

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA Área Académica de Química

Sobrevivencia y capacidad antihipertensiva de Lacticaseibacillus rhamnosus GG en un producto lácteo fermentado simbiótico

Tesis que para obtener el grado de Licenciado en Química de Alimentos Presenta:

Jorge Eduardo Leonel Enríquez

Director

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Codirectora

Dra. Laura Berenice Olvera Rosales

Septiembre-2023



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 12 de octubre de 2023

Número de control: ICBI-D/1496/2023 Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución. Por este medio le comunico que el Jurado asignado al Pasante de la Licenciatura en Química de Alimentos Jorge Eduardo Leonel Enríquez, quien presenta el trabajo de titulación "Sobrevivencia y capacidad antihipertensiva de Lacticaseibacillus rhamnosus GG en un producto lácteo fermentado simbiótico", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Elizabeth Contreras López

Secretario: Dr. Emmanuel Pérez Escalante

Vocal: Dr. Luis Guillermo González Olivares

Suplente: Dra. Laura Berenice Olvera Rosales

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamer "Amor, Orden

Dr. Otilio Arturo Adevedo Sand

Director del IOB

OAAS/YCC













Ciudad del Conocimiento Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184 Teléfono: 771 71 720 00 ext. 2231 Fax 2109

direccion_icbi@uaeh.edu.mx

Agradecimientos

A mis padres que siempre me han apoyado e impulsado en cada decisión que he tomado y nunca me dan la espalda. Gracias por su comprensión y estímulo constante, por la oportunidad de convertirme en un profesionista y así dejarme la mejor herencia que me pudieron dar. ¡Muchas gracias! por dotarme de las herramientas necesarias para enfrentar la vida.

Al doctor Luis Guillermo por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por confiar en mí, por cada una de las charlas llenas de consejos y motivación, por ver en mi potencial y hacérmelo saber. De igual manera le agradezco por su apoyo incondicional y por su amistad. Por último, gracias por obligar a todo su equipo de laboratorio a integrarme y así darme nuevos amigos.

A Emmanuel, Laura y Lulú. Comienzo dándote las gracias a ti Emmanuel por tu amistad, por hacerme parte del laboratorio, gracias por tus múltiples palabras de aliento cuando más las necesite; gracias por escucharme.

Gracias Lau por guiarme desde el día uno, por hacerme sentir en confianza y enseñarme mucho de lo que aprendí en el laboratorio con tanta paciencia y esmero. Gracias por ver en mi cualidades que difícilmente yo hubiese visto.

Finalmente pero no menos importante; gracias Lulú por ser una gran compañera en el laboratorio, por tu apoyo, por cada plática y por hacerme parte de la familia GYPU.

A mis compañeros que marcaron positivamente esta gran experiencia de ser universitario, por las risas, las aventuras y grandes momentos que quedarán para toda la vida. Gracias por estar ahí y por así poder cerrar satisfactoriamente este capítulo de mi vida.

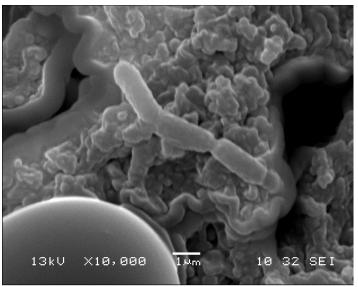
Índice

	Resumen 1							
1.	Marco teórico 2							
	1.1	La lech	ne como materia prima de productos lácteos fermentados	2				
	1.2	Bacteri	ias ácido lácticas (BAL) y probióticos	4				
		1.2.1	El papel de los probióticos en los alimentos funcionales	5				
		1.2.2	Lacticaseibacillus rhamnosus GG en la industria láctea	6				
	1.3	El siste	ema proteolítico de bacterias lácticas	7				
		1.3.1	Los péptidos bioactivos antihipertensivos liberados por					
			bacterias lácticas y su efecto sobre la tensión arterial	9				
	1.4	Los pro	Los prebióticos en la industria láctea: importancia tecnológica y en					
		salud humana						
		1.4.1	El aguamiel: una bebida con potencial prebiótico	15				
		1.4.2	, ,	17				
	1.5	Los ali	mentos simbióticos	18				
2	Just	tificació	on Control of the Con	20				
3	Hipá	ótesis		21				
4	Obje	etivos		22				
	4.1	Objetiv	o general	22				
	4.2	Objetiv	os específicos	22				
5	Met	odologí	a	23				
	5.1	Obtend	ción y análisis del aguamiel	23				
	5.2	Produc	cción del jarabe de aguamiel	23				
	5.3							
		aguam	iel y jarabe de aguamiel por HPLC	23				
	5.5	Cinétic	a de fermentación	24				
		5.4.1	Adaptación y preparación del cultivo iniciador	24				
		5.4.2	Preparación de los sistemas de fermentación	24				
		<i>5.4.3</i>	Muestreo y preparación de muestras	25				
		5.4.4	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	25				
		5.4.5	Cuantificación de Lacticaseibacillus rhamnosus GG	26				
	5.5	Perfil p	proteolítico	26				
		5.5.1	Determinación de grupos amino libres	26				
		5.5.2	Separación de péptidos por electroforesis en gel de					
			poliacrilamida (Tris-Tricina-SDS-PAGE)	27				
		5.5.3	Separación de fracciones peptídicas por HPLC a través de					
		_	excusión de tamaño	28				
	5.6		ninación de la capacidad antihipertensiva por medio del					
			s de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina					
_	_	(ECA)		29				
6.			y discusiones	30				
	6.1		s del aguamiel y del jarabe de aguamiel	30				
	6.2		as de fermentación	32				
	6.3		proteolítico	35				
		6.3.1	Determinación de grupos amino libres	35				

		6.3.2	Separación de fracciones peptídicas por Tris-Tricina-SDS-	
			PAGE	37
		6.3.3	Separación de péptidos por HPLC por exclusión molecular	38
	6.4	Determ	ninación de la capacidad antihiperensiva	42
7.	Conclusiones			44
8.	Refe	erencias	3	45

Resumen







Resumen

En la actualidad la salud humana en conjunto con la seguridad alimentaria ha tomado una creciente importancia por su relación directa con el acelerado crecimiento poblacional, el cual ha generado que muchos problemas salud se hayan incrementado también. Así es que se han elaborado productos con efecto más allá de la nutrición básica, tal como los denominados simbióticos.

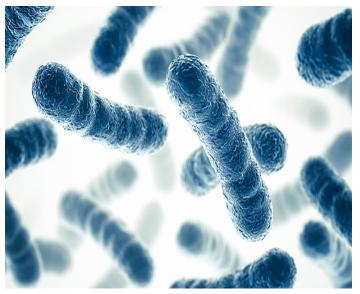
Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la presencia de jarabe de aguamiel en un producto lácteo fermentado simbiótico en cuanto a la liberación de péptidos con capacidad antihipertensiva y en la sobrevivencia de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG.

Se usó jarabe de aguamiel concentrado a 70°Bx, determinando la concentración de oligosacáridos por HPLC. Se enriquecieron soluciones de leche descremada en polvo al 10% con el 2% de fuente de carbono proveniente del jarabe preparado. Usando inulina como control. La fermentación se realizó durante 48 horas midiendo sobrevivencia del probiótico y la actividad metabólica por medio de los análisis de pH y producción de ácido láctico. El perfil proteolítico fue determinado por medio del análisis de grupos amino libres por TNBS, separación de péptidos por SDS-PAGE y fraccionamiento peptídico por HPLC. La actividad antihipertensiva se determinó evaluando la inhibición de actividad de la enzima convertidora de angiotensina.

Los resultados no mostraron diferencia en los parámetros metabólicos analizados ni en la concentración de grupos amino libres. Sin embargo, la concentración de péptidos de bajo peso molecular fue superior en la fermentación con jarabe de aguamiel que en el control corroborando con la separación por HPLC. Esto coincidió con la mayor actividad antihipertensiva (45.3 %) en el simbiótico con jarabe de aguamiel.

Estos resultados reflejan la incidencia del jarabe de aguamiel en productos lácteos fermentados con microorganismos probióticos para realizar un alimento simbiótico. Este derivado del aguamiel permite la viabilidad de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG similar a la inulina y ejerce sus efectos benéficos activando la producción de péptidos de bajo peso molecular derivando en una mayor capacidad antihipertensiva.

Marco teórico







1. Marco teórico

1.1 La leche como materia prima de productos lácteos fermentados.

El CODEX alimentario define a la leche como "...secreción mamaria normal de animales lecheros, obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo en forma de leche líquida o a una elaboración posterior" (CODEX STANDARD 206-1999). La leche es un sistema coloidal heterogéneo (Fig. 1) compuesto por tres sistemas: un sistema de dispersión, una emulsión y una suspensión. Además, la leche está compuesta en general de glóbulos de grasa, caseína, lactosa, trazas de calcio, fósforo y compuestos de potasio, proteínas, ácidos orgánicos y algunas vitaminas (Ebringer et al., 2008).

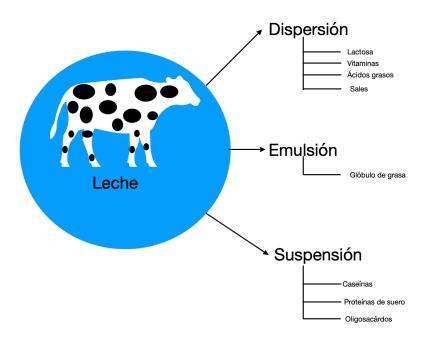


Fig 1. Estados coloidales de los componentes de la leche

La capacidad tecnológica de la leche como materia prima ha evolucionado con el tiempo. Debido a sus características fisicoquímicas y su valor nutricional, también ha sido utilizada para la elaboración de diversos productos que van desde los ancestrales mantequilla y queso hasta productos lácteos fermentados (Silveira *et al.*, 2003).

La leche puede sufrir procesos bioquímicos como la fermentación, donde su alto contenido de la lactosa se convierte en ácido láctico. Durante este proceso se generan diferentes compuestos. Además del lactato, hay producción de acetato, etanol y CO₂. Así mismo, las proteínas propias de la leche son hidrolizadas debido al metabolismo propio de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Jay, 2005).

Los productos lácteos fermentados son el resultado de la fermentación de la leche causada por la inoculación de microorganismos específicos como las BAL. Dentro de estos microorganismos se encuentran principalmente, bacterias de los géneros *Lactobacillus, Lactococcus* y *Streptococcus* (Tabla 1), los cuales al ser adicionados a productos lácteos fermentados han sido relacionados con efectos benéficos a la salud (Sakandar *et al.*, 2021).

Tabal 1. Bacterias ácido lácticas y probióticos utilizados para la fabricación de bebidas lácteas fermentadas y su efecto en la salud humana

Producto lácteo	Bacteria ácido láctica o probiótica	Beneficio probado
Koumiss	L. rhamnosus LV108, L. casei grx08, L. fermentum grx08, L. fermentum WW, L. fermentum MTCC, Streptococcus thermophilus spp.	Reducción de colesterol y presión arterial
Leche fermentada	L. plantarum B7, L. rhamnosus S1K3, L. paracasei ST11, L. casei 431, L. plantarum nF1, L. delbrueckii ssp. bulgaricus OLL1073R-1, Bifidobacterium animalis subsp. Lactis GCL2505, L. rhamnosus, B. breve Yakult	Reducción de la concentración de Salmonella, erradicación del virus de la influenza, incremento en la concentración de bifidobacterias, Incremento de IgA, decremento en IgG, IgG 1, IgE, modulación de la microbiota intestinal, reducción de fenol
Yogur simbiótico	L. casei, L. reuteri, L. rhamnosus GG, and S. boulardii	Modulación de la microbiota intestinal
Kefir	L. kefiri, L. casei Zhang	Modulación de la microbiota intestinal
Suero fermentado	S. thermophilus 2 K, L. delbrueckii bulgaricus BK, S. thermophilus 2 K, L. bulgaricus BK, L. plantarum W42, B. lactis Bi30	Decremento en inflamación intestinal y estrés oxidativo

Adaptado de Sakandar et al., 2021

El efecto químico principal de estos microorganismos en la leche, es la disminución del pH del producto que dependiendo del pH alcanzado tendrá o no, precipitación isoeléctrica de las proteínas (Tamimé, 2006). Este proceso de fermentación se realiza con diferentes fines: aumento de la vida de anaquel, mejora o producción de características organolépticas como sabor, olor y mejora en la digestibilidad de la leche, por la degradación tanto de lactosa como de proteínas (caseínas) (Bamforth y Cook, 2019).

1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL) y probióticos

Las BAL son un grupo de bacterias estrechamente relacionadas entre sí dado que producen ácido láctico como el principal o único producto de fermentación a partir de hexosas y pentosas. Las BAL no cuentan con un ciclo de Krebs funcional, no forman esporas, no tienen motilidad, son anaerobias o aerobias facultativas, son ácido tolerantes, son Gram positivos y son catalasa-negativas (Bamforth y Cook, 2019).

Tomando en cuenta los productos de la fermentación, las BAL pueden clasificarse en: homofermentativas (BAL-HM) o heterofermentativas (BAL-HT). Las BAL-HM producen principalmente ácido láctico a partir de la glucosa y obtienen el doble de energía que las BAL-HT. Se llama homofermentativa a una cepa cuando metaboliza glucosa, pero no se considera homofermentativa cuando metaboliza pentosas. Todas las especies de los géneros *Pediococcus, Streptococcus, Lactococcus*, y *Vagococcus* al igual que algunas especies del género *Lactobacillus* son BAL-HM (Jay, 2005; Tamimé, 2006)

Las BAL-HT producen cantidades molares equivalentes de ácido láctico, CO₂ y etanol. Suelen desplazar a las BAL-HM al modificar ciertas condiciones de crecimiento óptimas tales como: concentración de glucosa, pH y disponibilidad de ciertos nutrientes. Además, las BAL-HT producen más compuestos responsables del aroma (acetaldehído y diacetilo, etc.) que las BAL-HM (Jay, 2005; Tamimé, 2006).

Los probióticos, aunque no exclusivamente, pertenecen al grupo de las BAL. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los probióticos como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio determinado para la salud del huésped". En relación con los alimentos, esta

definición se reajusta enfatizando que el efecto beneficioso es ejercido por los microorganismos "cuando se consumen en cantidades adecuadas como parte de los alimentos" (FAO/OMS 2001). Se ha reportado que el rango de concentracion entre 10⁹ y 10¹², es el rango más adecuado para que un probiótico al ser consumido ejerza su acción benéfica (Zendeboodi *et al.*, 2020).

El número de especies microbianas que pueden ejercer propiedades probióticas es muy extenso pero los géneros *Lactococcus* y *Bifidobacterium* así como algunas especies de *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis*, son las BAL más importantes comercial y tecnológicamente hablando (Felis y Dellaglio, 2007).

1.2.1 El papel de los probióticos en los alimentos funcionales

Los alimentos funcionales con una gran relevancia actual que tienen el soporte de estudios científicos son aquellos que en su composición tienen microorganismos probióticos. El yogur fresco y las demás leches fermentadas que no han sufrido un tratamiento térmico posterior a la fermentación cumplen las características requeridas para considerarse un alimento probiótico. Así mismo, podrían considerarse funcionales según los criterios establecidos por la FAO (FAO, 2006).

