



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Química

Estudio de la sobrevivencia de *Lactobacillus delbrueckii*
subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* GG y
Lactobacillus casei shirota, en una leche fermentada
enriquecida con aguamiel y almacenada en refrigeración

T E S I S

Que para obtener el título de licenciada en:

Química en Alimentos

Presenta:

Xochitl Martínez Ramírez

Director:

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Codirectora:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Mineral de la Reforma Abril 2014

Agradecimientos

A Dios gracias por todas las bendiciones otorgadas a mi vida...

A mi familia, mi papá Martín y mi mamá Paola, los amo y les agradezco la paciencia y el cariño que siempre me demostraron durante toda su vida, siempre agradeceré que ustedes sean mis padres y la forma en la que lo son. A mi hermano Emmanuel, mi compañerito de vida quien siempre, siempre ha cuidado de mi y me ha guiado con su ejemplo y sus palabras!! Te quiero!! A mi hermanito Néstor quien ha sido una gran bendición en la vida de la familia y con quien siempre puedo contar!!

Al Dr. Memo muchísimas gracias, no simplemente por haberme apoyado en este proyecto de tesis, si no por toda formación, tanto académica como en vida, gracias por todos los consejos brindados y por el tiempo, es un gran asesor de tesis y una excelente persona muchas gracias!. A la Dra. Alma Cruz quien ha dirigido también este proyecto. A la Dra. Judith Jaimez no solo por el apoyo al revisar este trabajo, si no también por la manera de pensar de usted ya que ello me motivó en muchos aspectos de mi vida.

Dr. Añorve gracias por el apoyo también a la realización de este proyecto, por brindar su confianza y por esos detalles de pláticas y algunas otras cosillas. Al Dr. Pp por las enseñanzas impartidas en clase y fuera de ellas, sobre todo el apoyo y por tu particular y agradable manera de ser. Dra. Elizabeth muchas gracias por la ayuda y la disposición de ayudarnos!. A la Dra. Araceli por habernos apoyado en este trabajo. A Andrés y la Dra. Judith Prieto por el apoyo al revisar esta tesis y por la ayuda en clases!.

A mi familia escogida (mis amigos) que siempre han estado ahí apoyándome: Guadalupe, Miriam, Cinthia, Efrén, Lili muchas gracias por brindarme su amistad y aquellas tardes locas de diversión!!

Al equipo de laboratorio de Biotecnología!! Zaira, Yesica, Juanfi, mm's, Gracias por el apoyo que me brindaron y la paciencia con el que lo hicieron :p

A todas aquellas personitas que se cruzaron por el camino y sin embargo dejaron una huellita permanente: Norma, Magui, Maru, Fany, Judith, Yanet.

De manera especial quiero agradecer a Chucho y Liz por haber formado parte muy importante de una genial parte de mi vida "ángeles de Jesús" siempre agradeceré su presencia. Y al grupo JUFRA a quien de poco conocido llevo pero me han inspirado mucho.

Índice

1 Introducción	9
2 Antecedentes	11
2.1 Leche	11
2.2 Proteínas de la leche	11
2.2.1 Caseínas	12
2.2.1.1 α -caseína	12
2.2.1.2 B-caseína	12
2.2.1.3 K-caseína	13
2.2.2 Proteínas del lactosuero	13
2.2.2.1 β -lactoglobulina	13
2.2.2.2 α -lactoalbúmina	14
2.2.2.3 Seroalbúmina bovina.....	14
2.3 Leches fermentadas	14
2.3.1 Estudios de almacenamiento refrigerado de leches fermentadas.....	14
2.4 Bacterias ácido lácticas.....	16
2.5 Probióticos.....	17
2.6 Factores que afectan la sobrevivencia de las bacterias probióticas.....	18
2.6.1 Temperatura	18
2.6.2 Oxígeno y potencial redox	18
2.6.3 Capacidad amortiguante y pH.....	19
2.7 Prebióticos.....	20
2.7.1 Fructanos.....	20
2.7.2 Inulina	20
2.7.3 Aguamiel	21
3 Objetivos	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 Metodología	24
4.1 Análisis de Aguamiel.....	24
4.2 Preparación de cultivos iniciadores.....	24
4.3 Fermentación	25
4.4 Cinética de fermentación	25
4.4.1 Muestreo y preparación de las muestras	26
4.4.2 Determinación de grupos amino libres.....	26
4.5 Almacenamiento en refrigeración.....	27
4.5.1 Determinación de péptidos por Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS- PAGE)	27
4.6 Análisis estadístico de los resultados.....	28
5 Resultados y discusión	30
5.1 Análisis de la concentración de carbohidratos en aguamiel	30
5.2 Medición de pH durante la fermentación de los sistemas Inulina-aguamiel	31
5.3 Viabilidad durante almacenamiento en refrigeración.....	34
5.4 Determinación de grupos amino libres durante la fermentación	37
5.5 Determinación de grupos amino libres durante almacenamiento refrigerado.....	41
5.6 Separación de péptidos durante el almacenamiento refrigerado por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE	43
5.7 Caracterización de péptidos producidos durante la fermentación mediante HPLC por exclusión molecular.....	51
5.8 Caracterización de péptidos producidos durante almacenamiento refrigerado mediante HPLC por exclusión molecular.....	57
6 Conclusiones	61
7 Perspectivas	62
8 Anexos	63
8.1 Preparación de los medios de cultivo.....	63
8.2 Preparación de reactivos para TNBS.....	64
8.3 Curva de concentración para la el análisis de grupos amino libres.....	65
8.4 Reactivos para electroforesis.....	65
8.5 Estándar de pesos moleculares	67
8.6 Curva de calibración para los geles de electroforesis.....	67
8.7 Cromatogramas obtenidos para el análisis de electroforesis en almacenamiento refrigerado	70
8.8 Preparación de la solución buffer para HPLC	73
8.9 curvas de concentración y estándar para HPLC	73
Trabajos citados	74

Índice de figuras

Fig. 1. Determinación de carbohidratos por HPLC en el aguamiel. (1) Fructosa (2) Glucosa (3) sacarosa y (4) polisacáridos de más de dos unidades.	30
Fig. 2. Evolución del pH durante la fermentación de leche, con <i>Lactobacillus casei</i> Shirota, en sistemas enriquecidos con aguamiel y con inulina.	31
Fig. 3. Evolución del pH durante la fermentación de leche, con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, en sistemas enriquecidos con aguamiel y con inulina.	32
Fig. 4. Evolución del pH durante la fermentación de leche, con <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , en sistemas enriquecidos con aguamiel y con inulina.	33
Fig. 5. Supervivencia de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota durante el almacenamiento en refrigeración (14° C) durante 7, 14 y 21 días en sistemas de leches fermentadas enriquecidas con aguamiel e inulina.	35
Fig. 6. Estudio de la supervivencia de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG durante 7, 14 y 21 días de almacenamiento en refrigeración (14° C), inoculado en sistemas de fermentación enriquecidos con aguamiel e inulina.	35
Fig. 7. Estudio de la supervivencia de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> durante 7, 14 y 21 días en almacenamiento refrigerado en leches fermentadas enriquecidas con aguamiel e inulina.	36
Fig. 8. Producción de aminoácidos libres, generados durante la fermentación por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota durante la fermentación y almacenamiento refrigerado (4°C).	38
Fig. 9. Determinación de la concentración de grupos amino libres producidos durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel e inulina fermentadas por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.	39
Fig. 10. Determinación de grupos amino libres en leches enriquecidas con aguamiel e inulina, fermentadas por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .	40
Fig. 11. Determinación de péptidos producidos en almacenamiento refrigerado por <i>Lactobacillus casei</i> Shirota.	41
Fig. 12. Determinación de grupos amino libres durante almacenamiento refrigerado en leches fermentadas por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.	42
Fig. 13. Separación de péptidos en el sistema enriquecido con aguamiel (A) e inulina (B) durante el almacenamiento a 4°C con <i>L. casei</i> Shirota. Muestras: S estándar, (a) Final de fermentación, (b) semana 1, (c) semana 2, (d) Semana 3.	45
Fig. 14. Separación de péptidos en el sistema enriquecido con aguamiel (A) e inulina (B) durante el almacenamiento a 4°C con <i>L. rhamnosus</i> GG. Muestras: S estándar, (a) semana 0, (b) semana 1, (c) semana 2, (d) Semana 3.	47
Fig. 15. Separación de péptidos en el sistema enriquecido con aguamiel (A) e inulina (B) durante el almacenamiento a 4°C con <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . Muestras: S estándar, (a) Tiempo 0, (b) semana 1, (c) semana 2, (d) Semana 3.	49
Fig. 16. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando <i>L. casei</i> Shirota. En las 4, 12 y tiempo final de fermentación (Tf) (1) 37.5 KDa (2) 3.2 KDa, (3) 2.0 KDa (4) 0.8 KDa, (5) 1.3 KDa, (6) 0.4 KDa.	52
Fig. 17. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando <i>L. rhamnosus</i> GG. (1) 1.1 (2) 0.5 (3) 18.6 (4) 3.4 (5) 0.9 KDa.	53
Fig. 18. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> . (1) 32.5 KDa (2) 2.3 (3) 4.4 (4) 1.9 (5) 0.9 KDa.	54

Fig. 19. Cromatogramas obtenidos de HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante el almacenamiento refrigerado de leches fermentadas y aguamiel (a) e inulina (b) usando <i>L. casei shirota</i> (1) 3.2 (2) 1.9 (3) 7.3 (4) 9.76 KDa.	57
Fig. 20. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante el almacenamiento refrigerado de leches fermentadas y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando <i>L. rhamnosus</i> GG. (1) 2.2 (2) 1.5 (3) 1.0 (4) 0.5 (5) 2.1 (6) 1.0 KDa.	58
Fig. 21. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante el almacenamiento refrigerado de leches fermentadas y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> . (1) 2.1 (2) 1.4 (3) 0.4 (4) 5.2 (5) 1.9 (6) 1.4 (7) 0.5 KDa.	59
Fig. 22. Reacción de un grupo amino libre con el ácido 2-3, trinitrobencil sulfónico.	64
Fig. 23. Curva obtenida con concentraciones conocidas para determinación de concentración de grupos amino libres.	65
Fig. 24. Curva de calibración. Almacenamiento en refrigeración <i>L. casei</i> Shirota.	67
Fig. 25. Curva de calibración. Almacenamiento en refrigeración. <i>L. casei</i> Shirota. Sistema enriquecido con inulina.	68
Fig. 26. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado, Sistema enriquecido con aguamiel. <i>L. rhamnosus</i> .	68
Fig. 27. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con inulina. <i>L. rhamnosus</i> .	68
Fig. 28. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con aguamiel. <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .	69
Fig. 29. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con aguamiel. <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .	69
Fig. 30. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con inulina. <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> .	69
Fig. 31. Electroferogramas obtenidos por electroforesis SDS-PAGE durante el almacenamiento refrigerado de <i>L. casei</i> Shirota en sistemas enriquecidos con aguamiel (a) e inulina (b).	70
Fig. 32. Electroferogramas obtenidos por electroforesis SDS-PAGE durante el almacenamiento refrigerado de <i>L. rhamnosus</i> GG en sistemas enriquecidos con aguamiel (a) e inulina (b).	71
Fig. 33. Electroferogramas obtenidos por electroforesis SDS-PAGE durante el almacenamiento refrigerado de <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> en sistemas enriquecidos con aguamiel (a) e inulina (b).	72
Fig. 34. Curva de concentración obtenida en HPLC.	73
Fig. 35. Curva estándar para la determinación de pesos moleculares en HPLC.	73

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Pesos moleculares de péptidos producidos durante el almacenamiento en frío de leches fermentadas por L. casei Shirota y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b).</i>	46
<i>Tabla 2. Pesos moleculares de péptidos producidos durante el almacenamiento en frío de leches fermentadas por L. rhamnosus GG y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b).</i>	48
<i>Tabla 3. Pesos moleculares de péptidos producidos durante el almacenamiento en frío de leches fermentadas por Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b).</i>	50
<i>Tabla 4. Pesos moleculares correspondientes a las proteínas utilizadas como muestra estándar.</i>	67
<i>Tabla 5. Pesos moleculares correspondientes a las proteínas utilizadas como estándar para análisis en HPLC.</i>	67
<i>Tabla 6. Área obtenida a partir de muestras con concentraciones conocidas.</i>	73
<i>Tabla 7. Pesos estándar y factor de retención para la determinación de pesos moleculares en HPLC.</i>	73

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el estudio de la sobrevivencia de las bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y de la producción de péptidos por estas mismas bacterias. Este estudio se llevó a cabo tanto en la fermentación de leche como en el almacenamiento en refrigeración de la leche fermentada, enriqueciendo los sistemas de fermentación con aguamiel e inulina. La adición de aguamiel se realizó para probar su posible uso como prebiótico y su función como activador proteolítico en leches fermentadas en refrigeración

Estas leches se inocularon con 10^6 UFC/mL de bacterias lácticas. Las fermentaciones se detuvieron en un pH de 4.5 y se almacenaron durante 21 días. La sobrevivencia de los microorganismos se determinó por cuenta viable en agar-MRS. La producción de grupos amino libres se realizó por el método del ácido -2, -3 trinitrobencil sulfónico (TNBS) y la separación de péptidos se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y por HPLC por exclusión de tamaño.

