seleccionó la fracción oligosacárida OLI9 proveniente del tratamiento enzimático HE 9 (α -amilasa pancreática, 25UI-30min) debido a *in vitro* mostro un mayor crecimiento celular de LaC a las 12 h y de LaA a las 48 y 72 h.

El análisis de la microbiota presente en el contenido del ciego de los animales de experimentación durante el tiempo del estudio *in vivo* mostró los siguientes comportamientos y cambios en la composición de la microbiota.

La población de *Lactobacillus* (Figura 28) en los grupos experimentales CON e INU-P durante las 6 semanas no mostro diferencias significativas entre ellos ($\alpha=0.05$). Los grupos MUC y

OLI-P a su vez tampoco mostraron diferencias significativas entre ellos durante el tiempo del estudio. Para identificar un cambio significativo en la población, es necesario incrementar el tiempo del estudio *in vivo* o la dosis de la fracción oligosacárida. Montesi, et al. 2005, realizaron estudios en ratas Wistar (195 ± 5 g de peso) para evaluar el efecto de suplementar dietas con prebióticos (5.7% de fructooligosacaridos) y probióticos (*B. lactis* y *S. thermophilus*) por un lapso de 28 días (4 semanas), en donde observaron que no hubo cambios significativos en la población de la microbiota del género *Lactobacillus*.

En la Figura 28 se observa que a partir de la semana 3 de experimentación las bacterias del género *Bifidobacterium* presentaron una mayor población en presencia de OLI-P en relación a las otras dietas evaluadas (CON, INU-P y MUC). Esto indica que las dietas que contienen esta fracción oligosacárida proporcionan un efecto bifidogénico al estimular el crecimiento de bifidobacterias. Así mismo, las dietas adicionadas con MUC a partir de la semana 3, mostraron tener un efecto positivo en el crecimiento de *Bifidobacterium* mayor al del grupo CON, esto también indica que puede estar generando un efecto asociado a la fibra dietaria, como lo es la estimulación de bacterias benéficas. Diversos autores evaluaron el efecto de oligosacáridos no digeribles (OND) obtenidos por vías químicas y/o enzimáticas, así como de prebióticos comerciales, en donde observaron un aumento en la población de bacterias del género *Bifidobacterium* en diferentes intervalos de tiempo (desde 14 a 28 días) (Bielecka, 2002; Oleano- Martin et al., 2002; Montesi et al., 2005; Wang et al., 2006).