Las bacterias probióticas que son utilizadas tecnológicamente en alimentos deben de tener la capacidad de sobrevivir durante el proceso digestivo y proliferar en el intestino. Como probióticos se utilizan fundamentalmente los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Olagnero *et al.*, 2007). Sin embargo, la sobrevivencia de un probiótico está supeditada por factores externos y medio ambientales que provocan su muerte o bien una baja viabilidad. Dentro de los factores físicos y químicos que provocan la muerte celular están la temperatura de almacenamiento, pH, disponibilidad de acarreadores de electrones, en específico de oxígeno, entre otros. Aunque se sabe que la actividad, la sobrevivencia y el crecimiento adecuado de los probióticos está influenciada estrechamente a la presencia de sustancias prebióticas como lo son la inulina, hidrolizados enzimáticos de la inulina, oligofructosacáridos, fructosacáridos, lactulosa, galactooligosacáridos fibra y otros que son su principalmente fuente de energía. (Oliviera y Gonzáles, 2007).

1.2.2 Lacticaseibacillus rhamnosus GG en la industria láctea

Para el caso de *Lacticaseibacillus rhamnosus* se ha progresado mucho desde su descubrimiento y uso inicial en la fermentación de productos lácteos, hasta sus aplicaciones biotecnológicas actuales en ingeniería genética para la producción de diversas proteínas y metabolitos recombinantes. *L. rhamnosus* se ha utilizado durante siglos en la fermentación de alimentos, especialmente queso, yogur, chucrut y similares, lo que hace que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) lo reconozca generalmente como seguro (GRAS). Además de impartir sabor, *L. rhamnosus* GG es una bacteria ácido láctica (BAL) que también produce ácido que conserva los alimentos (Song *et al.*, 2017).

L. rhamnosus GG está asociado a diversas funciones fisiológicas en el ser humano. Sin embargo, cuando se requiere utilizarlo en productos fermentados, sus tiempos de desarrollo son largos. Es por lo que tecnológicamente es un microorganismo poco funcional. Así es que, se han implementado algunas estrategias para su uso tal como la fermentación en cocultivo o la adición de micronutrientes o factores de crecimiento como vitaminas y minerales. Estos estudios han dado cuenta que el enriquecimiento de leche con cisteína, arginina, prolina, asparagina, glutamina guanina, uracilo y xantina es recomendable para reducir los tiempos de fermentación (Sun et al., 2019).

Esta bacteria exhibe la mayoría de las características generalmente deseadas para una buena cepa probiótica, incluida la capacidad de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal humano después de la ingestión y la capacidad de colonizar transitoriamente el íleon y el colon (Doron et al., 2005). De hecho, cepas de *L. rhamnosus* suelen ser colonizadores transitorios del tracto gastrointestinal, pero la cepa GG en específico se adhiere a la mucosidad y las células epiteliales (Lebeer et al., 2007; Hou et al., 2015). Con frecuencia, este microorganismo se usa como probiótico, especialmente en el tratamiento del crecimiento excesivo de bacterias en el intestino debido a sus propiedades ácidas y básicas y que produce exopolisacáridos (Klopper et al., 2018).

Por lo tanto, *L. rhamnosus* GG es un excelente iniciador para la fabricación de leche fermentada. La leche fermentada con este microorganismo tiene muchas funciones

probióticas para adultos y niños. Esta bacteria tiene las ventajas de resistir niveles bajos de pH y tiene una excelente vida útil (Hekmat *et al.*, 2009). También es un posible candidato para la síntesis de acetoína y diacetilo, compuestos de sabor similar a la mantequilla que se utilizan ampliamente en la industria láctea (Jyoti *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayoría de los probióticos, incluido *L. rhamnosus* crecen lentamente en la leche y la tasa de producción de ácido suele ser demasiado lenta para soportar un proceso de fermentación adecuado (Shah, 2000).

En la actualidad, muchos productos lácteos fermentados del mercado se preparan con una sola cepa probiótica, como Yakult (*Lactobacillus casei* cepa Shirota, Yakult, Guangzhou, China), LAJOIE (*Lactobacillus paracasei* LPC-37, Wanjiabao Dairy Co., Ltd., Harbin, China) y Cherita (*L. rhamnosus* GG ATCC 53103, Hebei Fermented Biotechnology Co., Ltd., Beijing, Porcelana). Sin embargo, la viabilidad de probióticos de los productos lácteos fermentados que utilizan una sola cepa probiótica deben ser mucho mayores que los que utilizan cepas mixtas. Además, los productos lácteos fermentados preparados con una sola cepa probiótica tienen largos tiempos de fermentación (Byung-Ju *et al.*, 2005) lo que limita su uso. Sin embargo, muchas de estas bacterias probióticas y en especial *L. rhamnosus* han sido usadas por su capacidad de producir compuestos bioactivos tales como péptidos con diferentes funciones derivado de la acción del sistema proteolítico (Kashyap *et al.*, 2023).

1.3 El sistema proteolítico de bacterias lácticas

La proteólisis es la degradación de las proteínas por acción de un sistema proteolítico. Las BAL poseen un sistema proteolítico que es capaz de reducir a pequeñas subunidades (oligopéptidos, cadenas de aminoácidos o aminoácidos libres) grandes fracciones y estructuras proteicas como lo son las caseínas (Parra, 2010).

Durante la fermentación las BAL utilizan enzimas específicas que inducen la ruptura de enlaces péptidos de fracciones proteicas. Estas enzimas son principalmente proteasas (peptidasas endopeptidasas, aminopeptidasas, y exopeptidasas), las cuales proveen y mejoran la disponibilidad de aminoácidos para la célula bacteriana (Rodríguez *et al.*, 2018). La actividad proteolítica de las BAL tiene una influencia tecnológica en la formación

de compuestos que afectan directamente las características organolépticas, nutricionales, fisicoquímicas y funcionales del alimento en el que se empleen. Es así como suelen producir compuestos como ácidos grasos libres, ácidos orgánicos (acético, propiónico, isobutírico y láctico), acetaldehído, diacetilo, CO₂, etcétera (Toldrá *et al.*, 2018).

Dentro de las BAL mesófilas del género *Lactobacillus* se encuentran las cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, cuyo sistema proteolítico se no ha sido caracterizado completamente (Monzón, 2012). Recientemente Olvera-Rosales *et al.* (2023) han destacado algunos aspectos importantes del sistema proteolítico de este microorganismo y que se detallan a continuación (Fig. 2).

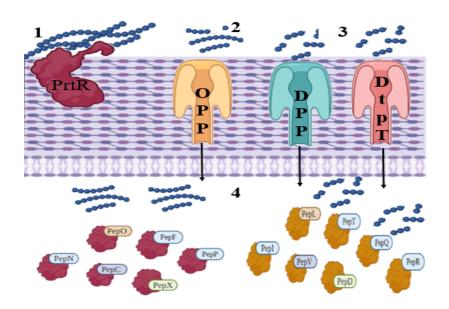


Fig. 2. Sistema proteolítico de Lacticaseibacillus rhamnosus GG. Tomado de Olvera-Rosales et al., (2023).

En *L. rhamnosus* la proteólisis se realiza mayormente a partir de la acción de su proteinasa (PrtR). Los oligopéptidos generados serán transportados a través del sistema OPP, mientras que los dipéptidos y tripéptidos se transportarán a través de los sistemas DPP y DtPT. Finalmente, Los péptidos serán degradados a partir del complejo de endopeptidasas y amino peptidasas intracelulares (PepN, PepO, PepC, PepF,PepX, PepP, PepL, PepT, PepI, PepV, PepD, PepQ, PepR). Una vez que las cepas han cubierto sus auxotrofías, liberarán al medio aquellas secuencias peptídicas que no les sean necesarias. Durante este proceso se forman fracciones pequeñas de proteínas,

aminoácidos libres e incluso péptidos bioactivos, los cuales pueden llegar a tener actividad antihipertensiva (Mayo *et al.*, 2010).

1.3.1 Los péptidos bioactivos antihipertensivos liberados por bacterias lácticas y su efecto sobre la tensión arterial

La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre circulante contra las paredes de las arterias. Cuando esta es demasiado elevada, se considera hipertensión que, al no ser tratada, puede desencadenar diferentes complicaciones (OMS, 2018).

Una de las formas de tratamiento de la hipertensión es el consumo de compuestos o medicamentos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima participa en el mecanismo responsable de la alteración de la presión normal de la sangre, cuando circula a través de las venas y arterias del cuerpo humano. En la alteración de la presión arterial juega un importante papel específicamente el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), en el que a través de una cascada de reacciones enzimáticas se obtienen angiotensina II y aldosterona. (Arenas-Carvajal *et al.*, 2009).

La angiotensina se transforma en angiotensina II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina II es la responsable de regular y mantener la presión sanguínea mediante acciones farmacológicas (Díez, 2017). De igual manera, la angiotensina II tiene propiedades profibróticas y vasoconstrictoras, lo que promueve el remodelamiento miocárdico. El uso de inhibidores de ECA ayuda a prevenir eventos isquémicos y aterogénesis (Jubany y Kuster, 2014).

Los péptidos antihipertensivos son los péptidos bioactivos más estudiados en los alimentos. El mecanismo de acción de estos péptidos está relacionado con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) la cual influye en la regulación de la presión arterial por la modulación del sistema renina-angiotensina. La ECA es una metaloproteasa dependiente de zinc presente en diversos tejidos como los de los vasos sanguíneos, pulmón, riñón y en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos cardiacos). Los péptidos antihipertensivos pueden ser obtenidos por procesos de hidrólisis de proteínas bajo la influencia de enzimas como las producidas por algunos microorganismos fermentativos (Domínguez *et al.*, 2014).

Los péptidos bioactivos antihipertensivos han sido aislados de diferentes fuentes, tanto animales como vegetales. Estas pequeñas fracciones peptídicas pueden ser liberadas durante la elaboración de productos lácteos fermentados o por acción enzimática. En el caso de los cultivos de BAL, estos contienen una gran diversidad de enzimas proteolíticas que son responsables de la actividad y formación de péptidos y aminoácidos en la elaboración de leches fermentadas (Oliviera y González, 2007). De hecho, algunos péptidos bioactivos con capacidad antihipertensiva son los derivados de la hidrólisis de proteínas lácteas (Korhonen y Pihlanto 2006).

Sekiya et al. (1992) fueron de los primeros que abordaron la producción de productos antihipertensivos derivados de proteínas de leche, ya que demostraron que el consumo de 20 g/día de un hidrolizado de caseína con tripsina durante 4 semanas, producía una disminución de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) en pacientes hipertensos. También Nakamura et al. (1995), demostraron que una leche llamada Calpis mostraba efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés). Además, se sabe que los péptidos Val-Pro-Pro (VPP) e ile-Pro-Pro (IPP) son los principales responsables de la actividad antihipertensiva de esta leche (Fitzgerald et al., 2004).

1.4 Los prebióticos en la industria láctea: importancia tecnológica y en salud humana

Además de los probióticos, se encuentran los prebióticos los cuales son cadenas de oligosacáridos que específicamente los probióticos usan como fuente de carbono. Los prebióticos como los fructanos tipo inulina, son el sustrato trófico de los probióticos (Olagnero *et al.*, 2007).

Originalmente, un prebiótico era definido como un ingrediente alimenticio no digerible con beneficios al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y / o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon. Esta definición se mantuvo prácticamente sin cambios durante más de 15 años después de su primera introducción en 1995 por Gibson y Roberfroid. Así es que, solo unos compuestos del grupo de carbohidratos se

han considerado prebióticos, especialmente los ß-fructanos de cadena corta y larga (fructo-oligosacáridos (FOS) e inulina), galacto-oligosacáridos (GOS) y lactulosa.

Sin embargo, en la sexta reunión de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés) realizada en 2008, actualizaron la definición de "prebióticos en la dieta" como "un ingrediente fermentado selectivamente que produce cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped".

De esta manera, se ha definido a un prebiótico como un compuesto no digerible que, a través de su metabolización por microorganismos en el intestino, modula la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, confiriendo un efecto fisiológico beneficioso sobre el huésped. Además de FOS y GOS, se incluyen compuestos como almidones resistentes, pectina, arabinoxilanos (AXOS), granos integrales y compuestos no carbohidratos como los polifenoles (Valcheva y Dielman, 2016).

Recientemente, la importancia de la microbiota intestinal en la salud humana ha sido expuesta como un factor relevante en la prevalencia de diversas patologías. Por lo tanto, existe un interés creciente en ingredientes alimentarios que regulen la microbiota y sus relaciones con el anfitrión. En este sentido, los prebióticos representan una de las sustancias más utilizadas para mantener un microbioma saludable o restablecer su equilibrio cuando la homeostasis bacteriana se ve afectada (Quigley, 2019).

Carbohidratos no digeribles como los polisacáridos (almidón resistente, pectina y dextrina) y oligosacáridos tales como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS), isomaltooligosacáridos (IMO), mananooligosacáridos (MOS), oligosacáridos de rafinosa (RFO), arabinoxilanoligosacáridos (AXOS), lactulosa, inulina y otros se consideran componentes alimentarios con propiedades prebióticas (Colantonio *et al.*, 2019; Mano *et al.*, 2018; Mohanty *et al.*, 2018). En la Fig. 3 se observa la clasificación más general de los ingredientes considerados prebióticos.

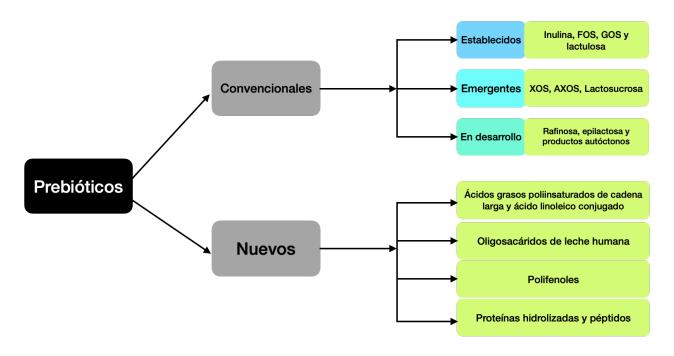


Fig. 3. Clasificación general de ingredientes considerados prebióticos. (Adaptado de: Cardoso et al., 2021)

Debido a que el intestino humano está habitado por un gran número de especies de microorganismos que viven en una relación simbiótica con el huésped, su desequilibrio deriba en disbiosis (en otras palabras, la alteración de la homeostasis microbiana). Al aparecer bacterias intestinales que pueden ser dañinas para la salud debido a la disbiosis, se da lugar a la aparición de alergias, colon irritable, depresión, autismo y otros tipos de enfermedades (Joshi *et al.*, 2018). Por lo tanto, la ingesta de prebióticos puede reflejarse en una mejora de los problemas de salud derivados de la disbiosis o incluso reequilibrar la microbiota intestinal (Khangwal & Shukla, 2019).