En la primera parte del estudio se midió la variación de pH en el medio debido a los ácidos orgánicos de cadena corta producidos durante la fermentación. Se observó que en el caso del sistema con *Lactobacillus casei* Shirota, la leche enriquecida con aguamiel alcanzó más rápido el pH de 4.5 (24 horas). El sistema enriquecido con inulina tardó 34 horas. Se observó un efecto contrario en la leche inoculada con *Lactobacillus rhamnosus* GG donde el sistema con inulina alcanzó más rápido el pH de 4.5 (16 horas) en comparación con el de aguamiel (18 horas). En el caso de la leche con En el análisis de Se monitoreó la cantidad producida de grupos amino libres mediante el método *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, no se presentó diferencia.

En el análisis de grupos amino libres, no se observó diferencia significativa en la concentración al final de la fermentación.

En la segunda parte del estudio, las leches fermentadas fueron refrigeradas y almacenadas durante 3 semanas y se estudió la sobrevivencia y crecimiento de las bacterias inoculadas, así como la producción de fracciones peptídicas mediante los métodos de TNBS, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y HPLC.

En los estudios de sobrevivencia se encontró que igual que con inulina, en las leches fermentadas enriquecidas con aguamiel se tuvo una concentración de bacterias ácido lácticas superior a la concentración recomendada para alimentos con probióticos (10^6 UFC/mL). Se observó también que la producción de grupos

amino libres continuaba aún en refrigeración y fue mayor en los sistemas con aguamiel para los tres microorganismos.

El análisis de electroforésis mostró una acumulación mayor de péptidos de bajo peso molecular (menores a 3kDa) y esta acumulación fue mayor en los sistemas enriquecidos con aguamiel. Esta acumulación, se comprobó en el análisis por HPLC donde además se encontró una fracción de 1 kDa en el sistema inoculado con *L rhamnosus* GG. Este péptido es de gran importancia ya que fracciones peptídicas de menos de 2 kDa se han reportado como bioactivas en leches fermentadas.

Se observó por HPLC que durante la fermentación, hubo un decremento en la concentración de proteínas de peso molecular superior a 30 kDa y un aumento de péptidos de bajo peso molecular, en todos los casos. De igual modo se pudo observar un patrón de cascada en la formación de péptidos de bajo peso molecular, donde se encontró acumulación de peptidos de peso molecular intermedio que después disminuye al mismo tiempo que se acumulan los de bajo peso molecular.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que el aguamiel puede ser un posible ingrediente funcional con carácter prebiótico en sistemas simbióticos, sin embargo se necesitan tener más estudios que confirmen esta aseveración. Por otro lado se observó una activación proteolítica en presencia de aguamiel, cuando las leches fermentadas se encontraban en refrigeración.

1. Introducción

Al nacer, los mamíferos son colonizados con bacterias que logran sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal. Estas bacterias forman una microbiota que desempeña un papel importante en la función del intestino y en el mantenimiento de la salud del hospedero. Esta función se establece a través de una interacción entre las bacterias y el mamífero hospedador con beneficios mutuos (Servin, 2004). Debido a esto se sabe que, al alterar el equilibrio de la flora intestinal, el organismo tiende a un número mayor de infecciones. En este sentido, las bacterias denominadas como probióticas juegan un papel importante en la activación del sistema inmunológico (Kieran, et al., 2003).

Las bacterias probióticas son definidas como “microorganismos vivos adicionados a alimentos que son benéficos para la salud” (Aggett, et al., 1999). Dentro de este grupo de bacterias se han estudiado especialmente los géneros *Lactobacilli* y *Bifidobacterium*. Ambos géneros se han utilizado ampliamente en la elaboración de alimentos lácteos fermentados (Kieran, et al., 2003).

De acuerdo a la legislación de cada país, la cantidad de probióticos establecida para conferir beneficios al hospedero, varía en cantidad desde 10^6 (Japón, Suiza e Italia) hasta 10^9 UFC/ mL. Sin embargo, el añadirlas en dichas concentraciones no es suficiente, pues se debe asegurar al consumidor la viabilidad de las bacterias. Dicha viabilidad depende de diversos factores tales como: la cepa utilizada, pH, acidez final del producto, concentración de ácido láctico y ácido acético, concentración de peróxido de hidrógeno, capacidad amortiguadora, oxígeno disuelto, aditivos alimentarios, conservadores y finalmente la temperatura de almacenamiento (Sadaghdar, et al., 2012). Recientemente se han estudiado también sustancias denominadas como prebióticas, por ejemplo la inulina y los fructooligosacáridos, debido a que presentan una relación directa entre su adición y la viabilidad de los probióticos (Palaria, et al., 2011).

Los prebióticos son ingredientes alimentarios que pueden estar en el intestino delgado sin ser degradados y beneficiar al hospedador por estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias (Marteau & Boutron, 2002). Muchos componentes alimentarios, especialmente oligosacáridos y polisacáridos (incluyendo fibra dietética), han sido utilizados como prebióticos. Sin embargo, no todos los carbohidratos pueden ser considerados como prebióticos, así que algunos autores como Roberfroid (2007) han planteado los siguientes criterios que se deben seguir para considerar a un carbohidrato como tal:

- a) Resistencia a la acidez del ácido gástrico, a la hidrólisis de las enzimas de los mamíferos y a la absorción gastrointestinal
- b) Fermentación por la microflora intestinal
- c) Estimulación selectiva para el crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales que contribuyan a la salud y al bienestar

Un producto con bacterias probióticas que contiene además prebióticos, se denomina simbiótico. Esta combinación resulta en una mayor sobrevivencia de las bacterias probióticas durante el almacenamiento y su paso por las difíciles condiciones del tracto gastrointestinal. Adicional a ello, los prebióticos también ayudan a los probióticos a adherirse al intestino (Yadab & Ravindra 2007).

Actualmente el aguamiel se comienza a considerar como un prebiótico (Fritzen, et al. 2012). Esta consideración es debida a que éste líquido proveniente del agave, presenta en su composición azúcares fermentables. Los cuales son polímeros de la fructosa con una molécula de glucosa como grupo terminal y son conocidos como fructanos y oligofructanos del agave (Narváz & Sánchez, 2009).

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto que tiene la adición de aguamiel, como fuente prebiótica en la viabilidad de probióticos durante el almacenamiento refrigerado a 4°C, de una leche fermentada, y de acuerdo a los resultados, el aguamiel podría ser propuesto como un excelente prebiótico.

2. Antecedentes

2.1 Leche

La leche es definida como la “secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro” (NOM-243-SSA1-2010). Por otro lado, Singh & Sachan en el 2011 definen a la leche como el líquido secretado de las glándulas mamarias de mamíferos hembra tras el nacimiento de la cría. Éste producto animal se caracteriza por presentar un color blanco y opaco, de sabor dulce y con un pH próximo a la neutralidad. Fisicoquímicamente, la leche se presenta como una emulsión de materia grasa; la cual es, al mismo tiempo, una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución neutra que contiene principalmente lactosa y sales minerales. Por lo que podemos ver entonces que hay cuatro tipos de componentes importantes en el sistema:

- 1) Los lípidos como componentes esenciales de las grasas ordinarias (triglicéridos).
- 2) Las proteínas (caseínas, albúminas y globulinas).
- 3) Los glúcidos, esencialmente la lactosa.
- 4) Las sales.

Además, dentro de su composición, este alimento contiene una gran cantidad de nutrientes, muchos de los cuales poseen actividad biológica que influye en la resistencia a enfermedades, en la digestión, crecimiento y desarrollo de órganos específicos. La mayoría de estos compuestos biológicamente activos son péptidos y proteínas (Singh & Sachan, 2011).

2.2 Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche (3-4%) se clasifican como caseínas y proteínas del suero (aproximadamente 80% y 20%, respectivamente) presentan un alto valor biológico ya que el contenido de aminoácidos cubre casi toda la necesidad de los aminoácidos esenciales excepto de los azufrados: metionina y cisteína, así como de fenilalanina. Se ha visto que la absorción de los aminoácidos y la digestibilidad de las proteínas de la leche es muy alta (Aracenta & Serra 2005). Además se ha observado que, el grado de asociación de las proteínas de la leche se relaciona

con factores como el pH, concentración, composición de la leche, tiempo y temperatura (Kruif et al. 2012).

2.2.1 Caseínas

Las caseínas son definidas como partículas presentes en la leche fresca, compuestas de proteínas y fosfato de calcio. Éstas partículas son esféricas y tienen un radio de aproximadamente 100 nm, están dispersas en una fase continua compuesta de agua, sales, lactosa y seroproteínas (Kruif, 1999). Estas proteínas son separadas por precipitación isoeléctrica a pH de 4.6 y en la leche son encontradas como partículas coloidales de 50 a 600 nm. La identificación de dichas proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis, en la que se ha demostrado que están compuestas por 3 proteínas denominadas α -, β -, y γ -caseínas (Fox & Brodtkorb, 2008).

Después de varios estudios, las caseínas se han dividido por su solubilidad en CaCl_2 . Se ha encontrado que el 85% del total de las caseínas son insolubles y contienen proteínas que nombraron α_s , y β -caseínas, mientras que la parte soluble contenía una proteína que nombraron κ -caseína, la cual juega un papel importante en las estabilidad y propiedades de la micela de caseína. De acuerdo a estos estudios se ha observado que las α_s -caseínas están compuesta por dos proteínas, las α_{s1} -caseínas y las α_{s2} -caseínas. Por otro lado las γ -caseínas, representan los segmentos C-terminales de β -caseínas, mientras que las partes correspondientes a los N-terminales se definen como proteasas de peptona (Fox & Brodtkorb, 2008).

Las caseínas están conjugadas con grupos fosfato esterificados con residuos de serina (la excepción son algunos fragmentos de β -caseínas que no contienen grupos fosfato). Una estructura estable de las micelas de caseínas es debida a la asociación con los grupos fosfato (Fox & Brodtkorb, 2008).

2.2.1.1 α_s -caseína

La α_s caseína, es el componente más abundante de las caseínas sensibles al calcio, es decir, las que flocculan aún en presencia de pequeñas cantidades de iones calcio. Lo mismo a bajas temperaturas (0°C) que a temperaturas intermedias ($20\text{-}40^\circ\text{C}$). Tiene un peso molecular cercano a 23600 KDa y es la proteína de la leche más rica en fósforo (1.1%), lo que representa 8 átomos de fósforo por molécula. La caseína α_s no contiene carbohidratos ni cistina; sin embargo se han publicado algunos análisis que reportan un 0.2% de cistina. Su estructura primaria está constituida por una sola cadena polipeptídica que contiene 199 aminoácidos, dicha cadena presenta como amino terminal a la arginina y como carboxilo terminal al triptófano (Santos, 2000)

2.2.1.2 β -caseína

La β -caseína está conformada por alrededor de 209 aminoácidos. Este grupo de caseínas se caracteriza por ser anfifílico, y con un peso de 24 KDa. Estas proteínas no son globulares y también tienen una conformación coloidal al azar con posibles elementos pequeños en la estructura secundaria que protegen algunos residuos hidrofóbicos de los solventes (Leclerc & Calmettes, 1998).

2.2.1.3 κ -caseína

La presencia de κ -caseínas en la micela de caseína juega un papel en la estabilización de proteínas como la α_{s1} , y la β -caseína en presencia de Ca^{2+} . La κ -caseína, tiene un grupo fosfato y tiene un alto contenido de carbohidratos enlazados a ella, se piensa que los grupos de serina y treonina (los cuales tienen grupo hidroxilo) al igual que los carbohidratos, están en un mismo lado, en la parte externa; esta proporción es fácilmente soluble en agua por la presencia de grupos polares (Ocampo et al., 2008).

La κ -caseína se diferencia del resto de las caseínas debido a que tiene un grupo éster serina fosfato y tiene una mitad glucosilada cargada. Esta caseína es insensible a la adición de calcio (Ocampo et al., 2008).

2.2.2 Proteínas del lactosuero

Las proteínas mayoritarias del lactosuero contienen aminoácidos sulfurados que tras el calentamiento de la leche participan en las reacciones de establecimiento de enlaces inter e intra moleculares en lo que intervienen los grupos sulfhidrilo. Una reacción de este tipo que tiene importancia tecnológica, es la formación de un complejo entre la β -lactoglobulina y la κ -caseína. Son solubles y están formadas por holoproteínas y glicoproteínas, representan cerca del 0.4 al 0.8% de la leche y aproximadamente del 15 al 20% de las proteínas de la leche (Early, 1998).

Cuando la leche es calentada a temperaturas cercanas a 70°C las proteínas del suero se desnaturalizan, si el pH de la leche a la temperatura de tratamiento térmico, es bajo (cerca de 6.5) muchas de las proteínas desnaturalizadas interactúan con las micelas de caseína (Anema, 2007).

2.2.2.1 β -lactoglobulina

Es la proteína más abundante del suero lácteo, es globular y soluble en agua, cuenta con una cadena peptídica simple de 162 aminoácidos de peso aproximado a los 18.4 KDa. Su estabilidad es debida a la presencia de dos uniones disulfuro y de un grupo tiol libre. El punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina se encuentra entre pH de 4.6 y 5.2, por debajo de pH 3 y por encima de pH 7 existe como monómero. Entre pH de 3.1 y 5.1 se asocia en forma octamérica (Martínez, 2010).