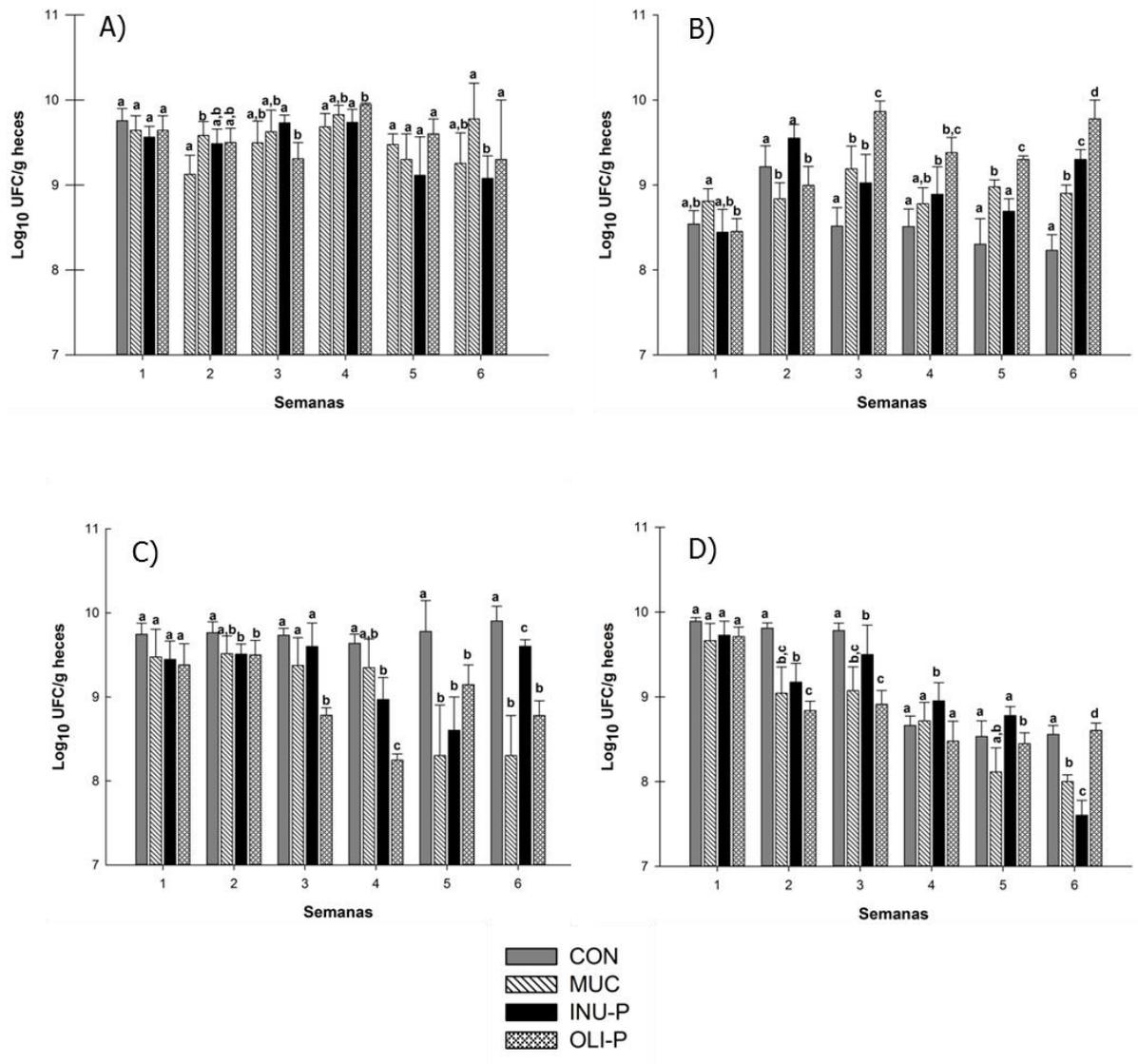


Figura 28. Población de bacterias presentes en heces de ratas Wistar sometidas a diferentes dietas (CON, MUC, INU-P y OLI-P) durante seis semanas. A) *Lactobacillus* spp, B) *Bifidobacterium* spp, C) *Clostridium* spp, D) *Bacteroides* spp.

La población de bacterias del género *Clostridium* (Figura 28) en presencia de la dieta CON no mostró cambios significativos durante todo estudio. En la semana 3 la dieta OLI-P provocó una disminución en población. Este comportamiento en la disminución de la población se observó a partir de la semana 5 en las muestras provenientes de los individuos de experimentación suministrados con las dieta MUC. En cuanto a las dietas INU-P, se observó una decremento celular a partir de la semana 4.

Durante el estudio *in vivo* la población de bacterias del género *Bacteroides* (Figura 28) mostró un descenso al estar en presencia de OLI-P a partir de la semana 2. Este comportamiento también se observa en los tratamientos MUC e INU.

Esta disminución de bacterias del género *Clostridium* y *Bacteroides* en los grupos alimentados con dietas suplementadas con OLI-P indica un potencial efecto prebiótico, al estimular el crecimiento selectivo de bacterias benéficas (bifidobacterias) y ocasionando un descenso en la población de bacterias potencialmente patógenas (Gibson y Roberfroid, 1995). Esto puede ser originado por el aumento de la población de bacterias del género *Bifidobacterium* las cuales ocasionan una disminución del pH por la generación de AGCC y por ello se esté inhibiendo el crecimiento y/o reproducción de *Clostridium* y *Bacteroides* (Rowland y Tanaka, 1993). Este comportamiento de inhibición de bacterias patógenas se ha mostrado en diferentes estudios de actividad y/o efecto prebiótico de diversos oligosacáridos. En estas investigaciones se analizó una mezcla de *C. perfringens*, *E. coli* y *Bifidobacterium* la cual fue inoculada en un medio que contenía oligosacáridos, en donde se observó que el género *Bifidobacterium* exhibe un crecimiento y a su vez mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. perfringens*, *E. coli* (Van Loo et al., 1999; Rycroff et al., 2001; Vulevic et al., 2004). Estudios *in vivo* realizados por Wang et al., (2006) en ratas Wistar con una duración de 14 días alimentadas con hidrolizados pécticos (HP) y una dieta control (sin HP), observaron una proliferación de bifidobacterias y lactobacilos además de una disminución de microorganismos putrefactos y patógenos (bacteroides, enterobacterias, enterococos) en heces.

En cuanto al análisis de AGCC presentes en heces solo se encontraron dos metabolitos: ácido propiónico y ácido acético. El ácido láctico y fórmico no fueron detectados. En la Tabla 9 se puede observar que en las semanas 4,5 y 6 se aprecia una diferencia significativa ($\alpha=0.05$)

en el incremento de ácido propiónico en el grupo OLI-P en relación a los demás grupos. A lo largo del estudio en los demás grupos no se observan diferencias significativas en la cuantificación de este metabolito. Con respecto al ácido acético los resultados muestran que no existieron diferencias mínimas significativas entre los grupos durante el ensayo. En literatura se reporta con respecto a la producción y absorción de AGCC, que las concentraciones de AGCC en el intestino grueso dependen del sitio de fermentación, la dieta y la composición de la microbiota intestinal (Bouhnik et al., 1996a). La evaluación de la producción *in situ* de los AGCC en colon es difícil de determinar debido a que más del 95% de estos ácidos son rápidamente absorbidos por el metabolismo del hospedador (Barlett et al., 1990).