Los prebióticos tienen el potencial de mejorar la salud humana y animal controlar el desequilibrio de la microbiota intestinal a través de la estimulación del crecimiento de bacterias beneficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que son responsables de inhibir la proliferación de bacterias dañinas y permitir que las bacterias saludables aumenten la producción de ácidos grasos de cadena corta, como acetato, butirato y propionato (Gibson *et al.*, 2017; Mohanty *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2019). Esto, a su vez, da como resultado una mejora de la integridad de la membrana intestinal y la absorción de nutrientes. De esta manera, se conduce a la reducción de los niveles glucémicos y peso

corporal, aumento de la inhibición de la toxicidad carcinógena, mejoramiento de inmunidad y modulación de biomarcadores metabólicos, cardiovasculares e inflamatorios (en este último caso, relacionados con enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2) (Althubiani *et al.*, 2019; Colantonio *et al.*, 2019).

Los prebióticos también influyen en el metabolismo y la obesidad ya que regulan la expresión de hormonas anoréxicas intestinales, como la tirosina y de hormonas gástricas, como la grelina. También se sabe que la suplementación con prebióticos previene las señales proinflamatorias, las cuales son perjudiciales para los procesos cognitivos. De igual manera, se ha observado que el consumo de prebióticos conduce a efectos positivos sobre el aprendizaje y la memoria. Así mismo, estos compuestos son considerados como una potencial alternativa para el tratamiento de neuropatologías como la esquizofrenia (Kao et al., 2018).

Por sus características tecnológicas, algunos prebióticos como los carbohidratos no digeribles pueden conducir a mejoras en la calidad de productos finales en cuanto a propiedades sensoriales, textura y características fisicoquímicas. Así mismo, suelen utilizarse en la adición de fibras y en la parcial sustitución de azúcares y grasas (Glisic *et al.*, 2019; Xavier-Santos *et al.*, 2019).

Por esta razón, estos compuestos se han aplicado cada vez más en la industria alimentaria, particularmente con el objetivo de sustituir ingredientes clásicos y/o combinar estos con oligosacáridos (Jeddou *et al.*, 2018). Por ejemplo, la sustitución de grasas por cadenas largas de inulina en el queso fresco, producido con leche de cabra. Dicha sustitución puede afectar significativamente sus propiedades reológicas, resultando en valores más bajos de compresión, resistencia, rigidez, viscosidad y adhesividad del producto (Salvatore *et al.*, 2014).

Los prebióticos se han utilizado para enriquecer productos lácteos, como el yogur griego (Costa et al., 2019a,b), el yogur de leche de oveja (Balthazar et al., 2016), el yogur de leche de vaca (Delgado-Fernandez et al., 2020a; Delgado-Fernandez et al., 2020b), queso crema fresco (Speranza et al., 2018), quesos de cabra (Kınık et al., 2017), kéfir (Delgado-Fernandez et al., 2019), postres cremosos de chocolate con leche (Valencia et

al., 2016), bebidas de suero (Souza et al., 2019) y helados de leche de oveja (Balthazar et al., 2018), resultando en mejoras en los parámetros de calidad de los productos debido a los efectos tecnológicos que los prebióticos confieren (Fig. 4).



Fig. 4. Principales efectos tecnológicos de la adición de prebióticos a productos lácteos. (Adaptado de Rosa et al. 2021)

En yogur con eritritol como sustituto del azúcar, la adición de oligofructosa y polidextrosa (6%) disminuye los parámetros de textura (firmeza, consistencia, cohesividad e índice de viscosidad), lo que resulta en una mayor aceptación (Costa *et al.*, 2019b). Asdemás, en postres cremosos de chocolate con leche, la adición de FOS (4%) contribuye a aumentar

la aceptación del producto probiótico (*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81) en el sabor, dando como resultado productos similares al control (Valencia *et al.*, 2016). En el helado de leche de oveja, la adición de inulina (10%) a los productos probióticos dio como resultado valores de pH, viscosidad aparente y dureza más altos (Balthazar *et al.*, 2018).

Sin embargo, la adición de componentes prebióticos también puede tener un impacto potencialmente negativo en las características de los productos lácteos. La adición de lactulosa u oligosacáridos derivados de lactulosa (2 o 4%) a yogures simbióticos (*L. acidophilus* y *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) resulta en geles más blandos y yogures menos viscosos, principalmente debido a la menor tasa de fermentación (Delgado-Fernández *et al.*, 2020b). Aún así, es importante evaluar el impacto de las alteraciones de textura en la aceptación del consumidor.

En un sentido estricto, los efectos sobre la salud asociados a los compuestos prebióticos están relacionados con su concentración en el producto; por lo tanto, es importante evaluar su estabilidad ante el procesamiento y almacenamiento de productos alimenticios. Delgado-Fernandez et al. (2019) observaron que la concentración de los componentes prebióticos (oligosacáridos derivados de lactulosa, lactulosa y GOS, 2 y 4%) se mantuvo inalterada durante el procesamiento (fermentación durante 24 h) y almacenamiento (28 días) del kéfir, sin impacto en la viabilidad de bacterias y levaduras ácido lácticas, pH y metabolitos (glicerol, ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta). Por tanto, los prebióticos evaluados fueron estables en kéfir. Con base en lo anterior, se han buscado fuentes prebióticas emergentes para mejorar la viabilidad de bacterias probióticas y mejorar los aspectos tecnológicos y sensoriales de los productos donde serán agregados. Esto es el caso de alimentos tradicionales tales como el aguamiel.

1.4.1 El aguamiel: una bebida con potencial prebiótico

El aguamiel es la a savia que excreta el agave tras ser cortadas las pencas céntricas del tallo. Esta savia es un líquido translúcido que llega a tener un color ámbar, de un pH neutro y con un ligero olor herbal cuando se encuentra recién secretado. Está constituido

principalmente por agua, azúcares, proteínas, vitaminas y sales minerales (Lappe-Oliveras et al., 2008).

La composición del aguamiel es muy compleja, predominan diferentes tipos de glúcidos los cuales representan el 95 % de los sólidos solubles procedentes del aguamiel como glucosa, sacarosa, fructosa y fructanos (Guzmán y Contreras, 2017). Entre 0.26-0.30 % de los sólidos solubles son aminoácidos, de los cuales el ácido glutámico, valina, fenilalanina, ácido aspártico y prolina son los principales.

Todos estos compuestos en conjunto o algunos por si solos, hacen que se considere al aguamiel como una fuente alternativa y económica de nutrientes beneficiosos para la salud humana (Romero et al., 2015). Dentro de los componentes del aguamiel están los oligosacáridos, los cuales se han encontrado como potenciales prebióticos. Estos compuestos estimulan el crecimiento selectivo de bacterias probióticas en el colon del huésped, además activan la proliferación de la microbiota benéfica en el ser humano (Cervantes-Elizarrarás et al., 2019). Adicionalmente, se ha observado que el aguamiel tiene un efecto directo en la estimulación de la proteólisis durante los procesos de fermentación (Jaimez-Ordaz et al., 2019).

En gran parte de casos donde se desea mejorar o eficientizar la actividad metabólica de un probiótico se recurre a la adición o incorporación de compuestos prebióticos, durante los procesos fermentativos. Los prebióticos de gran auge tecnológico suelen ser en mayoría fructanos, galacto-oligosacáridos y lactulosa; estos compuestos entre otros más han sido encontrados en el aguamiel. (Guzmán y Contreras, 2017). El aguamiel es un líquido al que se le ha demostrado su actividad prebiótica (Jaimez-Ordaz *et al.*, 2019) dada su composición rica en carbohidratos como la oligosacáridos, glucosa, fructosa y sacarosa. Además, también ha sido reportada la presencia de aminoácidos, vitaminas, y minerales que le confieren características especiales como una buena fuente de nutrientes para microorganismos probióticos. Es de ahí su potencial para la elaboración de alimentos simbióticos. La actividad metabólica de probióticos en presencia de aguamiel conlleva a una producción de enzimas proteolíticas. Dichas enzimas, estarán implicadas en la acumulación de péptidos con características bioactivas. Así mismo, estos péptidos favorecerán al probiótico para mantener su viabilidad y sobrevivencia en

el medio donde se encuentra (Toldrá et al., 2018). Recientemente se ha publicado una revisión en la cual se reporta que las características fisicoquímicas y prebióticas del aguamiel se mantienen después de concentrarlo para la producción de jarabe de aguamiel (Castañeda-Ovando, et al., 2023).

1.4.2 El jarabe de aguamiel: subproducto funcional

El jarabe de aguamiel, comúnmente conocido como miel de maguey es un producto que se ha creado para diversificar el uso industrial de la savia de maguey. El principal efecto que sufre el aguamiel es la hidrólisis de los carbohidratos por evaporación de agua con la consecuente concentración de estos (Castañeda-Ovando *et al.*, 2023). Debido al origen del aguamiel, el proceso de concentración permite no solo la concentración de azúcares, sino también de minerales y aminoácidos (García-Aguirre *et al.*, 2009). A diferencia del jarabe de aguamiel, el jarabe de agave surgió a partir de la diversificación de usos del *A. tequilana*, el cual es el producto de la hidrolisis acida o térmica de los fructanos presentes en el jugo de agave crudo extraído de la piña y su posterior concentración hasta 80°Brix.

La calidad nutrifuncional del jarabe está relacionada directamente con la composición del aguamiel. Es así, que se han reportado efectos benéficos de su consumo debido a su buena calidad nutricional. Dentro de sus componentes se puede encontrar azúcares simples, fructanos, proteínas, aminoácidos libres, minerales y vitamina C en concentraciones cercanas a las reportadas para jugo de cítricos.

En el jarabe de aguamiel de 70-75°Brix se han reportado como compuestos principales de 20-58% de sacarosa, 5-23% fructosa, 4-18% glucosa, 4-10% de fructanos y 3-4% de proteínas (Moreno-Vilet *et al.*, 2010). También se ha reportado la presencia de elementos minerales como hierro (3.2-10.19 mg/100 g), magnesio (71.24 – 88.9 mg/100g), potasio (921.98-1113.05 mg/100 g), calcio (31.27-43.88 mg/100g) y sodio (70.26-123.34 mg/100g), los cuales son necesarios en diversas funciones vitales del cuerpo humano. Dicha concentración se cree depende en gran parte del exceso o deficiencia de minerales en el suelo de cultivo que repercute en la composición de la savia o aguamiel y por lo tanto del jarabe de aguamiel (Hernández-Ramos, 2020).

El contenido de compuestos bioactivos también ha sido analizado en jarabes de aguamiel, reportando concentraciones de polifenoles totales entre 146-593 mg EAG/100 g, de flavonoides entre 0.57-1.49 mg EQ/100 g y vitamina C entre 0-197 mg EAA/100 g. En este caso, el jarabe de aguamiel fue obtenido por tres métodos (convencional, liofilizado y evaporación a presión reducida) reportado por Hernández-Ramos (2020). En este estudio, se concluye que el método convencional permitió obtener miel de maguey o jarabe de aguamiel con el doble de actividad antioxidante, respecto al aguamiel y a los otros métodos de elaboración de miel de maguey.

Una miel de maguey más oscura presenta mayor actividad antioxidante asociada a la formación de melanoidinas y al contenido de compuestos fenólicos. La actividad antioxidante reportada para jarabes de aguamiel es de 245-1122 µM Eq Trolox/ 100 g), la cual es mayor en comparación con la miel de abeja (130-460 µM Eq. Trolox / Kg) debido a la presencia de mayor contenido de compuestos antioxidantes como vitamina C y compuestos fenólicos (Hernández-Ramos, 2020).

Finalmente, también se ha reportado contenido de saponinas en los jarabes de aguamiel (224,2 a 434,7 equivalentes de protodioscina / gramo de peso seco) (Santos-Zea *et al.*, 2016), de las cuales se ha reportado el efecto directo sobre la reducción de colesterol LDL, reducción de peso y al mismo tiempo en la reducción de niveles de glucosa y de resistencia a la insulina (Leal-Díaz *et al.*, 2016).

1.5 Los alimentos simbióticos

Gibson y Roberfroid (1995) introdujeron el término "simbiótico" para describir una combinación de probióticos y prebióticos que actúan sinérgicamente. Diferentes estudios avalaron este concepto, ya que una combinación adecuada de ambos componentes en un solo producto aseguraba un efecto superior en comparación con la actividad del probiótico o prebiótico por sí solo (Bengmark, 2005).

Este enfoque también está en expansión y en realidad abarca la idea de que los simbióticos se utilizan no sólo para mejorar la supervivencia de los microorganismos beneficiosos agregados a los alimentos. También los simbióticos son usados para

estimular la proliferación de cepas bacterianas nativas específicas presentes en el tracto gastrointestinal (Olvera-Rosales *et al.*, 2021).

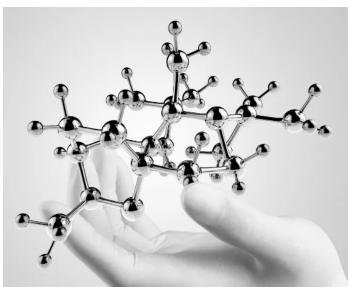
Hoy en día existe una gran cantidad de combinaciones posibles y la aplicación de simbióticos para la modulación de la microbiota intestinal en humanos parece prometedora (Scavuzzi et al., 2014). En los últimos años se han propuesto numerosas bebidas simbióticas, principalmente bebidas a base de leche y se han encontrado combinaciones de leche con algunas preparaciones con cereales como la soya. Este tipo de bebidas se han formuladas gracias a las nuevas tecnologías que permiten mejorar sus características sensoriales. Además se han enriquecido con este tipo de materiales por que son fuente de proteínas de alta calidad y nutrientes equilibrados, considerados como un medio óptimo para el desarrollo de la bebida simbiótica según lo sugerido por diversos autores (Evangelista et al., 2012; Brandão et al., 2013; Durazzo et al., 2015).

También se utilizan otras materias primas para desarrollar bebidas simbióticas, dentro de ellas se encuentra la avena (Gokavi *et al.*, 2005) la cual además de ser fuente de proteína provee B-glucanos que en últimas fechas ha sido relacionado con efectos prebióticos (Chávez de la Vega *et al.*, 2021). Adicionalmente se han probado materiales tradicionales y autóctonos como el aguamiel para desarrollar simbióticos potenciales y elevar la sobrevivencia de microorganismos probióticos como *L. rhamnosus GG y L. pentossus ABHEAU-05* (Jaimez-Ordaz *et al.*, 2019, Contreras-López *et al.*, 2023). Sin embargo, las bebidas lácteas fermentadas simbióticas más importantes y más estudiadas contienen inulina como prebiótico, junto con bacterias probióticas *L. acidophilus* y *Bifidobacterium* (Walsh *et al.*, 2014, Semjonovs *et al.*, 2014).

Una de las grandes ventajas de los alimentos simbióticos es que el probiótico contenido ayuda a disminuir diversas condiciones como la intolerancia a la lactosa, la incidencia y duración de las diarreas por rotavirus en lactantes. Lo anterior, debido a su mecanismo de competencia y desplazamiento de bacterias patógenas de la microbiota intestinal. Además, este tipo de productos mejoran el proceso de digestión de la leche (Oliviera y Gonzáles, 2007).

Justificación







2. Justificación

Los problemas cardiovasculares y de síndrome metabólico son de suma importancia en la salud pública al ser esta una de las principales razones de muerte en el mundo. Una de las enfermedades derivadas de estos padecimientos es la hipertensión, la cual se caracteriza por una vasoconstricción de las vesículas sanguíneas provocando el bajo flujo de sangre. Este proceso bioquímico es debido a su vez, al acelerado proceso de producción de angiotensina, reacción catalizada por la ECA.