Existen 4 variantes genéticas de esta proteína (A, B, C, D). Que se caracterizan por su solubilidad en una solución diluida de sales neutras y por su baja solubilidad en agua pura (Amiot, 1991).

2.2.2.2 α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina, es una proteína pequeña que ensambla moléculas de Ca^{2+} , tiene un peso aproximado de 14200 Da, se encuentra en la leche de mamíferos, y funciona como un modificador de la especificidad de la enzima galactosiltransferasa. La estructura de la α -lactoalbúmina consiste en dos subdominios: uno de α -hélice y uno de β -plegada (kawajima, 1996).

2.2.2.3 Seroalbúmina bovina

La seroalbúmina bovina es muy soluble en agua y representa el 5% de las proteínas del suero de leche de vaca. Es exactamente igual que la albúmina del suero sanguíneo. Es una proteína de peso molecular de 65000 Da y su punto isoeléctrico es de 4.7. Contiene ácido aspártico y alanina en posiciones terminales. (Amiot, 1991).

La estructura de la albúmina se caracteriza por una disposición única de enlaces disulfuro que se repite en una serie de tripletes. La secuencia de aminoácidos es caracterizada por un alto porcentaje de cisteína (35%) y bajo porcentaje de triptófano, glicina y metionina. En su estructura solo posee un único grupo sulfhidrilo libre y no posee sitios para la glicosilación enzimática (Carter & Ho, 1994).

2.3 Leches fermentadas

Hace aproximadamente cien años, el premio Nobel Llya Metchnikoff observó que la larga vida de la población búlgara se debía, en parte, al consumo de productos lácteos fermentados pues intuyó que los bacilos fermentadores influían positivamente en la flora intestinal al establecerse en la misma y remplazar a las bacterias patógenas (Hove et al., 1999).

Todas las leches fermentadas tienen una característica en común, la de obtenerse por la multiplicación de bacterias lácticas en una preparación de leche. El ácido láctico que producen coagula o espesa la leche, confiriéndole un sabor ácido o menos pronunciado. Las características propias de las diferentes leches fermentadas se deben a la variación particular de ciertos factores, como la composición de la leche, la temperatura de incubación, la flora láctica o la flora microbiana distinta a la láctica (Luquet, 1993).

2.3.1 Estudios de almacenamiento refrigerado de leches fermentadas

Las leches fermentadas proveen energía y nutrientes además de ser fuente de péptidos bioactivos, los cuales incluyen algunos con actividad antibacteriana, anticancerígena, inmunomoduladora, con actividades opioides y antihipertensivos. La formación de ácido láctico y componentes del sabor así como la proteólisis, son los cambios bioquímicos más importantes que ocurren durante la fermentación y almacenamiento refrigerado (Donkor et al., 2007).

Debido al poco tiempo de fermentación en la elaboración de leches fermentadas, la actividad proteolítica es baja y corresponde del 1 al 2% de las proteínas presentes. de la cual el 80% se lleva a cabo sobre caseínas (Meisel & Bockelmann, 1999). Sin embargo después de que finaliza la etapa de fermentación, la actividad proteolítica continúa, generando degradación de proteínas y péptidos liberados durante esta etapa, aún en refrigeración (Nielsen, et al., 2009).

Vinderola, et al., (2002) determinaron, que aún cuando la temperatura óptima de proteinasas, peptidasas y aminopeptidasas pertenecientes al sistema proteolítico de bacterias lácticas, oscila entre 35 y 37°C, la actividad de estas no se pierde aún en refrigeración a 4°C. La generación de péptidos durante la refrigeración, tiene su origen de enzimas asociadas a bacterias vivas en el medio o a enzimas liberadas después de lisis celular (Nighswonger et al., 1996). Muchos estudios han comprobado la viabilidad de bacterias probióticas en leches fermentadas comerciales almacenadas en refrigeración, enfocados a la mejora de cepas y técnicas de conservación (Shah, et al., 1995; Vinderola, et al., 2000; Shin, et al., 2000; Adhikari, et al., 2000), sin embargo los estudios de producción de péptidos durante el almacenamiento frío se reducen a la comparación de perfiles proteolíticos al inicio de la refrigeración y al final de esta (Nielsen, et al., 2009).

Por otro lado, se ha comprobado que hay un aumento en la concentración de péptidos en leches fermentadas comerciales, en los primeros 10 días de almacenamiento en frío a 4°C, manteniéndose constante hasta el final del estudio (15 días), los péptidos obtenidos fueron de tamaños variables y se comprobó que esta diversificación estaba determinada tanto por la especie de microorganismo con que estaba elaborada la leche comercial (González, et al., 2011).

Stanton et al., 2005 observaron que en yogures almacenados durante 28 días en frío (4°C) y enriquecidos con amilosa o almidón de maíz no hubo diferencia significativa comparado con las propiedades impartidas por la inulina (Donkor et al. 2007).

Como se ha mencionado anteriormente existen productos que utilizan probióticos y prebióticos en combinación. Los microorganismos pueden ser directamente promotores de la salud, debido a la producción de metabolitos bioactivos durante la elaboración de estos productos debido a la fermentación (Stanton et al., 2005).

2.4 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL incluyen miembros del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*; éste género de las BAL, es definido como gram-positivas, no esporuladas, catalasa negativas, anaeróbicas facultativas y con un metabolismo fermentativo (Savijoki et al. 2006). Estas bacterias han sido asociadas a productos lácteos fermentados.

Las BAL son las que constituyen en mayor parte la microflora intestinal, y proveen beneficios al hospedador tales como la eliminación a la intolerancia a la lactosa debido a la actividad de la β -galactosidasa. Las BAL también son bacterias que se utilizan mayoritariamente para elaborar productos lácteos fermentados como el yogurt y el queso (Yadab et al. 2007; Gill & Rutherfurd, 2001).

Los metabolitos de las BAL durante la fermentación conservan los alimentos, esto es por el bajo pH por la producción de ácido láctico, así como la producción de bacteriocinas, en particular de la nisina (Stiles, 1996). Aunado a estos beneficios tecnológicos, se han generado diversos estudios referentes a la mejora del sistema inmunológico por BAL y se ha sugerido que la supervivencia de estas mismas en el intestino de éstas mismas es un factor importante para dicho efecto en el organismo. Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la mejora inmunológica puede ocurrir independientemente de la persistencia microbiana en el tracto gastrointestinal (Gill & Rutherfurd, 2001; Saavedra & Tschernia, 2002 y Maldonado et al. 2009;).

2.4.1 Sistema proteolítico de BAL

Diversas propiedades metabólicas de las BAL se han usado directa o indirectamente para tener un impacto en el proceso y madurado de los productos lácteos. Algunas de sus funciones son: (I) fermentación y degradación de la lactosa, (II) reducción del potencial redox (III) fermentación del citrato y (IV) degradación de las caseínas. Debido a que en la leche la cantidad de aminoácidos libres es baja y el requerimiento de éstos varía de 4 a 14 diferentes (dependiendo de la cepa) la sobrevivencia de las BAL depende de que su sistema proteolítico pueda degradar las caseínas. Para que esto suceda, el sistema proteolítico de las BAL se compone de: (I) proteinasas que fragmentan las caseínas a péptidos (II)

peptidasas que degradan a los péptidos, y (III) sistemas de transporte de los productos degradados a través de la membrana citoplasmática (Kunji et al. 1996).

Algunos de los productos de degradación son los péptidos bioactivos. Estos péptidos derivados de las proteínas de la leche, se encuentran inactivos dentro de la secuencia de la proteína y pueden ser liberados y activados por proteólisis enzimática. Esta proteólisis enzimática se inicia por la acción de las proteinasas y peptidasas de las BAL. Las BAL son nutricionalmente exigentes y necesitan aminoácidos específicos para sus necesidades metabólicas. El sistema proteolítico de las BAL consiste de proteasas ligadas a la pared celular de las BAL y diversas peptidasas intracelulares (Meisel & Bockelmann, 1999).

El sistema proteolítico de *Lactobacillus* específicamente, se compone de una serino-proteasa de pared celular prolino específica (en *L. casei* se llama HN14). Esta proteasa llamada PrtB es específica para *Lactobacillus bulgaricus* así como la PrtP para otras BAL, es el inicio de la hidrólisis de proteínas en el sistema proteolítico (Courtin et al. 2002). Por otra parte un segundo sistema de *Lactobacillus* está compuesto por un conjunto de enzimas de transporte. Éstas enzimas de transporte constituyen un sistema de operones llamado Opp (Oligopéptidos Permeasa) (Wang et al. 2004). Finalmente, la acción de las peptidasas y aminopeptidasas se lleva a cabo al interior de la célula, por un sistema enzimático que incluye alrededor de 12 a 15 enzimas. Para el caso de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, existe un monómero de 170 KDa con una temperatura óptima de 42°C y pH de 5.5. Esta enzima es activada por un agente reductor, se sugiere que es un residuo de cisteína el que puede estar implicado en el sitio catalítico y ser capaz de hidrolizar α - y β -caseínas (Law & Haandrikman, 1997).

Las fracciones peptídicas que no son utilizadas por las BAL, son excretadas al medio y éstas constituyen la concentración final de péptidos, algunos con actividad biológica (Law & Haandrikman, 1997).

2.5 Probióticos

Los probióticos, son definidos como microorganismos vivos que al ser administrados en dosis adecuadas confieren beneficios al hospedador. Estos beneficios son específicos para el tracto gastrointestinal en donde dan un balance a la flora presente en el intestino y así logran participar en la digestión de nutrientes que el organismo por sí solo no puede digerir, como por ejemplo los carbohidratos complejos. En consecuencia evitarán la colonización de bacterias patógenas al producir sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas y péptidos,

compitiendo por nutrientes y por sitios de adhesión al colon (Borchers, 2009). Sin embargo, para poder considerar a un organismo como probiótico éste no debe de ser patogénico, debe de resistir el ácido gástrico y biliar, tiene que presentar interacción con el tejido epitelial del intestino, ser hábil para persistir en el tracto gastrointestinal, así como producir sustancias antimicrobianas y nutraceuticas. (Leroy, et al. 2008).

Kurman & Rasic (1991) han recomendado que la dosis mínima que debe ser administrada para poder producir efectos benéficos es de 10^8 UFC/mL y esta concentración varía por especie y cepa utilizada (Oliveira et al. 2009).

Para que los beneficios de los probióticos tengan lugar se debe de considerar todos los factores que afectan su sobrevivencia. Entre estos factores se encuentran: el pH, potencial redox, contenido de peróxido de hidrógeno, concentración de oxígeno disuelto y acidez (Özer et al. 2005). Al mismo tiempo se han considerado de acuerdo a Saier & Mansour (2005), tres aspectos para lograr efectos benéficos a la salud, los cuales son:

- Los productos finales de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos tales como los ácidos orgánicos pueden ser absorbidos por el hospedador, dichos productos finales pueden influir en el estado de ánimo, niveles de energía e incluso habilidades cognitivas.
- Compiten de manera efectiva contra bacterias patógenas debido a la producción de bacteriocinas.
- Estimulan la respuesta inmune al producir polisacáridos específicos

2.6 Factores que afectan la sobrevivencia de las bacterias probióticas

2.6.1 Temperatura

Las temperaturas de refrigeración son aquellas próximas, pero superiores, al punto de congelación de los alimentos, habitualmente se consideran como tales las incluidas en el rango -1 y $+7^{\circ}\text{C}$. En los microorganismos, a medida que la temperatura desciende por debajo del óptimo, el crecimiento se hace más lento y finalmente se detiene. El descenso diferencial de las actividades de las enzimas a bajas temperaturas puede alterar las rutas metabólicas y sus productos finales. Muchos de los procesos reguladores del metabolismo celular son sensibles a las temperaturas inferiores a la óptima, de modo que la exposición a las bajas temperaturas puede provocar desequilibrios metabólicos y el cese de crecimiento (Rose, 1968). La incubación a bajas temperaturas puede alterar igualmente la

composición lipídica de las células microbianas, ya que se comienza a incrementar la cantidad de ácidos grasos insaturados (ICMSF, 1980).

2.6.2 Oxígeno y potencial redox

La exposición de los lactobacilos al oxígeno resulta en la producción de metabolitos tóxico-oxigénicos que se acumulan en la célula, lo que lleva a la muerte celular por daño oxidativo. Las BAL no pueden sintetizar ATP por mecanismos aerobios lo que significa que dependen estrictamente de un metabolismo fermentativo. Las bacterias anaerobias como las BAL no pueden sintetizar citocromos y otras enzimas que son vitales en la cadena transportadora de electrones. Como la energía de los anaerobios es debida a la fosforilación a nivel de sustrato, la regeneración de NAD^+ del NADH asume una importancia crítica. Dicha reducción se lleva a cabo por la reducción del oxígeno molecular (O_2) por la enzima NADH oxidasa (enzima que poseen todas las BAL). Generalmente las reacciones de oxidación del NADH en las BAL catalizan la transferencia de uno, dos o 4 electrones a la molécula de dioxígeno (Condon, 1987).