Tabla 10.- Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) ($\mu\text{mol}/100\text{ g heces}$) en contenido intestinal (ciego) de ratas Wistar alimentadas con diferentes dietas: CON, MUC, INU-P, OLI9-P; durante el estudio *in vivo*

SEMANA		1	2	3	4	5	6
GRUPO							
Ac. PROPIONICO	CONTROL	627.81 \pm 102.16 ^a	881.25 \pm 171.03 ^a	478.53 \pm 28,27 ^a	456.88 \pm 64.04 ^a	399.57 \pm 87,08 ^a	411.18 \pm 105.55 ^a
	MUC	625.82 \pm 189.91 ^a	1085.51 \pm 66.89 ^a	416.10 \pm 82,81 ^a	470.14 \pm 17.74 ^a	589.51 \pm 142,29 ^{a,c}	400.48 \pm 10.38 ^b
	INU-P	665.53 \pm 125.29 ^a	607.87 \pm 363.67 ^a	408.96 \pm 104,47 ^a	471.75 \pm 129.18 ^a	323.08 \pm 36,70 ^b	576.52 \pm 80.76 ^{a,c}
	OLI-P	718.20 \pm 239.29 ^a	94,41 \pm 151.46 ^a	628.90 \pm 172,35 ^b	905.09 \pm 30.31 ^b	553.44 \pm 27,69 ^c	722.13 \pm 94.62 ^c
Ac. ACETICO	CONTROL	300.48 \pm 78.82 ^a	586.56 \pm 170,94 ^{a,b}	615.01 \pm 85,51 ^a	341.10 \pm 85.48 ^a	347.31 \pm 28,48 ^{a,b}	482.80 \pm 61.26 ^a
	MUC	632.76 \pm 246.33 ^b	368.-68 \pm 123,77 ^a	804.17 \pm 72,47 ^a	490.51 \pm 74.53 ^{a,b}	473.18 \pm 113,74 ^a	460.18 \pm 126.32 ^a
	INU-P	589.16 \pm 200.55 ^b	595.86 \pm 65,83 ^b	666.94 \pm 61,66 ^a	545.18 \pm 145.73 ^{a,b}	401.69 \pm 35,19 ^b	569.35 \pm 59.06 ^a
	OLI-P	441.83 \pm 44.18 ^b	445.07 \pm 10,76 ^{a,c}	635.28 \pm 222,34 ^a	500.16 \pm 50.73 ^b	352.95 \pm 34,96 ^{a,b}	504.94 \pm 38.22 ^a

CON: Dieta Control, MUC: Dieta adiciona con mucilago de OS, INU-P: Dieta adicionada con Inulina (Orafti), OLI-P: Dieta adicionada con la fracción oligosacàrida OLI9

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

La especie *Opuntia streptacantha* es una fuente vegetal no convencional para obtener mucílago con pureza mayor al 90%, empelando el parénquima medular, con rendimientos de extracción superiores a los reportados en otras especies.

Se logró el establecimiento de condiciones de hidrólisis por vía enzimática del mucilago de *Opuntia streptacantha* para la obtención de fracciones oligosacáridas menores a 1000 Da utilizando distintas enzimas: α -amilasa pancreática y dextranasa.

Los estudios *in vitro* demostraron que las tres fracciones evaluadas (OLI1, OLI5 y OLI9) estimularon el crecimiento de los prebióticos comerciales utilizados *Lactobacillus acidophilus* (LaA), *Lactobacillus casei* (LaC) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BiL).

El comportamiento del crecimiento celular de las cepas probióticas al metabolizar las fracciones oligosacáridas purificadas fue similar el de INU (Inulina), el cual es un prebiótico comercial.

La disminución del pH en el medio tiene relación directa con la producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) durante la fermentación.

El tipo de los productos finales de la fermentación (AGCC y ácido láctico) está determinada por la fracción oligosacárida y el tipo de microorganismo probiótico usado.

De los probióticos utilizados pertenecientes al género *Lactobacillus*, LaC presentó un mayor número de productos finales de la fermentación, en el siguiente orden de concentración ácido láctico > ácido propiónico > ácido acético.

El orden de producción de los AGCC fue: ácido acético > ácido láctico > ácido propiónico > ácido fórmico en las fermentaciones con BiL.

Los resultados de la fermentación *in vitro* de las fracciones oligosacáridas purificadas indican que pueden tener potenciales efectos prebióticos.

Se seleccionó OLI9 (GP=4) para los estudios *in vivo* debido a que esta fracción oligosacárida presentó una mayor estimulación LaA y BiL.

OLI9 en la fermentación *in vivo* presentó un potencial efecto bifidogénico al ocasionar la disminución de la población de bacterias del género *Clostridium* y *Bacteroides*.