El tratamiento de la hipertensión se basa en el uso fármacos sintéticos de alto grado de severidad sobre hígado y riñón, lo que suele derivar en reacciones secundarias. Por otra parte, existe evidencia científica de que algunos compuestos resultantes de una hidrólisis proteica por acción microbiana, tienen un efecto antihipertensivo sin provocar efectos adversos sobre pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Por ello la presente investigación se enfocó en un análisis complejo basado en una caracterización de aguamiel como agente prebiótico, adicionado a una bebida láctea enriquecida con un probiótico. Durante el proceso de fermentación, como muchos estudios lo indican, se generan péptidos bioactivos, principalmente aquellos con efecto antihipertensivo. De esta manera se determinó el potencial que tiene la bebida fermentada como alimento funcional simbiótico y sustentar su propuesta como un tratamiento alternativo coadyuvante natural y seguro para la hipertensión.

Hipótesis







3. Hipótesis

La adición de jarabe de aguamiel tendrá un efecto prebiótico similar al de la inulina, lo que mantendrá constante la viabilidad del microorganismo probiótico durante su fermentación en leche. Así mismo, el proceso de fermentación generará fracciones peptídicas con actividad antihipertensiva.

Objetivos







4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

 Evaluar la influencia de la adición de jarabe de aguamiel a un producto lácteo fermentado sobre la sobrevivencia de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG y la producción de péptidos antihipertensivos a través de un análisis microbiológico y técnicas *in vitro* para valorizar a este derivado del aguamiel.

4.2 Objetivos específicos

- Elaborar un jarabe de aguamiel a través de un proceso estandarizado para enriquecer una leche fermentada
- Evaluar la viabilidad y la actividad metabólica de Lacticaseibacillus rhamnosus GG durante la fermentación de una bebida simbiótica a través del recuento en placa, análisis de pH y producción de ácido láctico para determinar la influencia de la presencia de jarabe de aguamiel
- Determinar el grado de hidrólisis y el perfil proteolítico del probiótico en la bebida láctea durante una cinética de fermentación a través de los métodos del ácido trinitrobencilsulfónico (TNBS), electroforesis en gel (SDS-PAGE) y HPLC para evaluar el potencial prebiótico del jarabe de aguamiel
- Evaluar la capacidad antihipertensiva *in vitro* de la bebida simbiótica a través de un ensayo enzimático para determinar su potencial bioactivo.

Material y Métodos







5. Metodología

5.1 Obtención y análisis del aguamiel

El aguamiel se obtuvo del raspado de magueyes de los campos de San Gabriel Azteca, municipio de Zempoala en el estado de Hidalgo. Una vez obtenido, fue almacenado en botellas de plástico asépticas. Para evitar su fermentación durante el transporte, las muestras se mantuvieron a baja temperatura. El aguamiel se filtró y se pasteurizó en una autoclave a 90 °C durante 15 min en frascos previamente esterilizados. Lo anterior con el objetivo de eliminar la mayor concentración de microorganismos patógenos y fermentativos

5.2 Producción del jarabe de aguamiel

El jarabe de aguamiel se produjo de acuerdo a las condiciones estandarizadas implementadas por Pérez-Vargas (2020). El aguamiel recién obtenido (4 L) se filtró a través de una manta de cielo y se colocó en una olla de acero inoxidable. Se midió el pH del aguamiel y se ajustó a un pH de 6.0 ajustando con una solución de ácido cítrico al 10%. El aguamiel fue calentado controlando la temperatura de calentamiento a 80 °C durante todo el proceso hasta obtener un jarabe concentrado de 70 °Bx manteniendo agitación constante y monitoreando la concentración de sólidos con ayuda de un brixómetro de manera constante y frecuente. El jarabe fue almacenado a temperatura ambiente en frascos de vidrio estériles hasta su uso.

5.3 Determinación de la distribución de tamaños de los fructanos en aguamiel y jarabe de aguamiel por HPLC.

El análisis de fructanos en las muestras de aguamiel y del jarabe de aguamiel se realizó de acuerdo al método propuesto por Cruz-Guerrero *et al.* (2006). La concentración de carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos de más de dos unidades) fueron determinados en un equipo de HPLC (Lab Alliance, Tokyo, Japón) en el laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Se usó una columna RCM-monosacáridos de 300 x 7.8 mm (Phenomenex, Torrance CA) y un detector Light Scattering (Polymer Laboratories, Amherst, MA). El

medio de elución utilizado fue agua pre-desgasificada (a 75°C) a un flujo de 0.3 mL/min. La corrida se llevó a cabo a una temperatura constante de 75°C y el detector se mantuvo a una temperatura de nebulización de 110° C. La concentración de carbohidratos (p/v) fue proporcional al área calculada para cada pico con un estándar de concentración. Adicionalmente, se determinó el tipo de carbohidrato de acuerdo al mismo estándar (Tabla 2)

Tabla 2. Tiempo de retención de carbohidratos estándares en el análisis de fraciones de carbohidratos por HPLC

Carbohidrato	Número de unidades	Tiempo de retención
	de monosacáridos	(min)
Fructosa	1	12.16
Glucosa	1	11.15
Rafinosa	3	8.2

5.4 Cinética de fermentación

5.4.1 Adaptación y preparación del cultivo iniciador

Con el propósito de adaptar el microorganismo al medio de fermentación, se inóculo *L. rhamnosus GG* en un tubo con caldo MRS (cultivo de propagación), llevando a incubar a 37 °C por 24 horas.

Se preparó una solución de leche descremada en polvo (Skim milk) al 10% p/v utilizando agua desionizada estéril. La solución se colocó en un matraz Erlenmeyer estéril de 125 mL con rosca y se pasteurizó a 90 °C por 10 min. Posteriormente, las soluciones de leche se inocularon con 10 mL del cultivo de propagación y se llevó a incubación a 37 °C por 24 horas. Este sistema fue el cultivo madre con el microorganismo adaptado.

5.4.2 Preparación de los sistemas de fermentación

Con el propósito de ejecutar la fermentación se prepararon 2 sistemas. A cada sistema se les adicionó el 2% de fuente de carbono (jarabe de aguamiel o inulina) y el 10% (p/v respectivamente) de medio Skim-Milk (Dibco^R). En el primer sistema (control) se

disolvieron 15 g de Skim-Milk en 150 mL de agua desionizada con 3 g de inulina (correspondiente al 2% de fuente de carbono). Esta mezcla se pasó a un matraz de 250 mL previamente esterilizado. El sistema se pasteurizó a 90°C por 10 min en autoclave.

Al segundo sistema (estudio) se le agregó el jarabe de aguamiel necesario para completar el 2% de fuente de carbono, de acuerdo a la concentración de carbohidratos obtenido en análisis por HPLC. Se agregaron 15 g de skim milk y se aforó a 150 mL con agua desionizada, llevando a esterilizar a 90°C por 10 min en autoclave. Una vez pasteurizados, a cada sistema se le adicionó 50 mL del cultivo madre y se incubaron a 37°C.

5.4.3 Muestreo y preparación de las muestras

Se tomó una alícuota de 3 mL cada 3 horas de cada uno de los sistemas de fermentación. Se midió viabilidad, el pH y la acidez titulable de cada una de las muestras. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos, en una centrifuga (Eppendorf) con el objetivo de separar la biomasa y las proteínas de alto peso molecular. El sobrenadante se reservó y se conservó en congelación a -14°C para análisis posteriores.

5.4.4 Determinación de pH y acidez titulable

El pH se midió utilizando un potenciómetro calibrado previamente con soluciones tampón de pH=4 y pH=7. Para la determinación se introdujo directamente el electrodo en una alícuota de la solución fermentada temperatura ambiente de tal manera que esta cubriera el electrodo en su totalidad para evitar errores de medición. Para medir acidez total se tituló con una solución 0.1 N de NaOH una alícuota de 3 mL de solución fermentada hasta el punto en que una cantidad equivalente de base fuese añadida. Este punto se detectó con fenolftaleína como indicador. El resultado se expresó en términos de ácido láctico (g/ml) utilizando la siguiente fórmula:

% ác. láctico = [(Vol. de NaOH 0.1 gastado x 0.009) / Vol. muestra] x (100)

5.4.5 Cuantificación de Lacticaseibacillus rhamnosus GG

Con objeto de construir una curva de crecimiento a partir de la concentración en UFC/mL se llevó a cabo un recuento por la técnica de microgota (Miles y Misra, 1938). Se utilizó agar MRS, el cual se preparó según las indicaciones del proveedor y se esterilizó a 121°C por 15 min.

Se tomaron alícuotas de 100 µL de cada muestra extraída durante la fermentación antes de la centrifugación y se procedió a hacer diluciones hasta 10-8. Posteriormente, se destinaron 20 µL de cada dilución en 2 placas Petri (previamente divididas en cuatro partes) conteniendo agar MRS. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. la cuantificación se realizó contando el número de unidades formadoras de colonias con la ayuda de un contador de colonias y multiplicando por el factor adecuado, las unidades formadoras de colonias por mililitro se determinaron multiplicando por el factor de dilución y por una constante de acuerdo con la ecuación

$$UFC/mL = (C) (10X) (Y)$$

Donde: **C** es el número de colonias contadas, **X** la dilución y **Y** un factor que depende del volumen inoculado (1000/20).

5.5 Perfil proteolítico

5.5.1 Determinación de grupos amino libres

Se realizó el análisis de la concentración de grupos aminos libres, por medio del método del ácido trinitrobencilsulfónico (TNBS). La reacción de TNBS se lleva a cabo específicamente con grupos amino primarios para formar un compuesto cromóforo con un máximo de absorbancia a 340 nm (Spellman *et al.*, 2003). A continuación, se explica el procedimiento:

- Se agregó 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.21 M pH 8.2 en tubos de ensayo forrados con papel aluminio (debido a la fotosensibilidad de la reacción)
- En cada tubo, se adicionaron 125 μL de muestra. En el tubo que se utilizaría como blanco se agregó agua desionizada

- Se agregaron 1 mL de TNBS (Sigma) al 0.10% en amortiguador de fosfatos 0.21
 M pH= 8.2 y se agitó en vortex
- Se incubó la muestra una hora a 50°C en oscuridad
- Se paró la reacción adicionando 2 mL de ácido clorhídrico 0.1N
- Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (GENESYS 10-VIS) en celdas de cuarzo a 340 nm
- Se determinó la concentración de acuerdo a la curva patrón de glicina

La curva patrón de glicina se realizó con una solución de concentración 3 mM con 1% de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) y se realizaron diferentes diluciones: 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 y 0.25 mg/mL.

5.5.2 Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (Tris-Tricina-SDS-PAGE)

Para observar el perfil de péptidos de las muestras se realizó la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (Tris-Tricina-SDS-PAGE).

Para la preparación del gel de separación se colocaron en un matraz Kitazato 4 mL de solución base de acrilamida al 30% (relación acrilamida:bisacrilamida19:1), 4 mL de buffer a un pH de 8.45 y 160 μL de SDS al 10%. Esta solución se desgasificó durante 15 min con agitación y a vacío, finalizado este proceso se agregaron 35 μL de persulfato de amonio y 5 μL de tetrametiletilendiamina (TEMED). Se vertió la mezcla de manera inmediata hasta llenar ¾ partes de la altura total de los cristales y el resto de lleno con agua desionizada para asentar los geles durante el proceso de polimerización y la solución se dejó polimerizar durante una noche en refrigeración y con los cristales bien sellados.

Polimerizado el gel de separación, se preparó el gel de concentración. Para ello se adicionaron 0.8 mL de solución base de acrilamida al 30%, 5.2 mL de buffer con un pH 6.8 y 160 µL de SDS al 10%. La solución se desgasificó en las mismas condiciones que el gel de separación. Se adicionaron 35 µL de persulfato de amonio y 5 µL de TEMED. La solución se vacío inmediatamente sobre el gel de separación. Se colocaron los peines para formar los carriles y se dejó polimerizar durante 2 horas.

Para la preparación de muestras, se tomaron 40 μ L de las muestras centrifugadas y se colocaron en tubos Eppendorf, a cada uno de ellos se le agregaron 20 μ L de buffer colorante y 3 μ L de β -mercaptoetanol. Los tubos se llevaron a incubar a 40°C por 30 min.

El estándar se preparó de acuerdo a la metodología propuesta por el proveedor (BIORAD®). En un tubo Eppendorf se colocaron 4 μL de estándar amplio espectro de BIO-RAD®, 20 μL de buffer pH 6.8, 20 μL de buffer colorante y 3 μL de β-mercapto-etanol. El estándar se incubó a 40° C por 30 min. Una vez polimerizados ambos geles se instaló el equipo de electroforesis (mini-PROTEAN II Tetra System) en baño de hielo para realizar la separación.

En cada carril de los geles se inyectaron 15 μL de las muestras preparadas previamente. Se lleno la cámara del equipo de electroforesis con buffer de corrida a un pH de 8.3. Las muestras se corrieron a 30 V durante aproximadamente 60 minutos y 95 V hasta que el frente de migración de las bandas llegó casi al final del gel de separación. Una vez concluida la separación, se fijaron los péptidos con una solución de ácido acético al 7.5% (%v/v) durante una hora con agitación suave. Los geles se sumergieron en una solución de teñido con azul de Coomassie durante una hora y media para después desteñir el gel con una solución de ácido acético-metanol. Los geles se analizaron con el programa GelDoc (BioRad[®]).

5.5.3 Separación de fracciones peptídicas por HPLC a través de exclusión de tamaño.

Para esta parte del estudio se analizaron las mismas muestras utilizadas en la separación de péptidos por electroforesis. La finalidad del análisis fue observar los cambios de concentración de las fracciones peptídicas durante la fermentación.

Para la separación de péptidos por cromatografía (SEC-HPLC) se utilizó una columna de exclusión de tamaño (SEPAX-SEC-150, tamaño de partícula 5 µm, tamaño de poro 150 Å, 7.8 x 300 mm). Se utilizó como fase móvil buffer de fosfatos de pH 6.8. Se inyectaron 20 µL de la muestra, centrifugada de la leche fermentada al HPLC. El análisis se realizó a temperatura ambiente bajo las siguientes condiciones: flujo de 0.25 mL/min, durante 60

minutos, en un flujo isocrático. Los resultados fueron comparados con los puntos de referencia obtenidos de péptidos estándar de peso molecular conocido de la Tabla 3.