La molécula de O_2^- , puede ser dismutada por el Mn_2^+ a una molécula más estable el H_2O_2 . Estos compuestos se pueden difundir fácilmente a través de las membranas celulares y dañar oxidativamente componentes vitales celulares como lípidos de la membrana, enzimas y ADN. Muchos estudios sobre la aerotolerancia de algunas BAL determinan que la actividad de la NADH oxidasa y la NADH peroxidasa, llevan a cabo la eliminación del oxígeno de la célula (Higuchi, 1984). Por lo tanto, se piensa que la presencia de oxígeno en productos como el yogurt y leches fermentadas induce la muerte celular y resulta en escasa viabilidad (Talwalkar & Kailasapathy, 2004).

Los microorganismos afectan al potencial redox (Eh) del medio durante el crecimiento. Los microorganismos anaerobios no son capaces de reducir el Eh de su medio (Jay, 2000).

El Eh puede actuar sobre el equilibrio de muchas reacciones importantes en el metabolismo. La peróxido dismutasa es una enzima que juega un papel importante en la sensibilidad de los gérmenes al oxígeno. Ya que el oxígeno influye en el valor Eh, en un estudio se demostró la existencia de correlación entre la sensibilidad al oxígeno y la concentración de la peróxido dismutasa (Bourgeois, et al. 1988).

Debido a la falta de un aceptor de electrones externo (oxígeno en las bacterias aerobias) en anaerobios, el sustrato orgánico se somete a una serie equilibrada de

reacciones oxidativas y reductoras mediadas por los nucleótidos de piridina tales como NADH (Jay, 200).

2.6.3 Capacidad amortiguante y pH

El pH desfavorable afecta al menos en dos aspectos de una célula microbiana: el funcionamiento de sus enzimas y el transporte de nutrientes al interior de la célula. La membrana citoplásmica de los microorganismos es relativamente impermeable a los iones H^+ y OH^- . Cuando se sitúan microorganismos en medios por debajo o por encima de la neutralidad su capacidad para multiplicarse depende de su capacidad para llevar el pH del medio a un valor o a un intervalo más óptimo. Cuando se sitúan en medios ácidos, las células deben evitar que entren H^+ o que se expulsen los iones H^+ rápidamente a medida que entran. Compuestos celulares clave para la supervivencia como el DNA y el ATP necesitan neutralidad (Jay, 2000).

2.7 Prebióticos

Los prebióticos son carbohidratos capaces de estimular el crecimiento de los probióticos (Saavedra & Tschernia 2002). Aunque estos carbohidratos no pueden ser digeridos en el intestino delgado del consumidor, aportan beneficios a la salud del mismo ya que se encuentran como substratos y estimulan selectivamente el crecimiento o la actividad metabólica de bacterias específicas encontradas en el intestino (Rolfe, 2000).

Los prebióticos más conocidos y estudiados son la inulina y las oligofruktosas que son fibras solubles y fermentables. Estos carbohidratos son considerados como fructanos, los cuales no pueden ser digeridos por la α -amilasa u otras hidrolasas en la sección superior del tracto gastrointestinal (Oliveira et al. 2009).

2.7.1 Fructanos

Los fructanos son carbohidratos que presentan una estructura de cadena lineal y polidispersa con enlaces fructosil-fructosa β -(2-1). La configuración β que se encuentra en el carbono anómero 2 impide que las enzimas encontradas en el intestino delgado puedan degradar dichos carbohidratos, ya que las enzimas encontradas en esta parte del intestino son específicas para cortar en los enlaces α -glucosídico (Roberfroid, 2005; Molis et al., 1996).

2.7.2 Inulina

La inulina es una fibra soluble fermentable clasificada como fructano que alcanza al intestino largo prácticamente intacta, es hidrolizada en la parte superior del intestino y fermentada por las bacterias. La inulina es un carbohidrato polidisperso

que consiste exclusivamente de enlaces β -(2-1) fructosil-fructosa (Roberfroid, 2005). Se encuentran en plantas, aunque algunos hongos y muchas bacterias también las producen. Se cataloga como un prebiótico y se ha utilizado tradicionalmente como tal, es obtenida principalmente de achicoria. La inulina pertenece al grupo de fructanos, los cuales se presentan de manera natural en vegetales y frutas. Sin embargo los fructanos, pueden ser fermentados en el colon y al pasar por este proceso son oxidados y degradados en gases y ácidos grasos de cadena corta (Roberfroid & Delzenne, 1998).

Algunos estudios demostraron que la suplementación en leches fermentadas con inulina, incluso en bajas concentraciones, provee el crecimiento y la viabilidad de manera significativa de las bacterias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* (Pinheiro et al. 2011).

La inulina y los *levanos* se pueden sintetizar a partir de la sacarosa por transferencia repetida de un grupo fructosil de un donador, teniendo una unidad de glucosa terminal (Vijin & Smeekens, 1999).

La forma de actuar de la inulina y oligofructosas como prebióticos es mediante la fermentación selectiva de las BAL, las cuales producen una inulinasa que es necesaria para romper el enlace fructosil-fructosa β -(2->1) (Vijin & Smeekens, 1999).

2.7.3 Aguamiel

A lo largo de la historia en México el agave ha tenido usos alimentarios, religiosos, textiles e incluso en la construcción. Su utilidad como alimento ha permitido elaborar una variada gama de bebidas alcohólicas como el mezcal, el sotol, bacanora, pulque y tequila. Del agave también se extrae el aguamiel, el cual es obtenido de lo que se conoce comúnmente como “piñas”. De éste líquido se pueden obtener polisacáridos, fructanos, jarabe de alto contenido de fructosa, biocombustibles y compuestos de Maillard (Narváez & Sánchez, 2009).

El agave por una adaptación fisiológica usa el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) que implica una menor pérdida de agua por transpiración mediante la apertura de estomas en la noche cuando la temperatura es más fría, y por lo tanto, disminuye la evaporación de agua. Los principales productos fotosintéticos de las CAM en las plantas de agave que se han reportado son los fructanos. Estos compuestos son polímeros solubles de fructosa que generalmente tiene un residuo de glucosa por molécula. Los fructanos del agave se sintetizan y almacenan en los tallos y su principal función en las plantas CAM es la de almacenamiento. También pueden actuar como osmoprotectores durante la sequía (López et al., 2003).

El aguamiel es incoloro, dulce y de sabor agradable, además de contener agua contiene glucosa, sacarosa y fructosa (26.5%, 8.8% y 32.4% p/p en base seca, respectivamente) además de gomas, proteínas, minerales, vitaminas y microorganismos benéficos probióticos y no probióticos, mientras que la inulina alcanza el 11% de peso seco (Tovar et al., 2011). Debido a la alta concentración de fructooligosacáridos, el aguamiel ha cobrado relevancia en la utilización como prebiótico (Rodríguez et al., 2007).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de la adición de aguamiel en la sobrevivencia y en el perfil proteolítico de bacterias lácticas mediante una cinética de fermentación y de refrigeración, de una leche fermentada, para proponer su posible uso como prebiótico.

3.2 Objetivos específicos

- Separar los carbohidratos presentes en el aguamiel por medio de HPLC para determinar la concentración total de carbono fermentable.
- Determinar los cambios de pH durante la fermentación de leche por medio de una cinética para comparar la velocidad de conversión de ácido láctico con dos fuentes de carbono diferentes.
- Cuantificar los grupos amino libres durante la fermentación y el almacenamiento en refrigeración mediante el método de TNBS para comprobar la actividad proteolítica.
- Cuantificar las bacterias lácticas durante almacenamiento refrigerado por tres semanas para determinar su viabilidad.
- Determinar el perfil proteolítico durante la fermentación y en el almacenamiento refrigerado por medio de electroforesis y HPLC para comprobar la acumulación de péptidos de bajo peso molecular.

4. Metodología

4.1 Análisis de Aguamiel

El aguamiel se obtuvo del raspado de tres magueyes de un campo de Epazoyucan, Hidalgo, perteneciente a un productor de pulque artesanal. El raspado se realizó a las 6 de la mañana, hora del primer raspado de maguey por parte del productor de pulque. Se almacenó en botellas de plástico asépticas de 1.5 L de capacidad. Para evitar la producción de alcohol debido a la fermentación de la flora nativa, se mantuvo en refrigeración durante su transporte. El aguamiel se pasteurizó en autoclave a 90°C por 15 minutos, en frascos estériles, esto con la finalidad de evitar la caramelización de los azúcares presentes. La concentración de carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos de más de dos unidades) en el aguamiel, 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 (Cruz et al., 2006).

4.2 Preparación de cultivos iniciadores

Con la finalidad de realizar una comparación en el estudio entre BAL probióticas de *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus rhamnosus* GG, se hicieron ensayos paralelos con la BAL no probiótica *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Las cepas puras se obtuvieron del laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Se tomó una asada de los tubos de conservación de los cultivos puros y se inocularon en caldo MRS (Man Rogossa y Sharpe) (DIFCO). *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus* se incubaron durante 36 horas a 37° C. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se incubó a 42°C. durante 36 horas

Con la finalidad de adaptar a los microorganismos al medio de fermentación, se traspasó 1mL del cultivo de caldo MRS a un tubo con 9 mL de una solución de

leche descremada en polvo (Svelty Nestlé®) (10% p/v) previamente pasteurizada a 90°C por 15 minutos. Los tubos de leche se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y tiempo que en la propagación.

Finalmente, se preparó una solución de leche descremada en polvo y se colocaron 100 mL (Dairy Gold) al 10% p/v). En 6 matraces con rosca de 250 mL previamente esterilizados,. La leche se pasteurizó a 90° C por 15 minutos en un autoclave. Las soluciones de leche se inocularon con 1 mL del cultivo de propagación (2 matraces para cada microorganismo) y se incubaron 37°C para *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus rhamnosus* GG y 42°C para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Estos sistemas fueron los cultivos madre con cada microorganismo adaptado. Se realizó el conteo en placa de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) con el medio agar-MRS.

4.3 Fermentación

Para llevar a cabo la fermentación se prepararon 2 sistemas. A cada uno de los sistemas se les adicionó el 2 % de fuente de carbono (aguamiel o inulina) y el 10% (p/v respectivamente) de leche descremada en polvo. En el primer sistema de disolvieron 10 g de leche en 63.5 mL de aguamiel pasteurizado a 90°C por 15 min (correspondiente al 2% de fuente de carbono) y se aforó a 100 mL con agua destilada. Esta mezcla se pasó a un matraz de 250 mL previamente esterilizado. El sistema se pasteurizó a 90°C por 15 min en autoclave.

Al segundo sistema se le agregaron 2g de inulina como fuente de carbono (E NATURE, inulina de agave) y 10 g de leche y se aforó a 100 ml con agua destilada esterilizada. La mezcla se colocó en un matraz estéril. El sistema se pasteurizó a 90°C por 15 min en autoclave.

Una vez pasteurizados, los 2 sistemas se inocularon con 10^6 UFC/mL, un matraz para cada microorganismo, por triplicado. Se incubó a las mismas condiciones de tiempo y temperatura que en la etapa de adaptación.

4.4 Cinética de fermentación

Se realizó una cinética de fermentación para cada sistema con la temperatura controlada a 37° C para las bacterias probióticas y a 42 °C para la bacteria no probiótica, de acuerdo a lo establecido por Donkor et al. (2007), Meurman et al. (1995), Rajagopal & Sandine (1990). La cinética de fermentación se finalizó cuando el sistema alcanzaba un pH de 4.5 o cuando en 3 muestreos sucesivos no presentara variación el pH del sistema. Este valor de pH asegura que no hay

inhibición del microorganismo por presencia de ácido láctico. Los parámetros que se midieron durante la fermentación fueron pH, presencia de grupos amino libres y perfil proteolítico.

4.4.1 Muestreo y preparación de las muestras

Se tomó una alícuota de 5 mL cada 2 horas de cada uno de los sistemas de fermentación. Se midió el pH de cada una de las muestras. Después de hacer la medición de pH, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C por 10 minutos, en una centrifuga (Eppendorf) con la finalidad de separar la biomasa y las proteínas de alto peso molecular. El sobrenadante se reservó y se conservó en congelación a -14 °C para los análisis posteriores.

4.4.2 Determinación de grupos amino libres

Se realizó el análisis de la concentración de grupos aminos libres, por medio del método del ácido trinitrobencilsulfónico (TNBS). Un método utilizado comúnmente para medir este grado de hidrólisis es utilizando el ácido trinitrobencil sulfónico (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 la determinación:

- Se agregaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.21 M pH 8.2 en tubos de ensaye forrados con papel aluminio (debido a la fotosensibilidad de la reacción)
- En cada tubo, se agregaron 250 µL de muestra. En el tubo que se utilizaría como blanco se agregó agua desionizada
- Se agregaron 2 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 4 mL de ácido clorhídrico 1N y se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos en oscuridad
- La muestra se leyó 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. Las diluciones se leyeron en espectrofotómetro (GENESYS 10-VIS) en celdas de cuarzo a 340 nm. La ecuación de la recta obtenida para el cálculo de concentración (mg/L) fue la siguiente:

$$y = 4.278x - 0.2275$$

Los protocolos de preparación de soluciones se encuentran en el apéndice 8.2

4.4.3 Separación de fracciones peptídicas por HPLC por exclusión molecular

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.