Se originaron cambios en la microbiota gastrointestinal de las ratas Wistar utilizadas como modelo de estudio al administrar en las dietas la fracción oligosacárida OLI9 y mucilago.

Estos resultados indican que el mucílago de una cactácea, como el nopal *Opuntia streptacantha*, así como las fracciones oligosacáridas obtenidos mediante vía enzimática pueden presentar efectos prebióticos y pueden utilizarse como fuente natural de compuestos funcionales.

.

9. RECOMENDACIONES



9. RECOMENDACIONES

El trabajo experimental efectuado en esta investigación correspondió a los objetivos establecidos. Debido a la importancia del tema en la obtención y caracterización de moléculas funcionales, se considera profundizar en los siguientes puntos:

Identificar los azúcares constituyentes de las fracciones oligosacáridas, así como el tipo de enlace glicosídico.

Escalar el proceso de obtención de las fracciones oligosacáridas.

Evaluar diferentes concentraciones de las fracciones oligosacáridas en estudios *in vivo* para determinar cambios en las poblaciones bacterianas de la microbiota gastrointestinal.

Proponer un diseño de un alimento prototipo adicionado de las fracciones oligosacáridas.

10. BIBLIOGRAFÍA



10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Trainmesse, S., Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advances Drug Delivery Reviews*. 58(15):1688-1713.
- Abraján-Villaseñor, M. A. (2008). Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Adom, D., Nie, D. (2013). Regulation of Autophagy by Short Chain Fatty Acids in Colon Cancer Cells. In: *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* Edited by Bailly, Y. InTech.
- Ahrné, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A.E., Molin, G. (1998). The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology*. 85:88-94.
- Altermann, E., Russell, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T.R. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(11): 3906–3912.
- Amin, E. S., Awad, O. M., El-Sayed, M. M. (1970). The mucilage of *Opuntia ficus indica*. *Carbohydrate Research*. 15:159-161.

- Amin, M., Jorfi, M., Khosravi, A.D., Samarbafzadeh, A.R., Sheikh, F.A. (2009). Isolation and identification of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* from plant by PCR and detection of their antibacterial activity. *Journal of Biological Sciences*. 9(8):810-814.
- Anaya-Pérez M.A. (2001). History of the use of *Opuntia* as forage. In: Mondragon-Jacobo, C. and Perez-Gonzalez. *Cactus (Opuntia spp.) as forage*. FAO Plant Production and Protection Paper. Eds. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 5-12.
- Anderson, E. (2001). *The cactus family*. Portland, Oregon. pp. 200,520.
- AOAC, Official methods of analysis. 14th Ed. Association of official Analytical Chemists. Washington, D. C., U. S. A.
- 14.003 (1984) de la AOAC (Humedad)
- 14.006 (1984) de la AOAC (Cenizas)
- 42.014 (1970) de la AOAC (Nitrógeno total)
- 7.062 (1984) de la AOAC (Extracto etéreo)
- Arias, S., Gama-López, S., Guzmán-Cruz, L.U., Vázquez-Benítez, B. (2012) *Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 95. Cactaceae Juss.* Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arreola, N. H. J. (1997). Formas de vida y características morfológicas. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. *Suculentas mexicanas Cactáceas*. CVS Publicaciones. México. pp. 27-31.
- Azaola, A., Bustamante, P., Huerta, S., Saucedo, G., González, R., Ramos, C., Saval, S. (1999). Use of surface response methodology to describe biomass production of *Bifidobacterium infantis* in complex media. *Biotechnology Techniques*. 13, 93–95.

- Badui, D. S. (1999) *Química de los alimentos*. Editorial Universidad Alambra, Mexico.
- Balto, A.S., Lapis, T.J., Silver, R.K., Ferreira, A.J., Beaudry, C.M., Lim, J., Penner, M.H. (2016). On the use of differential solubility in aqueous ethanol solutions to narrow the DP range of food-grade starch hydrolysis products. *Food Chemistry*. 197:872-880.
- Barlett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. (1990). Chapter 6: Summary of specific characterization, pp: 49-77. In: *Yeasts: characteristics and identification*, Cambridge Univ. Press, Cambridge,UK.
- BeMiller, J. N.; Whistler, R. L. *Carbohydrates*. (1996). In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*, 3a Ed., Marcel Dekker, New York. pp 174-178.
- Benkeblia. N. (2013). Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants food crops. *Journal of Chromatography*. 1313:54-61.
- Bernalier A., Doré, J., Durand, M. (1999). Biochemistry of fermentation. In *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. 37-53. The Netherlands: Kluwer academic Publishers.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A., Juśkiewicz, J., Wróblewska, M. (2002). Effect of non-digestible oligosaccharides on gut microecosystem in rats. *Food Research International*. 35, 139-144.
- Binder, H. J., Cummings, J. H. Soergel, K. H. (editors) (1994). *Falk Symposium 73. Short Chain Fatty Acids*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, citado en: Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Robertfroid, M., Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*. 80 (Suppl 1) S147-S171.