Tabla 3. Pesos moleculares de las proteínas utilizadas como estándar

Proteína	Peso Molecular	Tiempo de retención
	(kDa)	(min)
Seroalbúmina bovina	66.34	13.94
Ovoalbúmina	45.00	14.83
Lactoglobulina	18.40	16.39
Bacitricina A	1.42	38.92

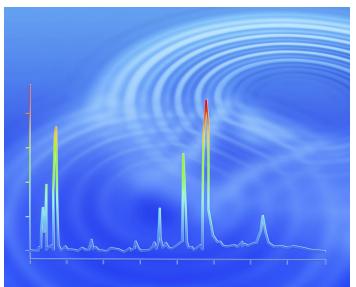
5.6 Determinación de la capacidad antihipertensiva por medio del análisis de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

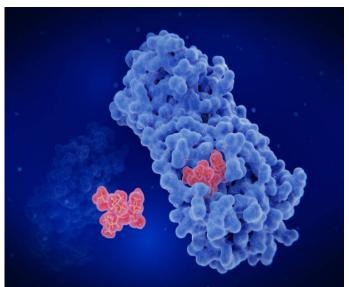
La determinación de la actividad antihipertensiva por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE-I), se evaluó espectrofotométricamente según Cushman et al. (1977) con algunas modificaciones. El sustrato, hippuril-histidil-leucina (HHL; Sigma-Aldrich, San Louis, EE. UU.), se disolvió en tampón de borato de sodio (0,1 M, pH 8,3 con cloruro de sodio 0,3 M) a una concentración de sustrato 5 mM. Posteriormente, se adicionaron 20 µL de ECA (EC 3.4.15.1.5, 0.1U/mL; Sigma-Aldrich) a 200 µL de sustrato y 80 µL de muestra (AbsM). La reacción se llevó a cabo durante 80 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 250 µL de HCl 0.1 N. Todo el volumen de reacción fue llevado a tubos de ensave donde se adicionaron 1.7 mL de acetato de etilo. Se tomaron 800 μL de la fase orgánica y se evaporó a 80 °C. Se adicionaron 500 μL de agua, 300 μL de piridina y 150 µL de Bencensulfonil. Finalmente, se agitó por inversion y se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrómetro Power Wave XS UV-Biotek (software KC Junior, Kansas, MO, EE, UU.). El mismo tratamiento se realizó para una muestra del control (Abs100) preparado con 80 µL de tampón borato en lugar de muestra. La actividad inhibidora de la ECA se determinó utilizando la siguiente fórmula de acuerdo a la absorbancia de cada medición:

% de inhibición de la ECA = $[(Abs100-AbsM)/(Abs100)] \times 100$

Resultados y Discusiones







6. Resultados y discusiones

6.1 Análisis del aguamiel y del jarabe de aguamiel

La figura 5 muestra el cromatograma obtenido durante la determinación de carbohidratos presentes en el aguamiel y en el jarabe elaborado de ese aguamiel. La identificación de estos compuestos se realizó comparando los tiempos de retención obtenidos con los tiempos de un estándar de carbohidratos.

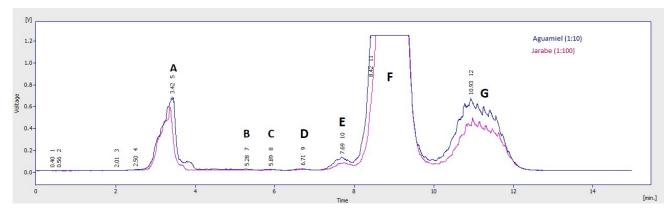


Fig. 5. Separación de carbohidratos por HPLC en el aguamiel y jarabe de aguamiel. (A-D)* oligosacáridos; (E) Trisacáridos; (F) disacáridos; (G) Monosacáridos.

En ambos productos se observan picos completamente coincidentes con mayor concentración de cada uno de ellos en el jarabe. Se observa una concentración mayor de disacáridos (F) y de monosacáridos (G). A partir de cadenas de tres carbonos (E) la concentración disminuye. Pero dentro de los oligosacáridos (A-D), el de mayor peso molecular (A) y por lo tanto cadenas más larga, presentó la mayor concentración entre ellos. La Tabla 4 muestra las concentraciones y tiempo de retención de cada una de las fracciones separadas durante el estudio de HPLC.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Willems & Low (2012) quienes encontraron que la fructosa y la glucosa fueron los carbohidratos principales presentes en 19 muestras de aguamiel provenientes de 3 de las regiones productoras de aguamiel más importantes del país (Nayarit, Jalisco y Michoacán).

^{*}El número de carbonos de oligosacáridos (A-D) no fue especificado

Tabla 4. Concentración de los diferentes carbohidratos separados por HPLC de aguamiel y de jarabe de aguamiel.

		Aguamiel		Jarabe c	le Aguamiel
Fracción	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/mL)	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/g)
Α	Oligosacárido	3.42	7.45	3.36	53.01
В	Oligosacárido	5.28	0.13	5.31	1.07
С	Oligosacárido	5.89	0.14	5.96	1.11
D	Oligosacárido	6.71	0.19	6.76	1.40
E	Trisacárido	7.69	1.41	7.74	9.08
F	Disacárido	8.9	52.16	8.96	345.74
G	Monosacárido	10.93	23.76	10.98	168.05

Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2007) mencionan que el aguamiel contiene una cantidad considerable de polisacáridos de más de dos unidades por lo que puede ser considerado como un prebiótico potencial. Estos autores demostraron el efecto del aguamiel como agente prebiótico termoprotector en *B. bifidum*, secadas por aspersión y durante almacenamiento refrigerado.

Los fructanos de agave son parte de los componentes principales que se forman durante la fotosíntesis. Estos compuestos son almacenados y usados después por las plantas como fuente de energía. Al mismo tiempo funcionan como osmoprotectores durante las temporadas de frío (Moreno-Vilet *et al.*, 2010). Sin embargo, estos fructanos han cobrado gran interés debido a sus posibles aplicaciones en la industria como ingrediente funcional (Villarreal-Morales *et al.*, 2019; Guzmán-Pedraza *et al.*, 2018; de la Rosa *et al.*, 2019).

En el caso del jarabe de aguamiel, estos compuestos se mantienen durante el procesamiento térmico favoreciendo, en el mejor de los casos, el incremento de todos los compuestos con respecto al nivel de concentración derivado del proceso el cual fue de 7 a 8 veces. En el jarabe de aguamiel con 70-75°Bx, se han reportado del 20-58% de

sacarosa, 5-23% de fructosa, 4 -18% de glucosa y de 4 a 10% de oligosacáridos (García-Aguirre, *et al.*, 2009).

6.2. Cinética de fermentación

En la Tabla 5 se observan los cambios de cuenta viable, pH y acidez durante el proceso de fermentación. Los resultados mostraron un incremento gradual en la concentración del probiótico alcanzando un máximo de concentración en inulina de 9.30 log UFC/ mL a las 42 horas mientras que en jarabe de aguamiel se alcanzaron 9.45 log de UFC/ mL a las 18 horas. Esto podría indicar que hubo una mayor actividad en la leche enriquecida con aguamiel, sin embargo, en ninguno de los dos sistemas se observó una clara diferencia entre ellos.

Tanto la adaptación como la velocidad de crecimiento en un sistema de fermentación pueden estar relacionadas con la facilidad en la obtención de la fuente de carbono por *L. rhamnosus* GG. Generalmente la glucosa y demás carbohidratos monoméricos, son aprovechados antes que los oligoméricos (Díaz *et al.*, 2012), esto se debe a que, al ser unidades sencillas, no es necesaria su hidrólisis. Es decir, tanto el grado de polimerización o el número de unidades repetitivas en un carbohidrato como la estructura química, son factores determinantes en el desarrollo de cualquier probiótico (Stewart *et al.*, 2008).

El jarabe de aguamiel utilizado en este estudio mostró aparentemente, mayor capacidad de promover el crecimiento de *L. rhamnosus* GG en comparación con la inulina, debido a su composición en monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos (Moreno-Vilet *et al.*, 2019). Se ha observado en estudios de comparación que al usar inulina el proceso de fermentación es más tardado debido a la ausencia de monosacáridos y a la alta concentración de cadenas complejas de carbohidratos, a pesar de que esta materia prima a la larga tiene una mayor contención de microorganismos probióticos en comparación a otras fuentes prebióticas como el almidón modificado (Hughes *et al.*, 2022).

Algunos estudios en los que se ha usado aguamiel como fuente de carbono para el desarrollo de BAL en diferentes productos lácteos, han demostrado su capacidad para mantener la viabilidad de estas a pesar de la concentración tan alta de sacarosa (Jaimez-

Ordaz et al., 2019; Ramírez-Godínez et al., 2021). Actualmente el uso de jarabe de aguamiel en alimentos probióticos no es una práctica común por lo que no existen reportes al respecto.

Tabla 5. Sobrevivencia de *L. rhamnosus* GG durante la fermentación de leche enriquecida con inulina y aguamiel monitoreando el comportamiento de pH y acidez.

Cuenta	a viable	p	Н	Aci	dez
(log l	UFC)			(mg/L)	
Inulina	Jarabe	Inulina	Jarabe	Inulina	Jarabe
	de		de		de
	Aguamiel		Aguamiel		Aguamiel
7.30±0.17	7.30±0.00	6.46±0.03	6.05±0.01	1.35±0.32	2.70±0.00
7.83±0.09	8.40±0.14	5.68±0.02	5.22±0.02	1.44±0.00	2.77±0.10
7.73±0.42	8.30±0.00	5.71±0.00	5.22±0.01	1.62±0.00	3.37±0.00
8.30±0.00	8.53±0.17	5.63±0.01	5.20±0.00	1.62±0.00	3.67±0.21
7.30±0.00	8.45±0.15	5.70±0.06	5.28±0.02	3.90±0.46	3.15±0.18
8.30±0.00	8.40±0.14	5.57±0.05	5.23±0.02	4.12±0.38	4.12±0.10
8.10±0.08	9.45±0.15	5.47±0.04	5.21±0.01	3.90±0.00	3.82±0.00
7.77±0.17	9.30±0.00	5.10±0.02	5.10±0.00	3.20±0.00	4.27±0.00
8.13±0.19	10.1±0.08	5.34±0.02	5.16±0.00	3.70±0.00	3.82±0.00
8.73±0.19	9.30±0.00	5.17±0.01	4.98±0.01	4.10±0.00	4.50±0.00
8.70±0.28	9.13±0.12	5.08±0.01	4.88±0.00	4.50±0.00	4.95±0.00
8.40±0.14	9.30±0.00	4.92±0.02	4.81±0.00	4.50±0.00	4.50±0.00
8.60±0.00	8.30±0.00	5.19±0.06	5.01±0.00	5.20±0.00	4.72±0.00
8.60±0.00	8.30±0.00	5.22±0.03	4.93±0.00	5.20±0.00	4.95±0.00
9.30±0.00	8.00±0.24	5.09±0.04	4.86±0.00	5.20±0.00	5.17±0.00
8.23±0.09	8.23±0.05	5.13±0.04	4.80±0.01	5.40±0.00	5.40±0.00
9.30±0.31	8.45±0.15	4.98±0.04	4.66±0.00	5.70±0.00	6.75±0.00
	(log Inulina 7.30±0.17 7.83±0.09 7.73±0.42 8.30±0.00 7.30±0.00 8.30±0.00 8.10±0.08 7.77±0.17 8.13±0.19 8.73±0.19 8.70±0.28 8.40±0.14 8.60±0.00 9.30±0.00 8.23±0.09	de Aguamiel 7.30±0.17 7.30±0.00 7.83±0.09 8.40±0.14 7.73±0.42 8.30±0.00 8.30±0.00 8.53±0.17 7.30±0.00 8.45±0.15 8.30±0.00 8.40±0.14 8.10±0.08 9.45±0.15 7.77±0.17 9.30±0.00 8.73±0.19 9.30±0.00 8.70±0.28 9.13±0.12 8.40±0.14 9.30±0.00 8.60±0.00 8.30±0.00 9.30±0.00 8.00±0.24 8.23±0.09 8.23±0.05	(log UFC) Inulina Jarabe de Aguamiel Inulina de Aguamiel 7.30±0.17 7.30±0.00 6.46±0.03 7.83±0.09 8.40±0.14 5.68±0.02 7.73±0.42 8.30±0.00 5.71±0.00 8.30±0.00 8.53±0.17 5.63±0.01 7.30±0.00 8.45±0.15 5.70±0.06 8.30±0.00 8.40±0.14 5.57±0.05 8.10±0.08 9.45±0.15 5.47±0.04 7.77±0.17 9.30±0.00 5.10±0.02 8.13±0.19 10.1±0.08 5.34±0.02 8.73±0.19 9.30±0.00 5.17±0.01 8.70±0.28 9.13±0.12 5.08±0.01 8.40±0.14 9.30±0.00 4.92±0.02 8.60±0.00 8.30±0.00 5.19±0.06 8.60±0.00 8.30±0.00 5.22±0.03 9.30±0.00 8.00±0.24 5.09±0.04 8.23±0.09 5.13±0.04	(log UFC) Inulina Jarabe de Aguamiel Inulina de Aguamiel Aguamiel 7.30±0.17 7.30±0.00 6.46±0.03 6.05±0.01 7.83±0.09 8.40±0.14 5.68±0.02 5.22±0.02 7.73±0.42 8.30±0.00 5.71±0.00 5.22±0.01 8.30±0.00 8.45±0.15 5.70±0.06 5.28±0.02 8.30±0.00 8.45±0.15 5.70±0.06 5.28±0.02 8.30±0.00 8.40±0.14 5.57±0.05 5.23±0.02 8.10±0.08 9.45±0.15 5.47±0.04 5.21±0.01 7.77±0.17 9.30±0.00 5.10±0.02 5.10±0.00 8.13±0.19 10.1±0.08 5.34±0.02 5.16±0.00 8.73±0.19 9.30±0.00 5.17±0.01 4.98±0.01 8.70±0.28 9.13±0.12 5.08±0.01 4.88±0.00 8.40±0.14 9.30±0.00 5.19±0.06 5.01±0.00 8.60±0.00 8.30±0.00 5.19±0.06 5.01±0.00 8.60±0.00 8.30±0.00 5.22±0.03 4.93±0.00 9.30±0.00 5.19±0.04	Inulina Jarabe de Aguamiel Inulina de Aguamiel Aguamiel Aguamiel 7.30±0.17 7.30±0.00 6.46±0.03 6.05±0.01 1.35±0.32 7.83±0.09 8.40±0.14 5.68±0.02 5.22±0.02 1.44±0.00 7.73±0.42 8.30±0.00 5.71±0.00 5.22±0.01 1.62±0.00 8.30±0.00 8.53±0.17 5.63±0.01 5.20±0.00 1.62±0.00 7.30±0.00 8.45±0.15 5.70±0.06 5.28±0.02 3.90±0.46 8.30±0.00 8.40±0.14 5.57±0.05 5.23±0.02 4.12±0.38 8.10±0.08 9.45±0.15 5.47±0.04 5.21±0.01 3.90±0.00 7.77±0.17 9.30±0.00 5.10±0.02 5.10±0.00 3.20±0.00 8.13±0.19 10.1±0.08 5.34±0.02 5.16±0.00 3.70±0.00 8.73±0.19 9.30±0.00 5.17±0.01 4.98±0.01 4.10±0.00 8.70±0.28 9.13±0.12 5.08±0.01 4.88±0.00 4.50±0.00 8.60±0.00 8.30±0.00 5.19±0.06 5.01±0.00 5.20±0.00 8.60±

Por otro lado, el descenso del pH es un indicador de la actividad metabólica (fermentación de azúcares) de los microorganismos. La evolución del pH durante la fermentación por *L. rhamnosus* GG en el sistema con jarabe de aguamiel alcanzó un valor final de 4.66±0.0 a las 48 horas de fermentación, mientras que en el sistema con inulina en este tiempo el valor de pH fue de 4.98±0.04. Las diferencias entre los dos sistemas no solo fueron al final de la fermentación. Durante todo el proceso el pH del sistema con aguamiel se mantuvo por debajo del enriquecido con inulina. Esto pudo deberse a que el pH inicial fue

diferente entre los dos sistemas (Tabla 5). Sin embargo, se espera que en sistemas de fermentación de este tipo el pH de 4.5 sea alcanzado al menos durante el tiempo de fermentación que se tomó en este estudio (Jaimez-Ordaz *et al.*, 2019, Ramírez Godínez *et al.*, 2021).