4.5 Almacenamiento en refrigeración

Después de terminar el proceso de fermentación (al alcanzar un pH cercano a 4.5) los sistemas se almacenaron a 4°C durante 21 días. Se tomaron muestras de 5 mL a los 7, 14 y 21 días. Las muestras se centrifugaron a 6000 rpm a 4°C por 10 min. Los análisis de viabilidad y de proteólisis, se realizaron siguiendo la misma metodología que la descrita en los puntos, 4.4.2 y 4.4.3

4.5.1 Separación de péptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para observar el perfil de péptidos durante el almacenamiento en refrigeración se realizó la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se tomaron 40 μL de las muestras centrifugadas y se colocaron en tubos Eppendorf. A cada tubo Eppendorf se le añadieron 20 μL de buffer de colorante y 3 μL de β -mercaptoetanol. Los tubos se calentaron a 100°C a baño maría durante 5 minutos.

La preparación del estándar se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por BIO-RAD®. En un tubo Eppendorf se colocaron 4 μL de estándar amplio espectro de BIO-RAD, 20 μL de buffer Tris-HCl pH 6.8, 20 μL de buffer colorante, 20 μL de agua desionizada y 3 μL de β -mercapto-etanol. El estándar se calentó a 100°C a baño maría durante 5 minutos. Posteriormente se continuó con el siguiente protocolo para la preparación de los geles de electroforésis y la separación de los péptidos:

1. En un matraz kitazato, se colocó un volumen total de 9 mL de una solución base de acrilamida al 30%, 160 μ L de SDS al 1% y 4.5 mL de buffer 8.8 Tris-HCl, para preparar un gel de separación de 15% de T. Dicha solución se desgasificó durante 15 minutos con agitación suave. Se agregaron al finalizar la agitación, 50 μ L de persulfato de sodio al 10% y 5 μ L de TEMED. Se vació la mezcla de manera inmediata hasta llenar 3/5 partes de la altura total de los cristales, correspondiente a 4.5 cm. Se agregaron 2 mL de agua desionizada para asentar los geles durante el proceso de polimerización. Se dejó polimerizar la solución durante 2 horas y 30 minutos.
2. Al finalizar la polimerización del gel de separación, se preparó el gel de concentración. Se agregaron 0.53 mL de la misma solución base de acrilamida al 30%, 80 μ L de SDS al 10% y 3.47 mL buffer Tris-HCl pH 6.8. La solución se desgasificó por 15 minutos en las mismas condiciones de la solución del gel de separación. Al final de la desgasificación, se adicionaron 25 μ L de persulfato en buffer Tris-HCl pH 6.8 y 5 μ L de TEMED. La solución se vació inmediatamente sobre el gel de separación. Se colocaron los peines para formar los carriles. Se dejó polimerizar durante 2 horas.
3. Una vez polimerizados ambos geles se instaló el equipo de electroforesis (mini-PROTEAN III tetra system) en baño de hielo para realizar la separación.
4. En cada carril de los geles se inyectaron 15 a 20 μ L de las muestras preparadas previamente, dejando un espacio entre estas y el carril donde se inyectó el estándar de peso molecular conocido.
5. Se llenó la cámara del equipo de electroforesis con buffer de separación Tris-Glicina-SDS, pH 8.3.
6. Las muestras se corrieron durante 90 minutos aproximadamente, a 200 V, hasta que el frente de migración de las bandas llegó casi al final del gel de separación.
7. Una vez concluida la separación, se fijaron los péptidos con una solución de ácido acético al 7.5% (%v/v) durante 45 minutos con agitación suave.
8. Los geles se sumergieron en una solución de teñido con azul de Comassie G-250 durante 10 horas, para después desteñir el gel con una solución de ácido acético:etanol (7:10) durante 4 horas.
9. Se analizaron los geles con el programa imageJ.

Para calcular el peso molecular de los péptidos, se utilizó el patrón Broad-Range (BioRad®). Las proteínas presentes en este patrón se muestran en el apéndice 8.4

4.6 Análisis estadístico de los resultados

En todos los experimentos se realizaron repeticiones y los datos experimentales, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), se hizo la comparación de medias por el método de Tuckey's con un nivel de significancia de 0.05. El programa utilizado para el análisis fue NCSS-2007 (versión: 07-1-15). Letras diferentes indicadas en las barras de error de la gráficas de resultados, demuestran una diferencia significativa entre cada uno de los sistemas (nivel de significancia $p < 0.05$)

5. Resultados y discusión

5.1 Análisis de la concentración de carbohidratos en aguamiel

La figura 1 muestra el cromatograma obtenido durante la determinación de carbohidratos presentes en el aguamiel. La identificación de estos compuestos se realizó comparando los tiempos de retención obtenidos con los tiempos de retención de un estándar de carbohidratos.

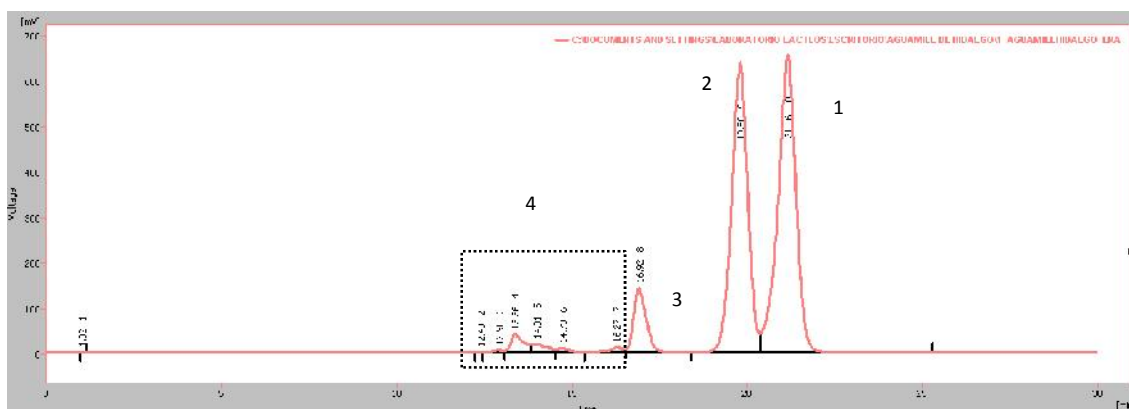


Fig. 1. Determinación de carbohidratos por HPLC en el aguamiel. (1) Fructosa (2) Glucosa (3) sacarosa y (4) polisacáridos de más de dos unidades.

Al minuto 14, se observaron picos correspondientes a polisacáridos de más de dos unidades, los cuales presentaron la concentración mas baja. A los 16 minutos se observó la presencia de sacarosa. Este pico fue el de mayor concentración para los polisacáridos. En los 19 y 21 minutos, se encontraron los carbohidratos con mayor concentración, correspondiendo a la glucosa (19 minutos) y a la fructosa (21 minutos). Considerando las áreas obtenidas y sumadas, se calculó una concentración total de 3.2% (p/v) de fuente de carbono total. 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 mas importantes del país (Nayarit, Jalisco y Michoacán).

Por otro lado, Rodríguez et al., (2007) mencionan que el aguamiel contiene una cantidad considerable de polisacáridos de mas de dos unidades por lo que puede ser considerado como un prebiótico interesante. Estos autores demostraron el

efecto del aguamiel como agente prebiótico termoprotector en *B. bifidum*, secadas por aspersión y durante almacenamiento refrigerado.

5.2 Medición de pH durante la fermentación de los sistemas Inulina-aguamiel

Durante el proceso de fermentación de *L. casei* Shirota se observó que, el pH del sistema con aguamiel alcanzó un valor final de 4.5 a las 24 horas de fermentación, mientras que en el sistema con inulina se alcanzó a las 34 horas (fig. 2).

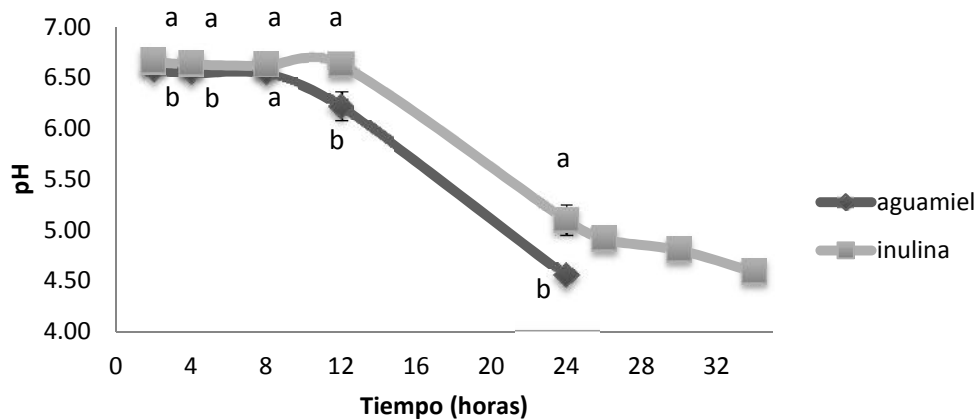


Fig. 2. Evolución del pH durante la fermentación de leche, con *Lactobacillus casei* Shirota, en sistemas enriquecidos con aguamiel y con inulina.

Durante las primeras 8 horas de fermentación no se encontró diferencia significativa en la producción de ácido láctico en ninguno de los dos sistemas. El pH se mantuvo constante hasta las 12 horas de fermentación, para el sistema con inulina, mientras que en el de aguamiel se observó un descenso significativo que continuó hasta el final del proceso. El descenso entre las 12 y las 24 horas de fermentación en este último sistema, fue significativo (6.2 a 4.54 respectivamente) y se mantuvo hasta el final de la fermentación. Por otro lado, entre los dos sistemas se encontró una diferencia significativa a las 12 horas de fermentación, con un valor de pH de 6.63 para el sistema con inulina y de 6.21 en el de aguamiel.

En el caso de los sistemas inoculados con *L. rhamnosus* GG (fig. 3) se observó que, el sistema enriquecido con aguamiel alcanzó un valor de pH de 4.5 a las 18 horas de fermentación. El pH del sistema con inulina como fuente de carbono, alcanzó el pH de 4.5 hasta las 36 horas.

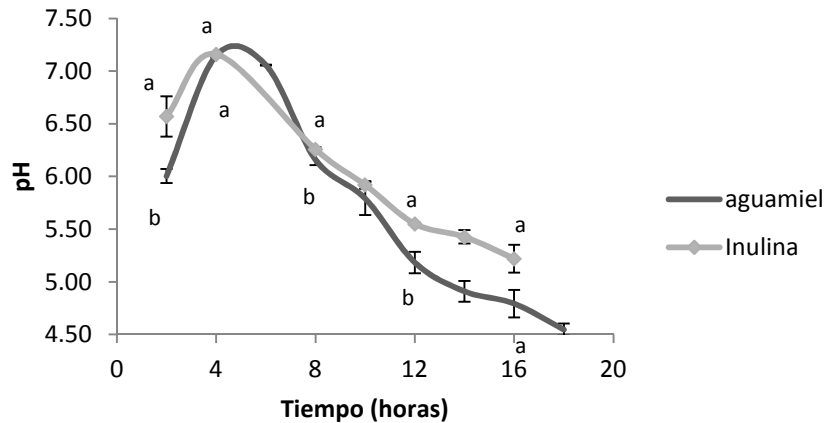


Fig. 3. Evolución del pH durante la fermentación de leche, con *Lactobacillus rhamnosus* GG, en sistemas enriquecidos con aguamiel y con inulina.

El pH se mantuvo sin diferencia significativa entre los dos sistemas, desde las 14 horas hasta el final de la fermentación. Al inicio de la fermentación (durante las primeras 4 horas del proceso) se observó un ascenso significativo en el pH, en ambos sistemas, dicho comportamiento no se ha observado con otros autores. El origen de este ascenso no se estudió, sin embargo se hicieron varias repeticiones y las curvas de pH en ambos sistemas siempre tuvieron el mismo comportamiento. Después de este tiempo se observó un descenso significativo entre las 6 y las 8 horas de fermentación. Después de las 12 horas de fermentación y hasta el final no se encontró diferencia significativa en el sistema con inulina. En el sistema con aguamiel, se encontró un descenso significativo al final de la fermentación.

Entre los dos sistemas se observó una diferencia significativa a las 12 horas de fermentación, donde el valor de pH para el sistema de aguamiel fue de 5.18 mientras que para el sistema con inulina fue de 5.5. Esta diferencia significativa se mantuvo durante todo el proceso de fermentación, hasta que el sistema con aguamiel alcanzó el pH de 4.5.

En los sistemas inoculados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se observó que el pH de 4.5 se alcanzó a las 24 horas de fermentación para ambos sistemas (fig. 4). El pH se mantuvo constante durante las primeras 8 horas de fermentación y después de este tiempo, se observó un descenso significativo y mayor en el sistema enriquecido con aguamiel, mientras que en el sistema con inulina no se encontró diferencia significativa con el valor obtenido a las 8 horas. Después de este periodo, se observó un descenso significativo en el pH de los dos sistemas hasta terminar con un valor de 4.5. La diferencia observada entre el pH de ambos sistemas, fue significativa desde el principio de la fermentación.