- Blaut, M. (2002). Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition* 41(1): 1/11-1/16.
- Bot, A., Erle, U., Vreeker, R., Agterof, W.G.M. (2004). Influence of crystallisation conditions on the large deformation rheology of inulin gels. *Food Hydrocolloids* 18:547–556.
- Botelho-Cunha, V.A. et al. (2010) Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of galacto-oligosaccharides. *Biochem. Eng. J.* 50:29–36.
- Bouhnik, Y., B. Flourie, C. Andrieux, N. Bisetti, F. Briet and Rambaud, J.C. (1996a). Effects of *Bifidobacterium* sp fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *J Clin.Nutr*, 50: 269-273.
- Bouhnik, Y., Flourié, B. Riottot, M., Besitti, N., Gailing, M.F., Guibert, A., Rambaud, J.C. (1996). Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutrition and Cancer*. 23(1):21-29.
- Bustamante, C.P., Mayorga, R. L., Ramírez, S. H., Martínez, C. P., Barranco, F. E., Azaola, E. A. (2006). Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37:002, 5-10.
- Cárdenas, A., Higuera-Ciapara, I. y Goycoolea, F. (1997). Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) mucilage in solution. *Journal Professional Association Cactus Development* 2: 152-159.
- Claesson, M.J., van Sinderen, D., O'Toole, P.W. (2007). The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*. 269(1):22–28.
- Cleemput, G., van Oort, M., Hessing, M., Bergmans, M. E. F., Gruppent, H., Grobet, P. J., Delcour, J.A. (1995). Variation in the Degree of D-Xilose Substitution in Arabinoxylans Extracted from a European Wheat Flour. *Journal of Cereal Science*. 22, 73-84.

- Clifford, S. C., Arndt, S. K., Popp, M., Jones, H. G. (2002). Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (*Rhamnaceae*): localitation, composition and physiological roles during drought-stress. *Journal of Experimental Botany*. 53:336. pp. 131-138.
- Clydesdale, F. (2004) Functional foods: opportunities and challenges. *Food Tech*. 58(12):35-40.
- Cummings, J. H. (1995). Short chain fatty acids. In: *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*.. GR Gibson and GT Macfarlane, editors. Boca Raton FL: CRC Press. Citado en: Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruautl, M. C., Cummings, J.H., Frank, A. pp. 101-130.
- Cummings, J. H., Roberfroid, M. B., Anderson, H., Barth, C., Ferro-Luzzi, A., Ghos, Y., Gibney, M., Hermons, K., James, W. P. T., Korver, O., Lairon, D., Pascal, G., Voragen, A. G. (1997). A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. *Paris Carbohydrate Group European Journal of Clinical Nutrition*, 51(7):417-423.
- Cummings, J. H., Rombeau, J. L., Sakata, T. (editors) (1995). *Physiological and Clinical Aspects of Short Chain Fatty Acids*. Cambridge University Press. Citado en: Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Robertfroid, M., Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*. 80 (Suppl 1) S147-S171.
- Cummings, J.H., Stephen, A.M. (2007). Carbohydrate terminology and classification. Review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 61:1, S5-S18.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhri, U., Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology*. 49(2):173-183.
- de Menezes, C. R., Serrano, S. I., Pavarina, E. C., Guímaro, D. E. F., Guímaro, D. F., Grossman, M. J., Durrant, L. R. (2009). Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis

of xylan by the white-rot fungi *Pleurotus*. International Biodeterioration · Biodegradation. 63, 673-678.

de Vuyst, L., Moens, F., Selak, M., Riviere, A., Leroy, F. (2013). Summer Meeting 2013: growth and physiology of bifidobacteria. Journal Applied Microbiology. 116:477-491.

Defloor, I., Vandenreyken, V., Grobet, P.J., Delcour, J.A. (1998). Fractionation of maltodextrins by ethanol. Journal of Chromatography. 803:103-109.

Delattre C, Michaud P, Courtois B, Courtois J: Oligosaccharides engineering from plants and algae applications in biotechnology and therapeutics. Minerva Biotechnol 2005, 17:107-117.

Delzenne, N. M. (2003). Oligosaccharides: state of the art. Proceedings of the Nutrition Society. 62, 177-182.

Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry. Vol. 28-3. pp. 350-356.

Dupree, P., Sherrier, D.J. (1998). The plant Golgi apparatus. Biochem Biophys,Acta. 1404:259-270.

Erkmen, O., Bozoglu, T.F. (2016). Food Microbiology: Principles Into Practice, 2 Volume Set. Ed. John Wiley & Son.

Espinosa-Martos, I., Rupérez, P. (2006). Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. Nutrición Hospitalaria. 21:92-96.

Falony, G., Lazidou, K., Verschaeren, A., Weckx, S., Maes, D., De Vuyst, L. (2009). *In Vitro* Kinetic Analysis of Fermentation of Prebiotic Inulin-Type Fructans by *Bifidobacterium* Species Reveals Four Different Phenotypes. Applied and Environmental Microbiology. 75(2):454-461.