Los cambios en pH son debidos a la acidificación del medio principalmente. Aunque otros factores podrían afectar este valor. Sin embargo, se observa en los resultados de la tabla 4 que este descenso de pH está relacionado con la acidez de las leches fermentadas en estudio debido a la producción de ácido láctico por *L. rhamnosus* GG. Estos valores se encuentran correlacionados directamente. Esto es debido a la disponibilidad de carbohidratos fermentables y a la estructura química de ellos, ya que el metabolismo fermentativo es más rápido entre menor sea el grado de polimerización del carbohidrato (Díaz et al., 2012).

En un estudio realizado por de Souza-Pereira *et al.* (2015) sobre el crecimiento de *L. rhamnosus* en leche descremada con inulina el pH del medio tuvo un descenso más lento comparado con otros microorganismos, pero fue más rápido que en leches sin enriquecimiento. Estas fermentaciones se caracterizaron principalmente por un mayor crecimiento de *Streptococcus thermophilus* en comparación con *L. rhamnosus*. Así mismo, este tipo de fermentaciones se caracteriza por un consumo parcial de lactosa, formación de ácido láctico como principal producto metabólico y de ácido acético y etanol como coproductos típicos de la fermentación heteroláctica de azúcares. De igual manera, la liberación de galactosa como resultado de su lento metabolismo y la acumulación de diacetilo y acetoína en el medio a niveles muy bajos son propiedades de las fermentaciones de este tipo. Todos estos compuestos influyen directamente en la medida del pH.

Un estudio ha revelado que la inulina es un ingrediente que podría ser usado en la fermentación de leche para la obtención de algunos metabolitos de interés bioactivo. Sin embargo, al comparar con otras fuentes prebióticas como glucanos derivados de avena tienen el mismo efecto tanto de sostenimiento en la viabilidad de *L. rhamnosus* GG como en la velocidad de producción de ácido láctico (Chávez de la Vega *et al.*, 2021).

Por otro lado, el aguamiel ya había sido usado como ingrediente adicionado a leche para su fermentación. Jaimez-Ordaz *et al.* (2019), demostraron que el uso de aguamiel provoca un descenso más rápido del pH que fermentaciones de leche adicionadas con inulina, pudiendo deberse a la mayor cantidad de fructooligosacáridos del aguamiel que utilizaron.

6.3 Perfil proteolítico

6.3.1 Determinación de grupos amino libres

Debido al comportamiento de la curva de crecimiento de cada fermentación, la concentración de grupos amino se determinó en las muestras de cada 6 horas y hasta el tiempo donde se observó la fase estacionaria (Tabla 6). La concentración inicial de grupos amino libres en la fermentación realizada con inulina fue de 0.106±0.01mg/L, alcanzando un valor final de 0.437±0.00 mg/L a las 36 horas de fermentación. Este fue el valor más alto obtenido en este sistema.

En el caso del sistema con jarabe de aguamiel, la concentración de grupos amino libres aumentó gradualmente durante toda la fermentación alcanzando un valor máximo de $0.509\pm0.00\,$ mg/L al final. Al comparar los resultados obtenidos se observó que la concentración de grupos amino libres fue mayor en el sistema con jarabe de aguamiel lo cual probablemente es debido a que al inicio de la fermentación este valor fue mayor que en el sistema con inulina. Al inicio de la fermentación se observa una concentración de grupos amino libres en el sistema con jarabe de aguamiel $(0.312\pm0.01\,$ mg/L). Esto podría deberse a que inicialmente en el jarabe de aguamiel se encuentran aminoácidos libres provenientes del aguamiel de origen (Castañeda-Ovando *et al.*, 2023). Además, comparando la concentración inicial y final de cada sistema, se logra observar que en el sistema control (inulina) se tuvo un incremento neto de $0.331\,$ mg/L de grupos amino libres, mientras que en el de estudio (jarabe de aguamiel) fue de $0.197\,$ mg/L. Esto da cuenta que la mayor liberación concreta de grupos amino libres se dio en el sistema con inulina.

Tabla 6. Concentración de grupos amino libres durante la fermentación de leche enriquecida con inulina y con jarabe de aguamiel

Tiempo	Grupos amino libres		
	(mg/L)		
	Inulina Jarabe o		
		Aguamiel	
0	0.106±0.01	0.312±0.01	
6	0.130±0.02	0.336±0.00	
12	0.182±0.00	0.362±0.01	
18	0.190±0.00	0.388±0.00	
24	0.203±0.00	0.405±0.01	
30	0.395±0.00	0.453±0.00	
36	0.437±0.00	0.509±0.00	

Probablemente estos resultados se deben a que las BAL requieren de aminoácidos para su crecimiento, es por esto como la hidrólisis de proteínas es un marcador del metabolismo microbiano. Adicionalmente, la presencia de aminoácidos libres en el jarabe de aguamiel podría favorecer el desarrollo del microorganismo sin la necesidad de realizar cortes específicos en las cadenas polipeptídicas de las proteínas lácteas.

El sistema proteolítico es dependiente de la capacidad que tiene el microorganismo de adaptarse al medio y de la concentración de aminoácidos esenciales para su crecimiento, en el medio (Sebastián-Nicolás *et al.*, 2021). En el caso específico de *L. rhamnosus* GG, se ha reportado actividad de dipeptidasas y aminopeptidasas, las cuales actúan como liberadoras de aminoácidos derivados del carbono terminal de la secuencia de proteínas (Toldrá *et al.*, 2018). Así mismo, las amino peptidasas de *L. rhamnosus* GG son reguladas a través de sistemas de operones. Estos sistemas se activan de acuerdo con la presencia de ciertos aminoácidos en el medio. Esto provoca que la expresión de estas enzimas sea dependiente de aminoácidos que actúan como promotores del sistema (Laakso *et al.*, 2011).

Se sabe que la concentración de grupos amino libres sigue un patrón de aumento una vez que la fermentación ha iniciado. Es como se ha observado que durante las primeras horas de fermentación de suero de leche con *L. rhamnosus* GG, hay un decremento en la concentración de grupos amino libres seguida de un incremento hasta el final de la

fermentación (Olvera-Rosales et al., 2023). Así mismo, el enriquecimiento de leche con aguamiel permite que la fermentación se lleve a cabo de manera más rápida y con liberación constante de grupos amino libres, pero con un patrón de aumento de concentración (Ramírez-Godínez et al., 2021).

6.3.2 Separación de fracciones peptídicas por Tris-Tricina-SDS-PAGE

Las muestras analizadas son las mismas que se analizaron durante la prueba de TNBS. La proteólisis en productos lácteos se da principalmente en caseínas es por ello que se define como los cambios en α 's-, β -, κ -caseínas y péptidos derivados de caseínas, los cuales pueden ser detectados por SDS-PAGE (Pavia et al, 2000).

En la Fig. 6, se presentan las imágenes de los geles de electroforesis de las muestras de leche fermentada con *Lactobacillus rhamnosus* GG y enriquecida con inulina (A) y con jarabe de aguamiel (B). En esta figura se puede observar la formación de péptidos de bajo peso molecular en ambas fermentaciones. Sin embargo, en la fermentación con aguamiel se observan fracciones menores a 14.4 kDa, que corresponde al peso molecular de la proteína más pequeña en la leche que es la α-lactoalbúmina, a pesar del defecto que se observa en el gel (corrida desfasada). Adicionalmente, se logra observar una disminución en la concentración tanto de caseínas como de proteínas de suero.

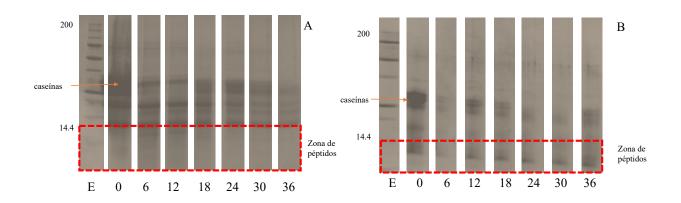


Fig. 6. Separación de péptidos por SDS-PAGE de leche enriquecida con (A) inulina y (B) jarabe de aguamiel. Usando un estándar (E) de péptidos con pesos moleculares de 200 a 6.6 kDa. Las líneas subsecuentes marcan las horas correspondientes a cada muestra analizada

Las fracciones de peso molecular menor a 6.6 kDa son de gran interés ya que es en esos pesos moleculares donde se ha observado capacidad bioactiva sobre todo antihipertensiva (Olvera-Rosales *et al.*, 2022; Meisel, 2005). Entre estas bandas, algunas pueden corresponder péptidos de alto peso molecular que fueron degradadas a pequeños péptidos y aminoácidos por la acción de las proteasas y peptidasas (Sebastián-Nicolas *et al.*, 2021). Estas bandas se presentaron desde las primeras horas de fermentación y se conservaron en horas subsecuentes sobre todo en la leche enriquecida con jarabe de aguamiel.

Estos resultados han demostrado que la acumulación de péptidos de bajo peso molecular está relacionada con el tiempo de fermentación y que la activación proteolítica podría estar estimulada por la presencia de una fuente con potencial prebiótico tal como el aguamiel (Ramírez-Godínez *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos son comparables con estudios similares reportados por Jaimez-Ordaz *et al.* (2019); Ramírez-Godínez *et al.* (2021) y por un estudio de Chávez de la Vega *et al.* (2021) quienes evaluaron la capacidad proteolítica de *L. rhamnosus* de leche enriquecida con prebióticos. En este último caso se evaluó la presencia de β-glucano de avena. Los autores concluyeron al realizar la optimización, que la presencia de esta fuente de carbono permitía tanto una mayor viabilidad de *L. rhamnosus* GG como una mayor capacidad proteolítica.

6.3.3 Separación de péptidos por HPLC por exclusión molecular

Los resultados obtenidos de la separación de péptidos por HPLC fueron comparados con los tiempos de retención de la curva patrón construida para este propósito y que se visualiza en Tabla 3. Los cromatogramas de las figuras 7 y 8 demuestran la separación de fracciones menores a 14.4 kDa. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos a través del estudio de SDS-PAGE. Como se puede observar se encontraron fracciones menores a 6.5 kDa en ambos sistemas.

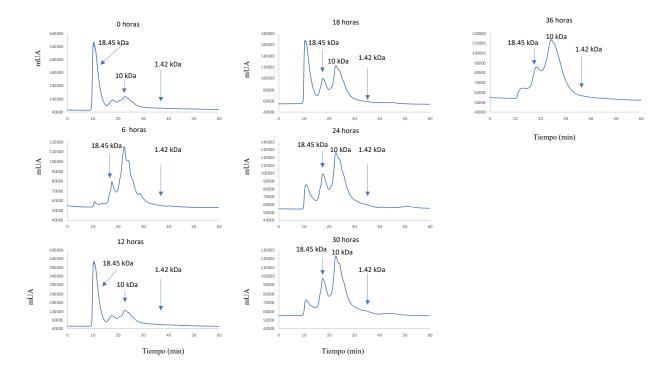


Fig. 7. Cromatograma (HPLC) de la separación de péptidos de proteínas de leche enriquecida con inulina por exclusión de tamaño.

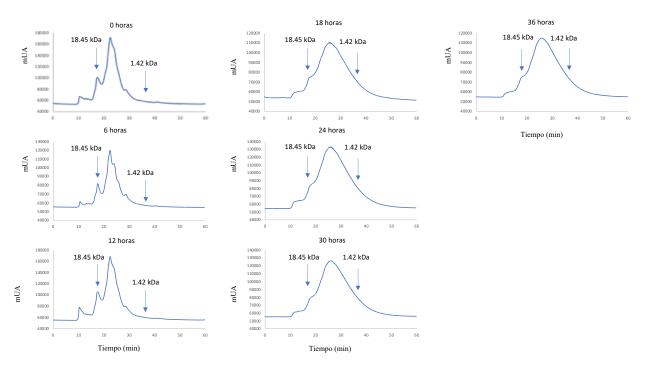


Fig. 8. Cromatograma (HPLC) de la separación de péptidos de proteínas de leche enriquecida con jarabe de aguamiel por exclusión de tamaño.

Sin embargo, fue en el sistema enriquecido con jarabe de aguamiel que se lograron encontrar fracciones menores a 1.42 kDa. Adicionalmente en este sistema es que se observó una disminución muy importante de la concentración de las proteínas de alto peso molecular como las caseínas y lactoalbúmina. A pesar de que la separación de las fracciones no se encuentra bien resuelta, si se observa una acumulación al final de la corrida. Esto quiere decir que se encuentran acumulados péptidos de diferentes pesos moleculares y la diversidad de ellos podría estar relacionada a la acumulación encontrada.

Este comportamiento no se observó en la leche con inulina ya que el perfil de proteínas separadas entre los tiempos entre 10 y 20 min fue constante mientras se desarrollaba la corrida cromatográfica, exceptuando la gráfica de las 6 horas, en la cual se observan cambios no correspondientes a lo observado para los otros tiempos. Esto podría deberse a una mala concentración inyectada en el HPLC, ya que no corresponde tampoco a los análisis de grupos amino libres y de electroforesis.

Las áreas de cada pico observado no tuvieron variaciones considerables como en el caso de las leches con jarabe de aguamiel. Sin embargo, si se observó una acumulación de una fracción de un peso aproximado a los 10 kDa. Esto supone una degradación de proteínas de peso molecular alto para derivar en péptidos de peso molecular intermedio. A pesar de la capacidad metabólica relacionada a la degradación de proteínas, con no se observaron péptidos relacionados a bajo peso molecular (menores a 6.5 kDa). Esto además de deberse a la baja producción de este tipo de péptidos, se debe a la baja liberación de fracciones derivadas del fraccionamiento de péptidos de peso molecular intermedio. Los resultados demostraron un metabolismo activado y mejorado en el caso de la leche enriquecida con jarabe de aguamiel

Una proteólisis mejorada se atribuye a la activación de la proteólisis (Gobbetti *et al.*, 2004). En el caso de BAL, la proteólisis es debida a un sistema enzimático proteolítico exhaustivo, debido a sus complejos requerimientos de aminoácidos (Bergamini *et al.*, 2006). De acuerdo a Gasson & de Vos (1994), el sistema proteolítico comienza con la acción de las proteasas asociadas a la pared celular de las BAL, que utilizan a las

proteínas como sustrato rompiéndolas en sitios específicos (prolina). En este corte se generará el primer peldaño de una serie de hidrólisis enzimáticas.