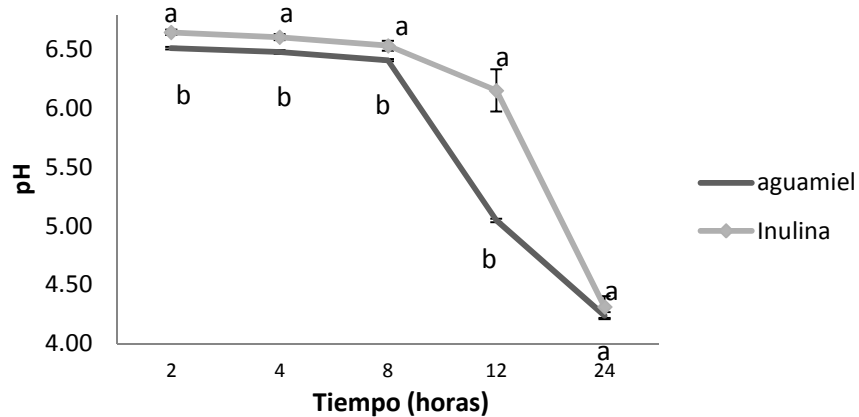


Fig. 4. Evolución del pH durante la fermentación de leche, con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, en sistemas enriquecidos con aguamiel y con inulina.

En general, los sistemas inoculados con probióticos y enriquecidos con aguamiel presentaron un descenso más rápido de pH, mientras que los inoculados con el microorganismo no probiótico, no presentaron diferencia en el tiempo de fermentación. Este efecto no se observó en los sistemas con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, lo cual puede deberse, probablemente, a que este microorganismo es homofermentativo y no muestra preferencia por la fuente de carbono en ninguno de los dos casos (Rhee & Pack, 1980). Como se sabe, el pH se ve influenciado por la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, que son metabolitos secundarios generados durante la fermentación de leche por bacterias lácticas (Corsetti et al. 1998).

Por otro lado, el crecimiento celular afecta directamente a la tasa de conversión de la lactosa a ácido láctico. Otro de los factores que influye sobre la velocidad de producción de ácido láctico es la disponibilidad de los azúcares fermentables (López et al., 2003).

Los efectos del pH sobre el crecimiento celular bacteriano, son en parte debido a las concentraciones de las formas disociadas y no disociadas del ácido láctico en el medio. Sin embargo, a pesar del agotamiento de la glucosa, se sigue produciendo ácido láctico y a pH cercano a 4 el consumo de lactosa se vuelve lento. Esta desaceleración es debida al entorno altamente ácido, que a su vez es consecuencia del bajo crecimiento celular que puede tener como consecuencia la lisis celular (Fu & Mathews, 1999). Esto quiere decir que la actividad probiótica puede generarse aun cuando las células se encuentren lisadas, debido a la liberación de enzimas que ejercen un beneficio asociado a bacterias probióticas (Vinderola & Reinheimer, 2000).

En el mismo sentido, en estudios recientes se ha observado que los azúcares como glucosa y fructosa son reducidos hasta en un 20% de su concentración inicial, durante las primeras horas de fermentación, siendo éstos los primeros en agotarse. Sin embargo, al incluir FOS (fructooligosacáridos) el patrón de reducción se incrementa de 43 al 79% en un tiempo aproximado de 48 horas (Muñoz et al., 2012).

Kaplan & Hutkins (2000) realizaron estudios enriqueciendo sistemas de fermentación con FOS. En estos estudios se utilizaron indicadores de pH, para determinar su influencia en el crecimiento celular. Estos autores observaron que 18 de 29 cepas estudiadas, fueron capaces de producir ácidos orgánicos a partir de los FOS adicionados. Cabe mencionar que, tanto en el estudio de Muñoz et al. (2012) como en este último, se concluyó que la capacidad de utilizar FOS depende de la cepa, y se encontró que el género *Lactobacilli*, en su gran mayoría, era capaz de utilizar dicha fuente de carbono. Adicionalmente a estos resultados, se comparó el crecimiento celular con glucosa como fuente de carbono y se demostró que la eficiencia del crecimiento no presentó diferencia significativa cuando se utilizaron FOS en los sistemas de fermentación, para ambos estudios.

5.3 Viabilidad durante almacenamiento en refrigeración

Después de la fermentación, los sistemas se mantuvieron por 21 días en refrigeración, con la finalidad de verificar la viabilidad de las bacterias ácido lácticas. En los sistemas inoculados con *L. casei* Shirota se observó un decremento significativo en la leche fermentada enriquecida con inulina, el cual fue de 7.58 a 7.35 log UFC/mL (fig. 5). En el caso del sistema enriquecido con aguamiel, no se encontró diferencia significativa durante todo el almacenamiento. El sistema con aguamiel comenzó con 8.28 log UFC/mL y el sistema con inulina con 7.58 log UFC/mL. Durante las dos primeras semanas de almacenamiento, se observó diferencia significativa en la cuenta viable para los dos sistemas. Sin embargo, después de la segunda semana de almacenamiento, la población bacteriana permaneció constante en ambos sistemas. Lo cual quiere decir que, para el caso de *L. casei* Shirota, el aguamiel y la inulina presentaron el mismo efecto positivo sobre su viabilidad en refrigeración.

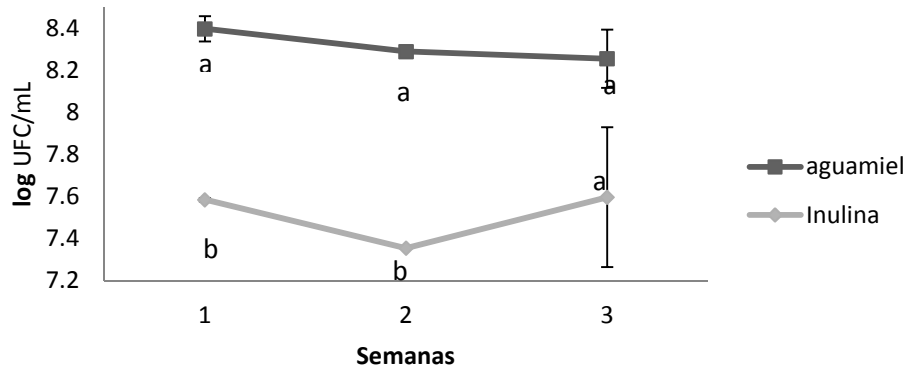


Fig. 5. Sobrevivencia de *Lactobacillus casei* Shirota durante el almacenamiento en refrigeración (14° C) durante 7, 14 y 21 días en sistemas de leches fermentadas enriquecidas con aguamiel e inulina.

En el caso de los sistemas de fermentación inoculados con *L. rhamnosus* GG (fig. 6), se observó que ambos sistemas (con aguamiel y con inulina) presentaron una diferencia significativa en la sobrevivencia de este microorganismo durante las primeras dos semanas de almacenamiento. En este periodo de tiempo, el patrón de sobrevivencia fue similar en ambos casos. Sin embargo, en el sistema con aguamiel, se presentó un descenso significativo (1 ciclo logarítmico) al final del estudio. Este descenso no mostró una diferencia en la cuenta final con el sistema inoculado con aguamiel, es decir, no se observó diferencia en la sobrevivencia, en ambos sistemas, en la tercera semana de refrigeración. Aunque, si se observó un decremento significativo al final del almacenamiento refrigerado. Por su parte, en el sistema enriquecido con inulina no se encontró diferencia significativa en la sobrevivencia durante todo el estudio. La concentración final de *L. rhamnosus* GG fue de 7.59 log UFC/mL para ambos sistemas.

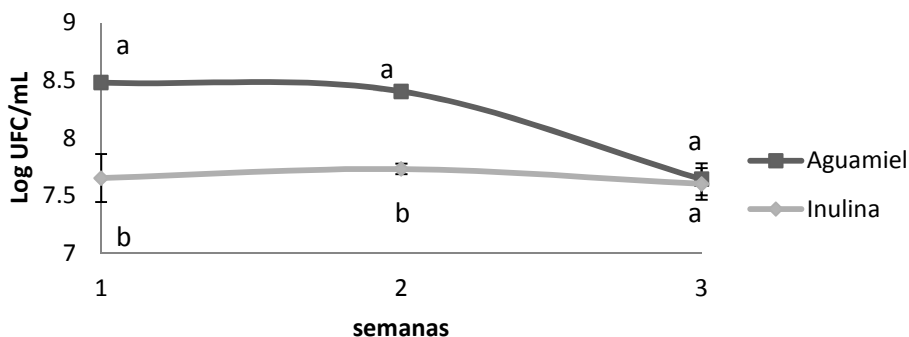


Fig. 6. Estudio de la sobrevivencia de *Lactobacillus rhamnosus* GG durante 7, 14 y 21 días de almacenamiento en refrigeración (14° C), inoculado en sistemas de fermentación enriquecidos con aguamiel e inulina.

En el caso del microorganismo no probiótico (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*), no se observó diferencia significativa en su sobrevivencia en ninguno

de los periodos de tiempo ensayados en ambos sistemas de fermentación (fig. 7). De igual manera, no se encontró diferencia significativa en la sobrevivencia de este microorganismo en ambos sistemas, durante todo el periodo de almacenamiento en refrigeración. Al final, la cuenta viable fue similar entre ambos sistemas (8.97 y 9.05 log UFC/mL para inulina y aguamiel, respectivamente).

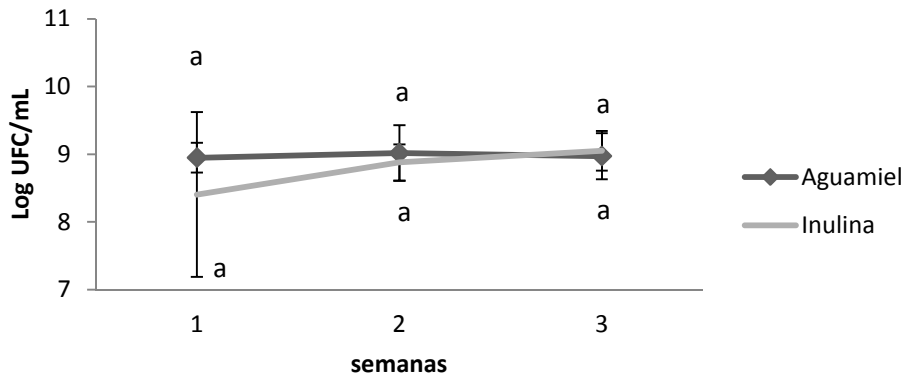


Fig. 7. Estudio de la sobrevivencia de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante 7, 14 y 21 días en almacenamiento refrigerado en leches fermentadas enriquecidas con aguamiel e inulina.

Nielsen et al. (2009), observaron que en leches fermentadas almacenadas en refrigeración (5°C) por 6 días, el número de células viables no presentaba diferencia significativa con respecto a la población inicial aunque en este estudio, los sistemas no fueron enriquecidos con ningún prebiótico.

En el presente trabajo se observó que la viabilidad de los lactobacilos a lo largo de las 3 semanas se mantuvo constante (figuras 5, 6 y 7). En el caso de *L. casei* la viabilidad fue mayor en aguamiel que en el sistema con inulina. Este mismo efecto se observó en el sistema con aguamiel inoculado con *Lactobacillus rhamnosus* GG durante las dos primeras semanas de almacenamiento mientras que en los sistemas inoculados con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* no se presentó diferencia significativa en la sobrevivencia entre los dos sistemas. En el caso de los sistemas enriquecidos con aguamiel e inoculados con microorganismos probióticos, se encontró que la cuenta viable al final del almacenamiento refrigerado, fue mayor a la recomendada para sistemas alimentarios enriquecidos con probióticos.

Según estudios de almacenamiento en bajas temperaturas, la sobrevivencia de los microorganismos puede estar determinada por la relación entre el medio externo y el microorganismo. Esto quiere decir que los componentes del medio pueden difundirse de manera pasiva a través de las células e interferir con procesos metabólicos. Es por ello que la pared celular bacteriana juega un papel importante en el transporte y control osmótico celular. Con los resultados obtenidos en dichos

estudios se puede suponer que hay ausencia de agentes crioprotectores eficientes, que determinen la resistencia de los microorganismos a temperaturas extremas (Bozoglu et al., 1987)

En los sistemas de fermentación bajo estudio, se observaron dos factores de estrés, principalmente: la baja temperatura de almacenamiento, y el bajo valor de pH. Estos influyeron de manera directa en la viabilidad de las células durante el periodo de almacenamiento.

El factor de estrés debido al pH se relaciona con la sobrevivencia de las células bacterianas, como indica Sadaghdar et al. (2012) y se ha visto, que el descenso en la viabilidad depende de la cepa y puede variar hasta en 3 ciclos logarítmicos en almacenamiento refrigerado en yogures o leches fermentadas (Sadaghdar et al. 2012; Rybka & Kailasapathy, 1995). En los sistemas de fermentación estudiados, el descenso de células viables no decreció en más de un ciclo logarítmico, sino que permitió mantener la viabilidad sin que se lisaran las células de manera significativa, es decir que la presencia de aguamiel permitió que, aún a baja temperatura, las BAL sigan utilizándolo como fuente de carbono para su sobrevivencia. En el sistema de inulina para *L. casei Shirota*, y *L. rhamnosus GG* la concentración bacteriana decreció hasta 1 ciclo logarítmico. La asociación del decremento de pH y el crecimiento microbiano, también puede estar relacionada con el sistema proteolítico de las BAL. En este estudio, la viabilidad, en ninguno de los dos sistemas, fue menor a 10^6 UFC/mL que es la cantidad mínima recomendada para ejercer efectos benéficos al organismo (Sadaghdar et al., 2012).