- Fang, Z., Bhandari, B. (2012). Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. En. Garti, N., McClements, J. (2012) Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceutical. Cambridge, UK. Woodhead Publishing Limited.
- Farooq, U., Mohsin, M., Liu, X, Zhang, H. (2013). Enhancement of Short Acid Production from Millt Fibres by Pure Cultures of Probiotic Fermentation. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 12(2):189-194.
- Felis, G. E., Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. Current Issues in Intestinal Microbiology. 8:44–61.
- Fernando, W. M. A. D. B., Brennan, C. S., Flint, S., Ranaweera, K. K. D. S., Bamunuarachchi, A., Morton, H.R. (2010). Enhancement of short chain fatty acid formation by pure cultures
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition. 87(2): S287–S291.
- García-Cruz, E.E., Rodríguez-Ramírez, J., Méndez-Lagunas, L.L., Medina-Torres, L. Rheological and physical properties of spray-dried mucilage obtained from *Hylocereus undatus* cladodes. Carbohydrates Polymers. 91:394-402.
- Gibson, G. R. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. British Journal of Nutrition. 80 (Suppl 4): S209-S212.
- Gibson, G. R., Scott, K.P. Rastall, R. A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A., Gareau, m., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Ealker, C., Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods 7:1–19.

- Gibson. G. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125, 1401-1412.
- Godorska, K., Nowak, J., Czarnecki, Z. (2008). Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 7(2):5-20.
- González-Rodríguez, I., Gaspar, P., Sánchez, B., Guimonde, M., Margolles, A., Neves, A. R. (2013). Catabolism of glucose and Lactose in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Studied by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. *Applied and Environmental Microbiology*. 79(24):7628-7638.
- Goulas, A.K., Grandison, A.S., Rastall, R.A. (2003). Fractionation of oligosaccharides by nanofiltration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83(7):675-680.
- Greenwood, C.T. (1976). Starch. *Advances in cereal science and technology*. 1(3). Ed. Pomeranz, Y. American Association of Cereal Chemists. USA.
- Gullón, B., Gullón, P., Sanz, Y., Alonso, J. L., Parajó, J.C. (2011). Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT-Food Science and Technology*. 44:1687-1696.
- Hao, W-L-. Lee, Y-K. (2000). Microflora of the Gastrointestinal Tract. In: *Public Health Microbiology. Methods and Protocols*. Ed. Spencer, J.F.T., de Spencer., A.L.R. Vol.268. Argentina. pp.491-502.
- Hijova, E., Chmelarova, A. (2007). Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislava Medical Journal*. 108(8):354-358.

- Hodge, J.E., Hofreiter, B.T. (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L., Eds., *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, 380-394.
- Hu, B., Gong, Q., Wang, Y., Ma, Y., Li, J., Yu, W. (2006). Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe*. 12, 260-266.
- Izydorczyk, M. (2005). Understanding the chemistry of food carbohydrates (Ch 1). In: *Food Carbohydrates; Chemistry, Physical Properties, and Applications*. Ed. Cui, W.S. New York: CRC Press.
- Johnson, I. T. (2004). New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutation Research*. 551:9-28.
- Kandler, O. (1983), Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 49-209-224.
- Kaur, N. and Gupta A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Review. *Journal of Biosciences*. 27, 703-714.
- Kokate, C.K., Purohit, A.P., Gokhale, S.B. (2002). *Nutraceutical and Cosmaceutical. Pharmacognosy*, 21st edition, Pune, India: Nirali Prakashan, pp 542–549
- Ku, Y., Jansen, O., Oles, C. J., Lazar, E. Z., Rader, J. I. (2003). Precipitation of inulins and oligoglucose by ethanol and other solvents. *Food Chemistry*. 81, 125-132.
- Le Blay, G., Michel, C., Blottière, H. M., Cherbut, C. (1999). Prolonged intake of fructo-oligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and persistent increase in cecal butyrate in rats. *The Journal of Nutrition*. 129, 2231-2235.

- León-Martínez, F.M., Méndez-Lagunas, L.L., Rodríguez-Ramírez. (2010). Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydrate Polymers*. 81:864-870.
- Li, M., Li, G., Shang, Q., Chen, Q., Liu, X., e Pi, X., Zhu., Yin., Wang, X. *In vitro* fermentation of alginate and its derivatives by humen gut microbiota. *Anaerobe*. 39:19-25.
- Ljungh, A., Wadstrom, T. (2009). *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Caister Academic Press. pp: 3-20
- Lopez, H. W., Coudray, C., Levrat-Verny, M., Feillet-Coudray, C., Demigné, C., Rémésy, C. (2000). Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of the phytic acid on mineral homeostasis in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 11, 500–508.
- Luzon, M. D. (1948). Quantitative Determination of Carbohydrates Whit Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*. 148: 254:255.
- Macfarlane, G.T. and Gibson, G.R. (1996). Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine. In: *Ecology and physiology of gastrointestinal microbes: Gastrointestinal fermentation and ecosystems*. Mackie, R.I. and White, B.A. Eds. Chapman and Hall, New York, pp 269-318.
- Mandadzhieva, T., Ignatova-Ivanova, T., Kambarev, S., Illev, I., Ivanova, I. (2011). Utilization of Different Prebiotics by *Lactobacillus* spp. And *Lactococcus*Spp. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 25(4):117-120.
- Manning, T.S., Gibson, G.R. (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. *Pebiotics*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 18(2).287-298.