Se ha observado que las BAL utilizan las caseínas, principalmente (80% de preferencia) sobre las proteínas del suero para generar los cortes primarios (González-Olivares *et al.*, 2011). Después de este corte se generan péptidos de alto peso molecular y de peso molecular intermedio, que posteriormente por acción de peptidasas serán hidrolizados en péptidos de bajo peso molecular, los cuales serán introducidos a la célula y en el interior se hidrolizarán nuevamente para excretar las secuencias peptídicas que no utiliza el microorganismo. Es por este mecanismo de cascada que se genera la acumulación de algunos péptidos, tanto de peso molecular intermedio como de bajo peso molecular, dependiendo de las necesidades nutricionales de cada BAL.

Cuando los péptidos son generados a partir de caseínas, estos son nuevamente susceptibles al corte debido a la especificidad de las enzimas del sistema proteolítico. En estudios realizados con la obtención de aminoácidos y péptidos a través del rompimiento de caseínas y proteínas del suero de leche, se ha comprobado que el transporte de péptidos y de oligopéptidos (cadenas de aminoácidos no mayores a 12 unidades), solo se lleva a cabo cuando el péptido cumple con la especificidad de las peptidasas intracelulares, es por ello que los péptidos de bajo peso molecular acumulados en un medio de fermentación siempre son debidos a péptidos que no han sido transportados al interior de la célula (Akpemado & Bracquart, 1983).

La liberación de fracciones peptídicas de bajo peso molecular es algo que se ha estudiado ampliamente en sistemas de fermentación de leche (Olvera-Rosales *et al.*, 2022; Chávez de la Vega *et al.*, 2021; Rodríguez y Chávez, 2018; Korhonen y Pihlanto, 2006; Fitzgerald *et al.*, 2004). Sin embargo, son pocos los estudios que han estudiado la liberación de estas fracciones cuando los sistemas son enriquecidos con aguamiel o jarabe de aguamiel. Jaimez-Ordaz *et al.* (2019) determinaron que la presencia de aguamiel en una leche fermentada, además de mejorar la sobrevivencia de un probiótico, activaba la liberación de péptidos de peso molecular más pequeño que los encontrados en una leche enriquecida con inulina. Más recientemente, Ramírez-Godínez *et al.* (2021) reportaron la presencia de péptidos menores a 1.6 kDa liberados después de la maduración de un

queso adicionado con aguamiel. Estos estudios demuestran la importancia de la presencia de prebióticos no convencionales en la elaboración de productos simbióticos para elevar la concentración de fracciones peptídicas de menor peso molecular.

6.4 Determinación de la capacidad antihipertensiva

Los resultados obtenidos de la inhibición de ECA por fracciones derivadas de la hidrólisis de proteínas de leche por *L. rhmanosus* GG en sistemas enriquecidos con inulina y jarabe de aguamiel, se encuentran en la Tabla 7. Las muestras testadas fueron las obtenidas al inicio, medio y fin de la zona logarítmica de crecimiento de cada fermentación (0, 18 y 36 horas). Debido al incremento de la concentración de grupos amino libres, a la presencia de péptidos de bajo peso molecular y a la acumulación de fracciones de peso molecular similar en la separación por HPLC, se realizó el análisis en las muestras de las horas especificadas.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por fracciones de péptidos derivadas de la hidrólisis de proteínas de leche obtenidas por fermentación con *L. rhamnosus* GG en sistemas enriquecidos con inulina y jarabe de aguamiel.

Tiempo _	Inhibición de ECA (%)		
(h)	Inulina	Jarabe de aguamiel	
Inicio (0 horas)	20.4 ± 0.05	ND*	
Medio (18 horas)	ND*	ND*	
Fin (36 horas)	ND*	41.6 ± 0.03	

*ND: no detectable

Los resultados demuestran que, al inicio de la fermentación con inulina, hubo una inhibición cercana al 20 %, la cual se perdió durante el proceso de fermentación. Al final la inhibición fue nula. En el caso de la fermentación con jarabe de aguamiel el ejercicio fue contrario. Al inicio y a la mitad de la fermentación, la inhibición fue nula y al final se

encontró una inhibición del 41.6 %. Los resultados fueron los esperados debido a la liberación de fracciones de menor peso molecular durante la fermentación con jarabe de aguamiel ya que los péptidos antihipertensivos están relacionados con este tipo de cadenas aminoacídicas (Cushman *et al.*, 1977).

Adicionalmente se ha estudiado que en la estructura de los péptidos antihipertensivos hay implicados aminoácidos aromáticos (Sebastián-Nicolas *et al.*, 2021). Se sabe que al inicio de la fermentación *Lactobacillus rhamnosus* GG requiere aminoácidos aromáticos (Phe, Trp) esenciales para su crecimiento (Sun *et al.*, 2019). Sin embargo, aparentemente, estas necesidades impiden la acumulación de péptidos con residuos de aminoácidos aromáticos, lo cual puede ocasionar una disminución de la inhibición de ECA. Pero investigaciones han dado cuenta de un incremento en la inhibición de ECA durante la fermentación de leche con *L. rhamnsosus* al final del proceso (Begunova *et al.*, 2020).

El uso de microorganismos probióticos para la liberación de secuencias peptídicas con capacidad antihipertensiva se ha estudiado, pero el uso de *L. rhamnosus* está limitado por el tiempo de fermentación, el cual suele ser más largo que en otras cepas. Sin embargo, este tipo de estudios como el presentado en este trabajo, podrían ayudar a determinar la importancia de colocar este microorganismo como cultivo iniciadores de productos lácteos fermentados y en presencia de jarabe de aguamiel o algún otro componente prebiótico. Así mismo, en esta investigación se han presentado los resultados del potencial prebiótico del jarabe de aguamiel los cuales representan el primer reporte hecho para este tipo de productos combinado de manera simbiótica en una matriz láctea con un probiótico como *L. rhamnosus* GG.

Conclusiones





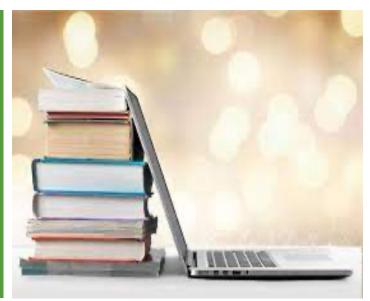


7. CONCLUSIONES

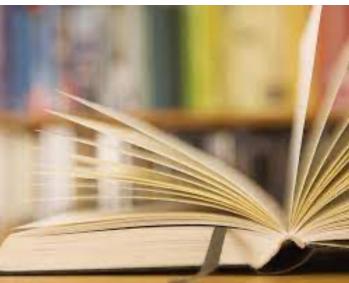
Con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se concluye lo siguiente:

- El efecto prebiótico del aguamiel durante el proceso de elaboración de la leche fermentada es comparable al efecto que ejerce un prebiótico convencional como la inulina.
- El enriquecimiento de leche fermentada con jarabe de aguamiel permite obtener mayor inhibición de enzima convertidora de angiotensina y por lo tanto mayor capacidad antihipertensiva que cuando se enriquece con inulina.
- A pesar de que el probiótico estudiado tiene una mayor actividad metabólica en presencia de inulina, la producción de péptidos de bajo peso molecular se incrementa con la presencia de jarabe de aguamiel.
- Aunque la hidrólisis de proteínas es mayor con la presencia de inulina, la actividad antihipertensiva parece estar más relacionada a la producción de péptidos de bajo peso molecular producidos con la presencia de jarabe de aguamiel.
- El jarabe de aguamiel podría ser un ingrediente de elección para la elaboración de productos lácteos simbióticos, toda vez que los estudios más recientes han demostrado que los resultados obtenidos en esta investigación son coincidentes con aquellos que demuestran su capacidad prebiótica.
- La elaboración de alimentos funcionales simbióticos podría adaptar el uso de materiales naturales como el jarabe de aguamiel, para dar uso a un producto desvalorizado en nuestros días y dar un valor agregado a este.
- Es necesario realizar estudios más profundos para determinar la posible activación de ciertos reguladores metabólicos implicados en la expresión de enzimas proteolíticas de Lacticaseibacillus rhamnosus GG.

Referencias







8. Referencias

- Akpemado, K. M., & Bracquart, P. A. (1983). Uptake of branched-chain amino acids by Streptococcus thermophilus. Applied and Environmental Microbiology, 45(1), 136-140.
- Althubiani, A. S., Al-Ghamdi, S. B., Qais, F. A., Khan, M. S., Ahmad, I., & Malak, H. A. (2019). Plant-derived prebiotics and its health benefits. In *New Look to Phytomedicine* (pp. 63-88). Academic Press.
- Arenas-Carvajal, R., Pachón-Gómez, E., Méndez-Callejas, G., & Guzmán-Avendaño, A. (2009).
 Estudio del efecto inhibitorio de extractos de Salvia scutellarioides sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina. *Universitas Scientiarum*, 14(2), 141-150.
- Balthazar, C. F., Silva, H. L., Esmerino, E. A., Rocha, R. S., Moraes, J., Carmo, M. A., ... & Cruz, A. G. (2018). The addition of inulin and Lactobacillus casei 01 in sheep milk ice cream. *Food chemistry*, 246, 464-472.
- Balthazar, C. F., Júnior, C. C., Moraes, J., Costa, M. P., Raices, R. S. L., Franco, R. M., ... & Silva, A. C. O. (2016). Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4160-4168.
- Bamforth, C. W., & Cook, D. J. (2019). Food, fermentation, and micro-organisms. John Wiley & Sons.
- Begunova, A. V., Savinova, O. S., Glazunova, O. A., Moiseenko, K. V., Rozhkova, I. V., & Fedorova, T. V. (2020). Development of antioxidant and antihypertensive properties during growth of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus reuteri* on cow's milk: Fermentation and peptidomics study. *Foods*, 10(1), 17.
- Bengmark, S. (2005). Bioecologic control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented probiotics and synbiotics. *Gastroenterology Clinics*, *34*(3), 413-436.
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., & Zalazar, C. A. (2006). Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, *16*(8), 856-866.
- Brandão, H. C. A. D. N. T. M., Brach, E. N., Mendonça, S. N. T. G., Brandão, W. A. P. L. N. T. M., Coelho, S. R. M., & Christ, D. (2013). Development of probiotic cultures in a symbiotic soy beverage using different types of carbohydrate. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20), 2251-2258.
- Byung-Ju, J., S. Jin-Seok & K. Hae-Soo. (2005). Physico-chemical properties of *Lactobacillus casei* 00692 during fermenting for liquid-type yogurt. *Food Science of Animal Resources*, 25(2), 226-231.
- Cardoso, B. B., Amorim, C., Silvério, S. C., & Rodrigues, L. R. (2021). Novel and emerging prebiotics:
 Advances and opportunities. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 95, pp. 41-95).
 Academic Press.
- Castañeda-Ovando, A., Moreno-Vilet, L., Jaimez-Ordaz, J., Ramírez-Godínez, J., Pérez-Escalante, E.,
 Cruz-Guerrero, A. E., ... & González-Olivares, L. G. (2023). Aguamiel syrup as a technological diversification product: composition, bioactivity and present panorama. *Future Foods*, 100249.
- Cervantes-Elizarrarás, A., Cruz-Cansino, N. D. S., Ramírez-Moreno, E., Vega-Sánchez, V., Velázquez-Guadarrama, N., Zafra-Rojas, Q. Y., & Piloni-Martini, J. (2019). In vitro probiotic potential of lactic acid

- bacteria isolated from aguamiel and pulque and antibacterial activity against pathogens. *Applied Sciences*, 9(3), 601.
- Chávez de la Vega, M. I., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Guzmán-Rodríguez, F., González-Olivares, L. G., ... & Rodríguez-Serrano, G. M. (2021). Influence of Oat β-Glucan on the Survival and Proteolytic Activity of Lactobacillus rhamnosus GG in Milk Fermentation: Optimization by Response Surface. Fermentation, 7(4), 210.
- Colantonio, A. G., Werner, S. L., & Brown, M. (2020). The effects of prebiotics and substances with prebiotic properties on metabolic and inflammatory biomarkers in individuals with type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 120(4), 587-607.
- Contreras-López, E., Félix-Reyes, N. L., González-Olivares, L. G., Jaimez-Ordaz, J., Castañeda-Ovando, A., Añorve-Morga, J., ... & Ramírez-Godínez, J. (2023). Aguamiel Enhance Proteolytic Activity and Survival of Lactiplantibacillus pentosus ABHEAU-05 during Refrigerated Storage of a Fermented Milk. Fermentation, 9(9), 841.
- Costa, G. M., Paula, M. M., Barão, C. E., Klososki, S. J., Bonafé, E. G., Visentainer, J. V., ... & Pimentel, T. C. (2019a). Yoghurt added with Lactobacillus casei and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. *International Dairy Journal*, 97, 139-148.
- Costa, M. F., Pimentel, T. C., Guimaraes, J. T., Balthazar, C. F., Rocha, R. S., Cavalcanti, R. N., ... & Cruz, A. G. (2019b). Impact of prebiotics on the rheological characteristics and volatile compounds of Greek yogurt. *Lwt*, 105, 371-376.
- Cruz-Guerrero, A. E., Gómez, R. L., Viniegra, G. G., Bárzana, E. & García, G. M. (2006). Influence of Water Activity in the Synthesis of Galactooligosaccharides Produced by a Hyperthermophilic β-Glycosidase in an Organic Medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1123-1129.
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F., & Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*, 16(25), 5484-5491.
- de la Rosa, O., Flores-Gallegos, A. C., Muñíz-Marquez, D., Nobre, C., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2019). Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 139-146.
- Delgado-Fernández, P., Corzo, N., Olano, A., Hernández-Hernández, O., & Moreno, F. J. (2019). Effect
 of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria and physicochemical properties of
 yoghurts. *International Dairy Journal*, 89, 77-85.
- Delgado-Fernández, P., Hernández-Hernández, O., Olano, A., Moreno, F. J., & Corzo, N. (2020a).
 Probiotic viability in yoghurts containing oligosaccharides derived from lactulose (OsLu) during fermentation and cold storage. *International Dairy Journal*, 102, 104621.
- Delgado-Fernández, P., Moreno, F. J., Corzo, N., & Nöbel, S. (2020b). Physical properties of synbiotic yogurts as affected by the acidification rate. *International Dairy Journal*, *105*, 104665.