5.4 Determinación de grupos amino libres durante la fermentación

Con la finalidad de monitorear la proteólisis durante la fermentación, se tomaron muestras a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Del mismo modo, se tomaron muestras de los sistemas durante el proceso de almacenamiento en refrigeración a 4°C, con una frecuencia de muestreo de 7 días pues ha sido reportado que este es el tiempo requerido para observar posibles diferencias, ya que el metabolismo se encuentra desacelerado (Donkor et al., 2007).

En los sistemas inoculados con *Lactobacillus casei Shirota*, se observó que el sistema con aguamiel presentó un aumento significativo y constante en la producción de grupos amino libres durante toda la fermentación (fig. 8). La concentración inicial (a las 2 horas) fue de 0.54 mg/L, alcanzando un valor final de 0.64 mg/L (a las 24 horas).

En el caso del sistema con inulina como fuente de carbono, la concentración de grupos amino libres aumentó significativamente a partir de las primeras 4 horas de fermentación. Este aumento continuó hasta las 24 horas, en las cuales alcanzó una concentración de 0.61 mg/L. Después de este tiempo, no se observó un aumento significativo en la concentración de grupos amino libres puesto que a las 35 horas de fermentación, en este sistema, la concentración final fue de 0.62 mg/L (fig. 8).

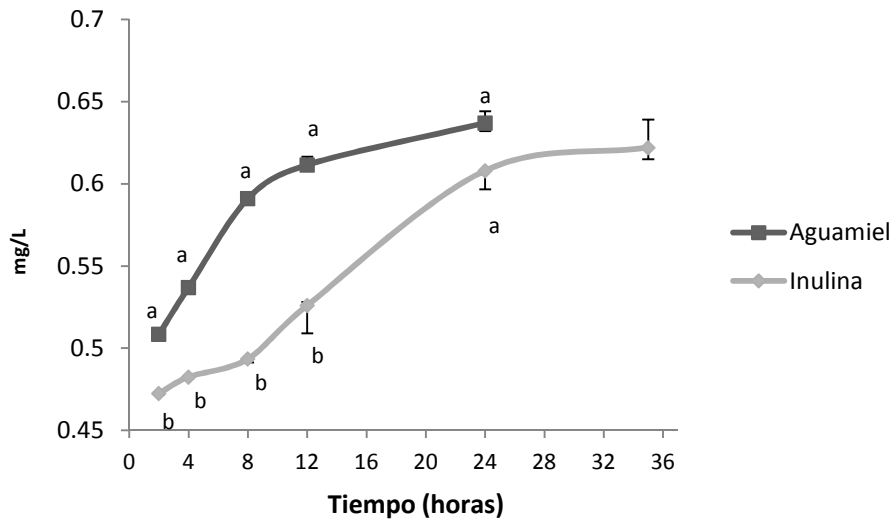


Fig. 8. Producción de aminoácidos libres, generados durante la fermentación por *Lactobacillus casei* Shirota durante la fermentación y almacenamiento refrigerado (4°C).

Por otro lado, aun cuando la fermentación del sistema con aguamiel terminó 11 horas antes que la del sistema con inulina, no se observó diferencia significativa en la concentración final de grupos amino libres entre los dos sistemas (0.622 y 0.637 mg/L, para el sistema con inulina y aguamiel, respectivamente) (fig. 8).

Para los sistemas inoculados con *Lactobacillus rhamnosus* GG (fig. 9) se observó que la concentración de grupos amino libres en el sistema con aguamiel como fuente de carbono, se mantuvo sin diferencia significativa durante las primeras 10 horas de la fermentación. Después de este tiempo, se encontró un aumento significativo al final del proceso fermentativo. Las concentraciones iniciales y final fueron significativamente diferentes (0.52 mg/L y 0.56 mg/L respectivamente).

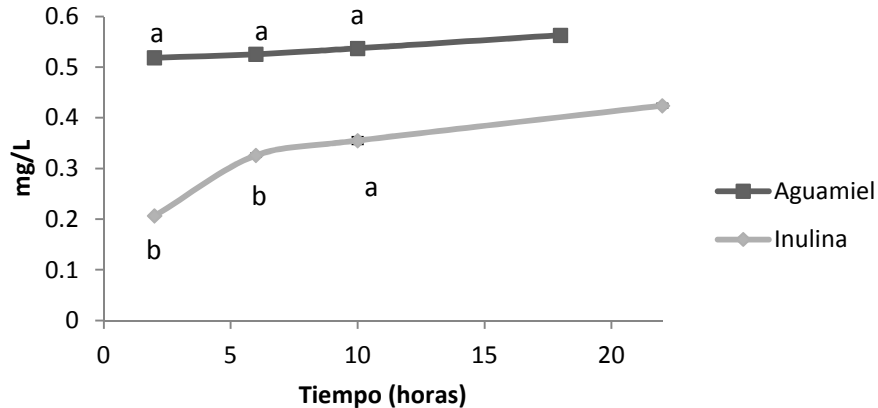


Fig. 9. Determinación de la concentración de grupos amino libres producidos durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel e inulina fermentadas por *Lactobacillus rhamnosus GG*.

En el sistema con inulina como fuente de carbono se encontró un aumento significativo en la concentración de grupos amino libres a las 2 y las 6 horas de fermentación (0.21 mg/L y de 0.33 mg/L, respectivamente). Después de este tiempo, la concentración de los grupos amino libres se mantuvo constante hasta las 10 horas (0.35 mg/L). Posteriormente se presentó un aumento significativo hacia el final de la fermentación, al término de la cual (22 horas) se alcanzó una concentración de grupos amino libres de 0.42 mg/L.

De acuerdo a los análisis realizados, el sistema con aguamiel presentó una mayor concentración de grupos amino libres (0.56 mg/L) que el sistema con inulina (0.42 mg/L) al final de la fermentación. Adicionalmente, se observó que, a las dos horas de fermentación, dicha concentración ya presentaba diferencia significativa entre ambos sistemas. Esta diferencia significativa se presentó durante las primeras 10 horas del proceso fermentativo (fig. 9). Al final del proceso, no se observó diferencia significativa entre la concentración de grupos amino libres en ambos sistemas.

Para los sistemas inoculados con la bacteria no probiótica *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se encontró que, en el caso de las leches con aguamiel como fuente de carbono, la concentración inicial se mantuvo sin diferencia significativa hacia las 4 horas de fermentación (fig. 10). Después de este tiempo se mantuvo un descenso significativo durante todo el proceso de fermentación. Al final se obtuvo una concentración de 0.47 mg/L.

Las diferencias en concentración de grupos amino libres entre las diferentes especies de lactobacilos, siempre es dependiente de sus necesidades nutricionales y de la capacidad proteolítica de cada especie (Gasson y de Vos, 1994).

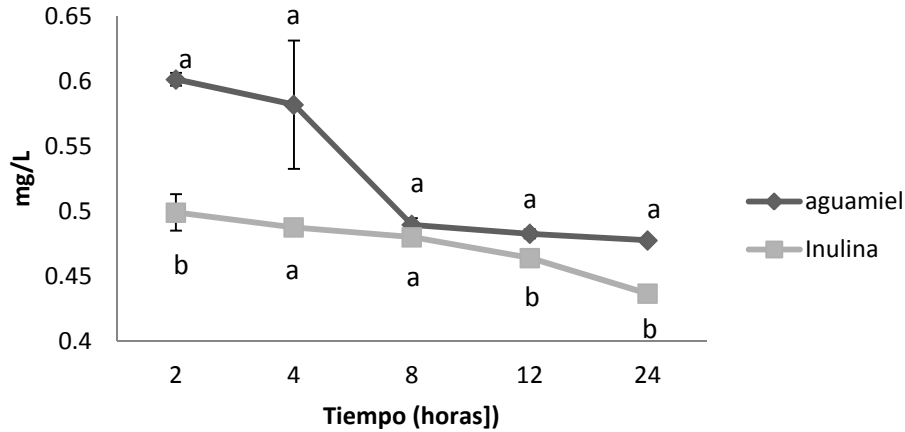


Fig. 10. Determinación de grupos amino libres en leches enriquecidas con aguamiel e inulina, fermentadas por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

En el sistema con inulina como fuente de carbono (fig. 10), se encontró el mismo patrón de comportamiento que en el sistema con aguamiel. Entre las 2 y las 4 horas de fermentación se determinó una concentración constante que inició con 0.50 mg/L. Después de este tiempo, se observó un descenso significativo hasta el final de la fermentación (24 horas) terminando con una concentración de grupos amino libres de 0.44 mg/L.

En la figura 10 se observa que la concentración inicial de los grupos amino libres a las 2 horas fue mayor en el sistema con aguamiel (0.60 mg/L) que en el que se añadió inulina (0.50 mg/L). A las 4 horas no hubo diferencia significativa entre dicha concentración en ambos sistemas y este comportamiento se mantuvo hasta las 8 horas. Sin embargo, a las 12 horas de fermentación, si se observó diferencia significativa (0.48 mg/L y 0.46 mg/L respectivamente), la cual se mantuvo durante todo el proceso. Al término de este, ambos sistemas mostraron una disminución en la concentración de grupos aminos libres siendo el valor menor el obtenido en la leche fermentada con inulina (0.44 mg/L). Al final de la fermentación se encontró una diferencia significativa entre los dos sistemas. Esta diferencia podría deberse a que la habilidad de las BAL para aumentar la densidad celular en la leche es dependiente de su sistema proteolítico que a su vez, involucra la hidrólisis progresiva de las caseínas a polipéptidos, péptidos y aminoácidos (Guo et al., 2009).

La producción de péptidos durante la fermentación se ve favorecida por diferentes factores (Gobbetti et al. 2004). Dentro de estos factores la fuente de carbono juega un papel preponderante en la actividad proteolítica. Muchas fuentes de carbono utilizadas en estudios con probióticos, son carbohidratos fermentables no digeribles con un número variable de residuos de monosacáridos (a partir de dos).

Algunos ejemplos son la lactulosa, galacto y fructooligosacáridos y almidón resistente. Se ha visto que dichos prebióticos influyen en la sobrevivencia y metabolismo de las bacterias probióticas (Saarela et al., 2000).

En estudios realizados en fermentación de leche con bacterias no probióticas (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) adicionando almidón de maíz resistente e inulina como fuentes de carbono, no se observó diferencia significativa en la producción de péptidos durante la fermentación (Donkor et al. 2007). Lo que concuerda con lo obtenido en la presente investigación, ya que en ninguno de los sistemas estudiados (enriquecidos con inulina y aguamiel como fuente de carbono) se observó inducción de la capacidad proteolítica cuando se inocularon con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Caso contrario a lo ocurrido cuando el inóculo era *L. casei* Shirota o *L. rhamnosus* GG.

5.5 Determinación de grupos amino libres durante almacenamiento refrigerado

En el análisis de grupos amino libres, por el método de TNBS durante almacenamiento refrigerado se observó que en el caso de los sistemas inoculados con *L. casei* Shirota, en la leche enriquecida con aguamiel como fuente de carbono, hubo un aumento de la concentración de grupos amino libre entre la primera y segunda semana de refrigeración, debido a la proteólisis. En la primera semana se alcanzó una concentración inicial de 0.55 mg/L y en la segunda fue de 0.61 mg/L, lo cual representa una diferencia significativa entre ambos tiempos de almacenamiento, para este sistema de fermentación (fig. 11). La concentración de péptidos, disminuyó de manera significativa de la semana 2 a la semana 3, ya que al final se obtuvo una concentración de grupos amino libres de 0.54 mg/L.

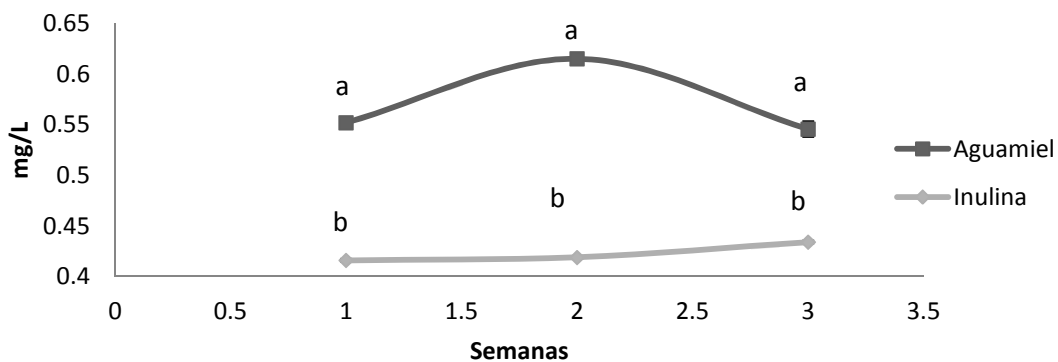


Fig. 11. Determinación de péptidos producidos en almacenamiento refrigerado por *Lactobacillus casei* Shirota.