- Martínez, R.F. (2007). Monografía de nopal tunero. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Puebla. pp. 7-20.
- Martirosyan, D.M., Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. *Functional Foods in Health and Disease*. 5(6):209-223.
- Mayorga-Reyes, L., Bustamante-Camilo, P., A. Gutiérrez-Nava, Barranco-Florido, E., Azaola-Espinosa, A. (2009). Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *Bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8:3, 259-264.
- Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- Mitch, W.E., Ikizler, T.A. (2012). *Handbook of Nutrition and the Kidney*. Lippincott Williams & Wilkins Handbook Series. Philadelphia, USA.
- Montesi. A., García-Albiach, R., Pozuelo, M.J., Pintado, C., Goñi, I., Rotger, R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 98(3):281-289.
- Murphy, O. (2001). Non polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition*. 87:2, S273-S281.
- Murphy, O. (2001). Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. *British Journal of Nutrition*. 85(1):S47-S53.
- Mussatto, M., Mancilla, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharide: A review. *Carbohydrates Polymers*. 68, 587-597.
- Nath, A., Bhattacharjee, C., Chowdhury, R. (2013). An Experimental Study on Simultaneous Synthesis and Separation of Prebiotic Galacto-oligosaccharides using Semi Batch Dead-end

Membrane Bioreactor. 3rd International Conference on Advances in Biotechnology and Pharmaceutical Sciences (ICABPS'2310). January 8-9, 2013 Kuala Lumpur (Malaysia).

Nobel, P., Cavelier, J. y Andrade, J. L. (1992). Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *J. Experiment Botany* 43 (250): 641 - 648.

Oetjen, G.W., Haseley, P. (2004). Frezze-drying. of probiotics on rice fibre. *International Journal of Food Science and Technology*. 45:690-696.

Oleano-Martin, E., Gibson, G.R., Rastall, R. A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*. 93, 505-511.

Oleano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G.R., Rastall, R. A. (2000). In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*. 83, 247-255.

Palframan, R. J., Gibson, G.R., Rastall, R. A. (2003). Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 4, 71-75.

Pandey M, Verma RK, Saraf SA (2010) Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 3(1):11–15.

Paupard, J.A., Husain, I., Norris, R.F. (1973). Biology of the Bifidobacteria. *Bacteriological Reviews*. 37(2):136-165

Philips, G. O., Williams, P.A. (2000). Handbook of hydrocolloids. Abington Hall, Abington. England. pp. 1-19.

Pimienta, E., 1990. El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara, México, 246pp.

- Playne, M. J., Crittenden, R. (1996). Commercially available oligosaccharides. *Bulletin of the IDF*. 313, 10-22.
- Rao, V.A. (2001) The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. *Nutrition Research* 21, 843–848.
- Reyes-Reyes, M. (2009). Caracterización química, física y funcional del mucílago de *Opuntia streptacantha* y obtención de oligosacáridos. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.
- Roberfroid, M. B. (1993). Dietary fiber, inulin, and oligofructose – a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33, 103-148.
- Roberfroid, M. B., Gibson, G. R., Delzenne, N. (1993). Biochemistry of oligofructose, a non-digestible fiber: an approach to calculate its caloric value. *Nutritional Reviews*, 51(5): 137-146.
- Roberfroid, M., Slavin, J. (2000). Non digestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 46, 461-480
- Roberfroid, M.B. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs?. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73(2):406s-409s.
- Rowland, I.R., Tanaka, R. (1993). The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *Journal of Applied Microbiology*. 74(6):667-674.
- Rycroff, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotics oligosaccharides. *Journal of Applied Bacteriology*. 91: 878-887.