- de Souza-Pereira, Á. M., de Almeida Sousa Lima, L. C., Lima, L. W. S., Menezes, T. M., Vieira, Â. M., de Souza Franco, E., ... & Maia, M. B. D. S. (2022). Safety Evaluation of Goat Milk Added with the Prebiotic Inulin Fermented with the Potentially Probiotic Native Culture Limosilactobacillus mucosae CNPC007 in Co-culture with Streptococcus thermophilus QGE: Analysis of Acute and Repeated Dose Oral Toxicity. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-12.
- Díaz, J., Mayorga, L., Totosaus, A. & Pérez, M. (2012). Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. Vitae, 19(3), 253-260.
- Díez B. (2017). Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA). Foundation for Medical Education and Research. 31(1): 21-27
- Domínguez K., Cruz A., González H., Gómez L., García M. & Rodríguez G. (2014). The antihypertensive effect of fermented milks. *Revista Argentina de Microbiologia*, *46*(1), 58-65.
- Doron, S., Snydman, D. R., & Gorbach, S. L. (2005). *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. *Gastroenterology Clinics*, 34(3), 483-498.
- Durazzo, A., Gabrielli, P., & Manzi, P. (2015). Qualitative study of functional groups and antioxidant properties of soy-based beverages compared to cow milk. *Antioxidants*, *4*(3), 523-532.
- Ebringer, L., Ferenčík, M., & Krajčovič, J. (2008). Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. *Folia microbiologica*, *53*, 378-394.
- Evangelista, S. R., Ghiselli, G., & Maugeri Filho, F. (2012). Development of a soy-based synbiotic beverage. *Food and Nutrition Sciences*, *3*(8), 1128.
- FAO / OMS. (2001). Report on Joint FAO/WHO. Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
- FAO. (2016). Probióticos en alimentos. Propiedades saludables nutricionales y directrices para su evaluación. Estudio sobre la alimentación y nutrición. 85
- Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology*, 8(2), 44.
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, *134*(4), 980S-988S.
- Garcia-Aguirre, M., Saenz-Alvaro, V. A., Rodriguez-Soto, M. A., Vicente-Magueyal, F. J., Botello-Alvarez, E., Jimenez-Islas, H., ... & Navarrete-Bolanos, J. L. (2009). Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10205-10210.
- Gasson, M. J., & De Vos, W. M. (1994). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*, 169-210.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and

- Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, *14*(8), 491-502.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, *125*(6), 1401-1412.
- Glisic, M., Baltic, M., Glisic, M., Trbovic, D., Jokanovic, M., Parunovic, N., ... & Vasilev, D. (2019). Inulinbased emulsion-filled gel as a fat replacer in prebiotic-and PUFA-enriched dry fermented sausages. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(3), 787-797.
- Gokavi, S., Zhang, L., Huang, M. K., Zhao, X., & Guo, M. (2005). Oat-based Symbiotic Beverage Fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *casei*, and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, 70(4), M216-M223.
- Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, *57*(2-3), 173-188.
- González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2011). Bioactive peptides released by lactic acid bacteria in commercial fermented milks. Revista mexicana de ingeniería química, 10(2), 179-188.
- Guzmán R. & Contreras J. (2017). Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition.
 Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, 25280, Saltillo, Coahuila, México. Tesis de licenciatura.
- Guzmán-Pedraza, R. & Contreras-Esquivel, J. C., 2018. Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition Aguamiel y su fermentación: Ciencia más allá de la tradición.
- Hekmat, S., Soltani, H., & Reid, G. (2009). Growth and survival of Lactobacillus reuteri RC-14 and Lactobacillus rhamnosus GR-1 in yogurt for use as a functional food. Innovative food science & emerging technologies, 10(2), 293-296.
- Hernandez-Ramos, L., Garcia-Mateos, R., Ybarra-Moncada, M. C., & Colinas-Leon, M. T. (2020).
 Nutritional value and antioxidant activity of the maguey syrup (Agave salmiana and A. mapisaga) obtained through three treatments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(3), 1306-1316.
- Hou, C., Zeng, X., Yang, F., Liu, H., & Qiao, S. (2015). Study and use of the probiotic *Lactobacillus* reuteri in pigs: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 1-8.
- Hughes, R. L., Alvarado, D. A., Swanson, K. S., & Holscher, H. D. (2022). The prebiotic potential of inulin-type fructans: a systematic review. *Advances in Nutrition*, 13(2), 492-529.
- Jaimez-Ordaz J., Martínez X., Cruz A., Contreras E., Ayala A., Castro J. & González L. (2019). Survival
 and proteolytic capacity of probiotics in a fermented milk enriched with agave juice and stored in
 refrigeration. Food Science and Technology, 39, 188-194.
- Jay J. (2005). Modern Food Microbiology. Springer Science & Business Media, Inc.Seventh Edition.
 New York: 790-800

- Jeddou, K. B., Bouaziz, F., Helbert, C. B., Nouri-Ellouz, O., Maktouf, S., Ellouz-Chaabouni, S., & Ellouz-Ghorbel, R. (2018). Structural, functional, and biological properties of potato peel oligosaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 112, 1146-1155.
- Joshi, D., Roy, S., & Banerjee, S. (2018). Prebiotics: A functional food in health and disease. In *Natural products and drug discovery* (pp. 507-523). Elsevier.
- Jubany, L., & Kuster, F. (2014). Betabloqueantes e inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona en el síndrome coronario agudo. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 29(1), 100-109.
- Jyoti, B. D., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (2004). Effect of preculturing conditions on growth of Lactobacillus rhamnosus on medium containing glucose and citrate. *Microbiological Research*, 159(1), 35-42.
- Kao, A. C. C., Burnet, P. W., & Lennox, B. R. (2018). Can prebiotics assist in the management of cognition and weight gain in schizophrenia? *Psychoneuroendocrinology*, *95*, 179-185.
- Kashyap, R., Narayan, K. S., & Vij, S. (2023). Evaluation of the antimicrobial attribute of bioactive peptides derived from colostrum whey fermented by *Lactobacillus* against diarrheagenic *E. coli* strains. *Journal of Food Science and Technology*, 60(1), 211-221.
- Khangwal, I., & Shukla, P. (2019). Potential prebiotics and their transmission mechanisms: Recent approaches. *Journal of Food and Drug analysis*, 27(3), 649-656.
- Kınık, Ö., Kesenkaş, H., Günç Ergönül, P., & Akan, E. (2017). The effect of using pro and prebiotics on the aromatic compounds, textural and sensorial properties of symbiotic goat cheese. *Mljekarstvo:* časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, 67(1), 71-85.
- Klopper, K. B., Deane, S. M., & Dicks, L. M. (2018). Aciduric strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus*, isolated from human feces, have strong adhesion and aggregation properties. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10, 89-97.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International dairy journal*, *16*(9), 945-960.
- Laakso, K., Koskenniemi, K., Koponen, J., Kankainen, M., Surakka, A., Salusjärvi, T., ... & Varmanen,
 P. (2011). Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of Lactobacillus rhamnosus GG in industrial-type whey medium. *Microbial biotechnology*, 4(6), 746-766.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizon-Gavino, J., Herrera-Suarez, T., García-Mendoza, A.,
 & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. FEMS yeast research, 8(7), 1037-1052.
- Leal-Díaz, A. M., Noriega, L. G., Torre-Villalvazo, I., Torres, N., Alemán-Escondrillas, G., López-Romero, P., ... & Tovar, A. R. (2016). Aguamiel concentrate from Agave salmiana and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased Akkermansia muciniphila in C57BL6 mice. Scientific reports, 6(1), 34242.

- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Perea Vélez, M., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2007).
 Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6768-6775.
- Mayo, B., Aleksandrzak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P., & Bardowski, J. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, 3-33.
- Mano, M. C. R., Neri-Numa, I. A., da Silva, J. B., Paulino, B. N., Pessoa, M. G., & Pastore, G. M. (2018).
 Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 17-37.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. Current medicinal chemistry, 12(16), 1905-1919.
- Mohanty, D., Misra, S., Mohapatra, S., & Sahu, P. S. (2018). Prebiotics and symbiotics: Recent concepts in nutrition. Food bioscience, 26, 152-160.
- Monzón J. (2012). Actividades enzimáticas de Lactococcus lactis relacionadas con la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas". Recuperado en: https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/248/1/Monz%c3%b3n%20Bensojo_2012_ MC.pdf
- Moreno-Vilet, L., González-Olivares, L. G., Pérez-vargas, I., Camacho, R.M., & Villanueva, S.J. (2019).
 Physiochemical characterization and carbohydrate profile of maguey honey and aguamiel from Hidalgo State. IV International Symposium of Agave.
- Moreno-Vilet, L.; Michel-Cuello, C.; Mota-Santillán, A.; González-Chávez, M. M.; A. Grajales-Lagunes, A. & Ruiz-Cabrera, M. A., 2010. Obtention of a Powder with High Fructan Content from Agave salmiana.
 In: Innovations in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Asociación Mexicana de Ciencia de Alimentos. México. 291–310.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., & Takano, T. (1995). Purification
 and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of dairy*science, 78(4), 777-783.
- Olagnero G., Abad A., Bendersky S., Genevois C., Granzella L. & Montonati M. (2007). Functional foods: Fiber, Prebiotics, Probiotics and Simbiotics. Recuperado en: https://pdfs.semanticscholar.org/2465/684fc070b9ac1fea7dddda0f5455710ec050.pdf.
- Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., García-Garibay, J. M., Gómez-Ruíz, L. C., Contreras-López, E., Guzmán-Rodríguez, F., & González-Olivares, L. G. (2022). Bioactive peptides of whey: Obtaining, activity, mechanism of action, and further applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-31.
- Olvera-Rosales, L. B., Pérez-Escalante, E., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., Cruz-Guerrero, A. E., Regal-López, P., ... & González-Olivares, L. G. (2023). ACE-Inhibitory Activity of Whey

- Proteins Fractions Derived of Fermentation by *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102. *Foods*, *12*(12), 2416.
- Olvera-Rosales, L. B., Cruz-Guerrero, A. E., Ramírez-Moreno, E., Quintero-Lira, A., Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., ... & González-Olivares, L. G. (2021). Impact of the gut microbiota balance on the health-disease relationship: The importance of consuming probiotics and prebiotics. *Foods*, *10*(6), 1261.
- Parra, R. Bacterias acido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad deficiencias agropecuarias.[en línea] 2010: 94-105 [fecha de acceso 4 de febrero de 2018].
- Pavia, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut, V. (2000). Proteolysis in Manchego-type cheese salted by brine vacuum impregnation. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1441-1447.
- Pérez-Vargas, I. (2020). Estandarización del proceso para la producción artesanal de jarabe de aguamiel hidalguense. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/123456789/1
- Quigley, E. M. (2019). Prebiotics and probiotics in digestive health. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 17(2), 333-344.
- Ramírez-Godínez, J., Gutiérrez-Rodríguez, J. F., Contreras-Lopez, E., Rodríguez-Serrano, G. M., Castaneda-Ovando, A., Jaimez-Ordaz, J., & González-Olivares, L. G. (2021). Agave juice improves survival and proteolytic activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG during ripening of semi-ripened Mexican cheese. *Food Science and Technology*, 42, e30820.
- Rodríguez, G., & Chávez-Martínez, A. (2018). Actividad proteolítica y concentración peptídica en yogur de leche de cabra adicionado con probióticos. *Interciencia*, 43(1), 50-54.
- Romero M., Osorio P., Flores A., Robledo N. & Mora R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during in vitro fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14(2): 281-292.
- Rosa, M. C., Carmo, M. R., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., ... & Cruz, A. G. (2021). Dairy products with prebiotics: An overview of the health benefits, technological and sensory properties. *International Dairy Journal*, 117, 105009.
- Sakandar, H. A., & Zhang, H. (2021). Trends in Probiotic (s)-Fermented milks and their in vivo functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 55-65.
- Salvatore, E., Pes, M., Mazzarello, V., & Pirisi, A. (2014). Replacement of fat with long-chain inulin in a fresh cheese made from caprine milk. *International Dairy Journal*, 34(1), 1-5.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A. M., Jacobo-Velázquez, D. A., Rodríguez-Rodríguez, J., García-Lara, S., & Gutiérrez-Uribe, J. A. (2016). Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 113-120.
- Sebastián-Nicolas, J. L., Contreras-López, E., Ramírez-Godínez, J., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G. M., Añorve-Morga, J., ... & González-Olivares, L. G. (2021). Milk fermentation by

- Lacticaseibacillus rhamnosus GG and Streptococcus thermophilus SY-102: Proteolytic profile and aceinhibitory activity. *Fermentation*, 7(4), 215.
- Scavuzzi, B. M., Henrique, F. C., Miglioranza, L. H. S., Simão, A. N. C., & Dichi, I. (2014). Impact of prebiotics, probiotics and synbiotics on components of the metabolic syndrome. *Ann. Nutr. Disord. Ther*, 1(2), 1009.
- Sekiya S., Kobayashi Y., Kita E., Imamura Y. & Toyama S. (1992). Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *Japan Society of Nutrition and Food Science*. 45: 513-17.
- Semjonovs, P., Shakizova, L., Denina, I., Kozlinskis, E., & Unite, D. (2014). Development of a fructansupplemented synbiotic cabbage juice beverage fermented by Bifidobacterium lactis Bb12. *Research Journal of Microbiology*, 9(3), 129.
- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of dairy science*, 83(4), 894-907.
- Silveira M., Monereo S. & Molina B. (2003) Alimentos funcionales y nutrición óptima. Revista Española de Salud Pública, Getafe, Madrid. 77(3): 12-35.
- Song, A. A. L., In, L. L., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A. (2017). A review on Lactococcus lactis: from food to factory. *Microbial cell factories*, *16*(1), 1-15.
- Souza, F. P., Balthazar, C. F., Guimarães, J. T., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., ... & Cruz, A. G. (2019). The addition of xyloligoosaccharide in strawberry-flavored whey beverage. *Lwt*, 109, 118-122.
- Speranza, B., Campaniello, D., Monacis, N., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2018).
 Functional cream cheese supplemented with Bifidobacterium animalis subsp. lactis DSM 10140 and Lactobacillus reuteri DSM 20016 and prebiotics. Food Microbiology, 72, 16-22.
- 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(5), 329-334.
- Sun, J., Chen, H., Qiao, Y., Liu, G., Leng, C., Zhang, Y., ... & Feng, Z. (2019). The nutrient requirements of Lactobacillus rhamnosus GG and their application to fermented milk. *Journal of dairy science*, *102*(7), 5971-5978.
- Tamimé A. (2006). Fermented Milks. Blackwell Science Ltd. First Edition. Iowa, USA: 262-274.
- Toldrá, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food chemistry*, 267, 395-404.
- Valcheva, R., & Dieleman, L. A. (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. Best Practice
 & Research Clinical Gastroenterology, 30(1), 27-37.
- Valencia, M. S., Salgado, S. M., Andrade, S. A. C., Padilha, V. M., Livera, A. V. S., & Stamford, T. L. M. (2016). Development of creamy milk chocolate dessert added with fructo-oligosaccharide and Lactobacillus paracasei subsp. paracasei LBC 81. LWT-Food Science and Technology, 69, 104-109.

- Villarreal-Morales, S. L., Muñiz-Márquez, D. B., Michel-Michel, M., González-Montemayor, Á. M., Escobedo-García, S., Salas-Tovar, J. A., ... & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Aguamiel a fresh beverage from Agave spp. sap with functional properties. In *Natural Beverages* (pp. 179-208). Academic Press.
- Walsh, H., Cheng, J., & Guo, M. (2014). Effects of carbonation on probiotic survivability, physicochemical, and sensory properties of milk-based symbiotic beverages. *Journal of food* science, 79(4), M604-M613.
- Xavier-Santos, D., Bedani, R., Perego, P., Converti, A., & Saad, S. M. I. (2019). L. acidophilus La-5, fructo-oligosaccharides and inulin may improve sensory acceptance and texture profile of a synbiotic diet mousse. LWT, 105, 329-335.
- Xie, X., He, Y., Li, H., Yu, D., Na, L., Sun, T., ... & Xu, G. (2019). Effects of prebiotics on immunologic indicators and intestinal microbiota structure in perioperative colorectal cancer patients. *Nutrition*, *61*, 132-142.
- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, *32*, 103-123.