- Saenz, C., Pak, N., Sepulveda, E., Lecaros, M., (1997). Caracterizacion de harina de cladodios de nopal. Citado en: *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. (2004). Journal of Arid Environments. 57:257-290.
- Sáenz, C., Vásquez, M., Trumper, S., Fluxá, C. (1992). Extracción y composición química de mucílago de tuna (*Opuntia ficus indica*). Actas: II Congreso Internacional de la tuna y cochinilla. Santiago, Chile. 93–96.
- Saha, D., Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. Journal of Food Science and Technology. 47(6):587-597.
- Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. (1999). Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. International Dairy Journal. 9:1, 69-80.
- Sami Labs—pioneer in nutraceuticals Aug 05, 2002. The Hindu Newspaper; Available from: <http://www.hinduonnet.com/thehindu/biz/2002/08/05/stories/2002080500040200.htm>
- Sanz, M.L. and Martinez-Castro, I. (2007) Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. J Chromatogr. A 1153:74–89.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. 134:577-594.
- Scholz-Ahrens, K.E., Schrezenmeir, J. (2002). Inulin, oligofructose and mineral metabolism – experimental mechanism. British Journal of Nutrition 87:2, S179–S186.
- Sen, D., Gosling, A., Stevens, G.W., Bhattacharya, P.K., Barber, A., Kentish, S.E., Bhattacharjee, C., Gras, S.L. (2011). Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation. Food Chemistry. 128:773-777.
- Sepúlveda, E., Saénz, C., Aliaga, E., Aceituno, C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. Journal of Arid Enviroments. 68:534-545.

- Shah, N.P., (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83(4):894–907.
- Simon, G. L., Gorbach, L. D. (1986). The human intestinal microflora. *Digestive Diseases and Science* 31 (Suppl 9):147S-162S.
- Smiricky-Tjardes, M. R., Flickinger, E. A., Grieshop, C. M., Bauer, L. L., Murphy, M. R., Fahey, Jr, G. C. (2003). In vitro fermentation characteristics of selected oligosaccharides by swine fecal microflora. *Journal of Animal Science*. 81, 2505-2514.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Biological Chemistry*. Vol. 195. pp 19-23.
- Srivastava B. K., Pande C. S. (1974). Arabinogalactans from ponds of *Opuntia dillenii*. *Planta medica*, 25:92-97.
- Stewart, M.L., Timm, D.A., Slavin, J.L. (2008). Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. *Nutrition Research*. 28:329-334.
- Sudzuki, F., Muñoz, C., Berger, H. (1993). El cultivo de la tuna Cactus pear. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales Universidad de Chile.
- Swennen, K., Courtin, C. M., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Delcour, J. A. (2005). Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharidos with different structures. *Carbohydrate Polymers*. 62, 283-292.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A.N., Mackay, C.R., Macia, L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology*. 121:91-119.
- Tannok, G.W. (1983). Effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. In: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease* (Hentges, D.J.. Ed). Academic, London. p 517.

- Topping, D. L. (1996). Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 5:15-19.
- Trachtenberg S., Mayer A. M. (1982). Quantitative autoradiography of mucilage secretion in *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. *Biology Cell*, 44:69-76.
- Trachtenberg, S., Fahn, A. (1981). The Mucilage Cells of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.- Development, Ultrastructure, and Mucilage Secretion. *Botanical Gazette*. 142(2):206-213.
- Trachtenberg, S., Mayer, A. M. (1981). Composition and Properties of *Opuntia ficus indica* mucilage. *Phytochemistry*. 12(20):2665-2668.
- Van de Kamer, J. H., Van Ginkel, L. (1952). Rapid determination of crude in cereals. *Cereal Chemistry*. 29:239-251.
- Van Dokkum, W., Wezendonk, B., Srikumar, T.S., van del Heuvel, E. G. H. M. (1999). Effect of nondigestible oligosaccharides on large-bowled functions, blood lipid concentration and glucosa absorption in young healthy male subjects. *Europe Journal of Clinical Nutrition*. 53:1-7.
- Van Loo, J., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkings, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Robertfroid, M., van Vliet, T., van den Heuvel. (1999). Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*. 81: 121-132.
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 328–335.
- Vulevic, J., Rastall, R. A., Gibson, G. R. (2004). Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*. 236: 153-159.

- Wang, Y., Han, F., Hu, B., Li, J., Yu, W. (2006). In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutrition Research*. 26, 597-603.
- Watanuki, M., Wada, Y., & Matsumoto, K. (1996). Digestibility and physiological heat of combustions of β 1-4 and β 1-6 galacto-oligosaccharides *in vitro*. *Annual Reports of the Yakult Central Institute for Microbiological Research*, 16:1-12 (in Japanese).
- Weisburger, J. H., Grantham, P.M., Horton, R. E., Weisburger, E. K. (1970). Metabolism of the carcinogen N-hydroxy-N-2-fluorenyl-acetamine in germ free rats. *Biochemical Pharmacology*. 19:151-162.
- Wrolstad, R.E. (2011). *Food Carbohydrate Chemistry*. Volume 48 of *Institute of Food Technologists Series*. Ed. John Wiley & Son.

El jurado designado por el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprueba la tesis que presenta para su examen final de Doctora en Ciencias en la especialidad de Biotecnología, la C. Mónica Reyes Reyes, el día 18 de septiembre del año dos mil dieciocho

Dra. Emma Gloria Ramos Ramírez

Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya

Dr. Fernando Esparza García

Dr. Graciano Calva Calva

Dra. Lorena Rodríguez Páez