En el sistema de fermentación enriquecido con inulina se observó que la concentración aumentó de manera significativa de la semana 2 a la 3 (fig. 11) y permaneció constante durante las dos primeras semanas de almacenamiento refrigerado. En la semana 1 se obtuvo una concentración de grupos amino libres de 0.42 mg/L y al final del almacenamiento de 0.43 mg/L.

De igual modo se observó que existió, desde la primera semana de almacenamiento refrigerado, una diferencia significativa de la concentración de grupos amino libres entre ambos sistemas. El sistema enriquecido con aguamiel tuvo una mayor concentración de grupos amino libres y esto corresponde con los resultados obtenidos desde la fermentación (fig. 11).

Este sistema integra la formación de péptidos de alto peso molecular que sirven de sustrato para que las peptidasas liberen péptidos de peso intermedio y al final los encriptados en estas cadenas, como péptidos de bajo peso molecular (Gasson y de Vos, 1994)

En el caso del sistema enriquecido con aguamiel y fermentado por *Lactobacillus rhamnosus* GG (fig. 12) no se encontró diferencia significativa en la concentración de grupos amino libres. Al inicio del almacenamiento se tuvieron 0.56 mg/L y al final 0.58 mg/L.

Un comportamiento similar fue observado en el sistema con inulina como fuente de carbono (fig. 12). La concentración inicial (semana 1) fue de 0.424 mg/L y para la semana 2 fue de 0.44 mg/L. Al final del almacenamiento se alcanzó una concentración de 0.45 mg/L. Durante todo el periodo de almacenamiento refrigerado, no se encontró diferencia significativa en la producción de grupos amino libres (fig. 12).

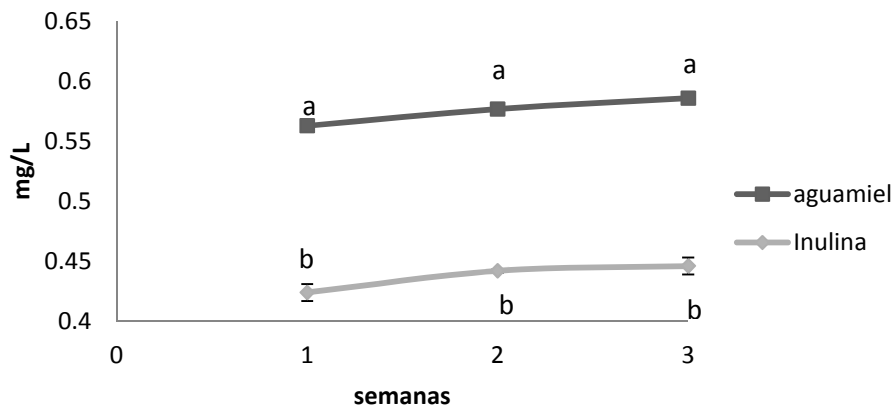


Fig. 12. Determinación de grupos amino libres durante almacenamiento refrigerado en leches fermentadas por *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Durante la primera semana de almacenamiento, se encontró diferencia significativa en la concentración de grupos amino libres entre ambos sistemas (fig. 12). Esta diferencia del comportamiento entre los dos sistemas se mantuvo durante todo el almacenamiento refrigerado. Al final de este, el sistema con aguamiel presentó mayor concentración de grupos amino libres que el sistema con inulina (0.59 mg/L y 0.45 mg/L, respectivamente).

Los resultados iniciales de las concentraciones de grupos amino libres obtenidos en todos los sistemas analizados, son derivados del final de la fermentación. En este sentido se sabe que el número de microorganismos generado durante la fermentación mantiene una alta actividad de las proteasas, sin embargo, con los largos periodos de refrigeración, la actividad de estas se vuelve menor, pero no se inactivan (Shi et al., 2014).

Como se observó, el aumento en la concentración de grupos amino libres fue lento, comparado con el proceso de fermentación. Esto se debe a que durante el almacenamiento en frío, los microorganismos utilizan los aminoácidos liberados durante la proteólisis para sobrevivir y solamente realizan el trabajo de corte cuando estos aminoácidos son insuficientes para su crecimiento (Bu et al., 2010). Los resultados de viabilidad observados confirmaron la presencia de microorganismos con la consecuente actividad metabólica. Se observó que, aun a bajas temperaturas, en ambos sistemas (con inulina y con aguamiel) y con cualquiera de los microorganismos probióticos ensayados, se alcanzaron las concentraciones mínimas de microorganismo recomendadas para proporcionar beneficios a la salud (Rybka & Kailasapathy, 1995).

5.6 Separación de péptidos durante el almacenamiento refrigerado por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para determinar los péptidos producidos durante el almacenamiento refrigerado, se tomaron muestras a los 0, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a 4°C. En el sistema fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota y enriquecido con aguamiel (fig. 13-A), las bandas correspondientes a 31 KDa (peso de la anhidrasa carbónica) se conservaron, del tiempo final de fermentación (día 0) hasta la segunda semana de almacenamiento refrigerado. Estas bandas podrían corresponder a caseínas, las cuales fueron decreciendo en su concentración hasta el final del estudio.

Por su parte, las proteínas correspondientes a 21.5 KDa (peso correspondiente a inhibidor de tripsina) no sufrieron un cambio significativo en su concentración. Sin embargo, las fracciones de peso molecular cercanas a 14.4 KDa aumentaron su concentración aparente durante el tiempo de almacenamiento. Este aumento está relacionado directamente con la disminución de la concentración de proteínas de alto peso molecular (caseínas). Adicionalmente, la concentración aparente de péptidos de bajo peso molecular (menor a 6.5 KDa) durante el almacenamiento, aumentó considerablemente de la semana 1 a la 3.

En el caso del sistema enriquecido con inulina como fuente de carbono y fermentado con *Lactobacillus casei* Shirota (fig. 13-B), se encontró que la concentración aparente de las fracciones de peso molecular cercanas a 21.5 KDa no presentó variación desde del tiempo 0 de almacenamiento refrigerado hasta la semana 3. También se observó una banda debajo de 14.4 KDa en el tiempo 0 (correspondiente al final de la fermentación). Esta banda no se volvió a observar en todo el estudio. Tampoco se observaron bandas definidas en el rango de 14.4 a 6.5 KDa, durante todas las semanas de almacenamiento. Sin embargo, se encontró una acumulación de péptidos de bajo peso molecular (menores a 6.5 KDa) desde el final de la fermentación y hasta el final del almacenamiento refrigerado, siendo más pronunciada, aparentemente, en la semana 1. Esta acumulación coincidió con la desaparición de la banda menor a 14.4 KDa.

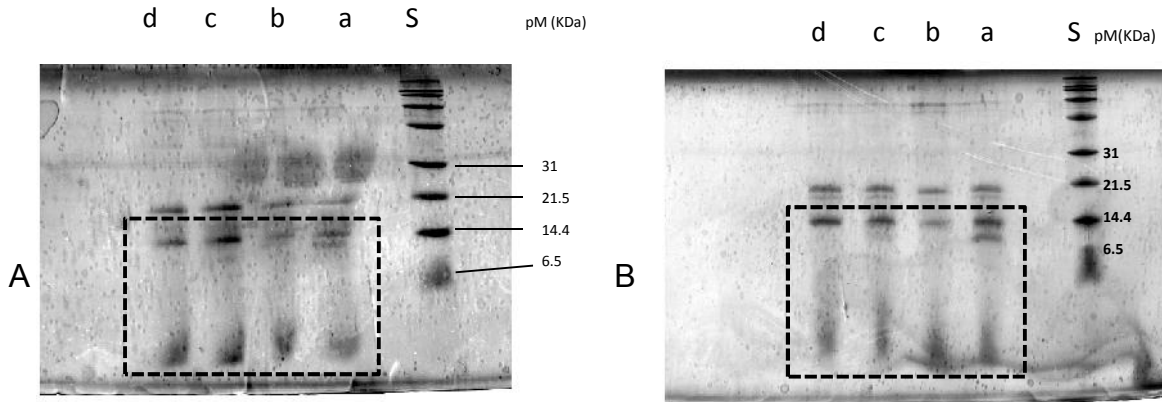


Fig. 13. Separación de péptidos en el sistema enriquecido con aguamiel (A) e inulina (B) durante el almacenamiento a 4°C con *L. casei* Shirota. Muestras: S estándar, (a) Final de fermentación, (b) semana 1, (c) semana 2, (d) Semana 3.

Comparando la concentración aparente de péptidos encontrados en ambos sistemas, se observó que esta fue mayor en el sistema con inulina que en el de aguamiel (tabla 1 a y b) puesto que se identificaron 17 péptidos en el sistema enriquecido con inulina y 14 péptidos en el sistema con aguamiel. En ambos sistemas, la banda (menor a 14.4 KDa) que se observó al final de la fermentación (tiempo 0), corresponde a un peso molecular de 12.3 KDa.

En el sistema con aguamiel, no se identificaron péptidos de pesos moleculares entre 9 y 10 KDa (tabla 1-a). El péptido de peso molecular intermedio (de 6 a 8 KDa) de 8 KDa, solo se observó en la semana 1, mientras que los péptidos de 7.3 y 6 KDa, se observaron solamente en dos semanas del estudio (final de fermentación y semana 2; y semana 1 y 2, respectivamente). Todos los péptidos, exceptuando el de 4.2 KDa, se observaron durante todo el estudio. Los péptidos de bajo peso molecular acumulados en la electroforesis, correspondieron a pesos moleculares que están por debajo de los 2.5 KDa. Por medio del analizador de imágenes, se identificaron tres péptidos con pesos moleculares de 1.6, 1.3 y 1.1 KDa. Este rango de pesos moleculares ya se había reportado previamente en la separación de péptidos de leches fermentadas comerciales (González et al. 2011).

En el caso del sistema enriquecido con inulina (tabla 1-b), se identificaron péptidos con pesos moleculares mayores y una concentración más alta con respecto a la del sistema enriquecido con aguamiel. En el sistema con aguamiel se encontraron solo tres péptidos mayores a 6KDa mientras que en el sistema con inulina se observaron seis. En el mismo sentido que en el sistema con inulina, en el sistema con aguamiel se observaron péptidos que aparecían en algunas semanas y desaparecían subsecuentemente al final del almacenamiento en refrigeración (péptidos de 8.3, 7.7, 5.9, 5.6, 5.2 y 3.6 KDa). Otros péptidos aparecieron en la primera o segunda semana de refrigeración y se mantuvieron hasta el final del

estudio (péptidos de 6.9, 4.7, 4.4 y 3.9 KDa). Al igual que en el sistema con aguamiel, en el sistema con inulina, se localizaron péptidos de bajo peso molecular que se acumularon hasta el final de la refrigeración (péptidos de 3.1, 2.8 y 2.4 KDa) aunque los péptidos acumulados en el sistema con aguamiel fueron de menor peso molecular que los del sistema con inulina.

Pesos moleculares (KDa)	Tiempo (días)				Pesos moleculares (KDa)	Tiempo (días)				
	0	7	14	21		0	7	14	21	
a		8				9.2				
		7.3		7.3		8.7	8.7			
		6		6		8.3	8.3			
		4.8	4.8	4.8	4.8			8.0	8.0	
		4.2						7.7		
			3.8	3.8	3.8		6.9	6.9	6.9	
			3.3	3.3	3.3		6.3	6.3	6.3	
		2.9	2.9	2.9	2.9			5.9		
		2.5	2.5	2.5	2.5		5.6	5.6		
		2.2	2.2	2.2	2.2		5.2	5.2		
		1.9	1.9	1.9	1.9			4.7	4.7	
		1.6	1.6	1.6	1.6			4.4	4.4	
		1.3	1.3	1.3	1.3			3.9	3.9	
		1.1	1.1	1.1	1.1			3.6	3.6	
	b						3.1	3.1	3.1	3.1
							2.8	2.8	2.8	2.8
						2.4	2.4	2.4	2.4	

Tabla 1. Pesos moleculares de péptidos producidos durante el almacenamiento en frío de leches fermentadas por *L. casei* Shirota y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b).

En el análisis de los sistemas inoculados con *Lactobacillus rhamnosus* GG (fig. 14 A y B) se observaron diferencias muy importantes en la producción de péptidos. En la leche fermentada enriquecida con aguamiel (fig. 14-A), se observaron péptidos menores a 6.5 KDa. Estos péptidos se acumularon durante las semanas de almacenamiento en refrigeración. Al mismo tiempo, se observaron péptidos con pesos moleculares menores a 6.5 KDa que se acumularon durante todo el estudio. La desaparición de algunas bandas menores a 14.4 KDa coincide con la aparición de algunos péptidos de peso molecular intermedio.

En el caso de los péptidos separados en el sistema con inulina (fig. 14-B), se identificaron algunos de menor peso molecular que el de la lactoalbúmina (14.4KDa). Sin embargo, la separación en este sistema fue menos eficiente debido a que no se encontraron péptidos de bajo peso molecular. Es decir, no se observó acumulación en la electroforesis. Solo se observaron algunas bandas, que fueron las más concentradas y que estaban en pesos moleculares cercanos a 6.5 KDa. Estos péptidos se observaron durante toda el almacenamiento refrigerado.

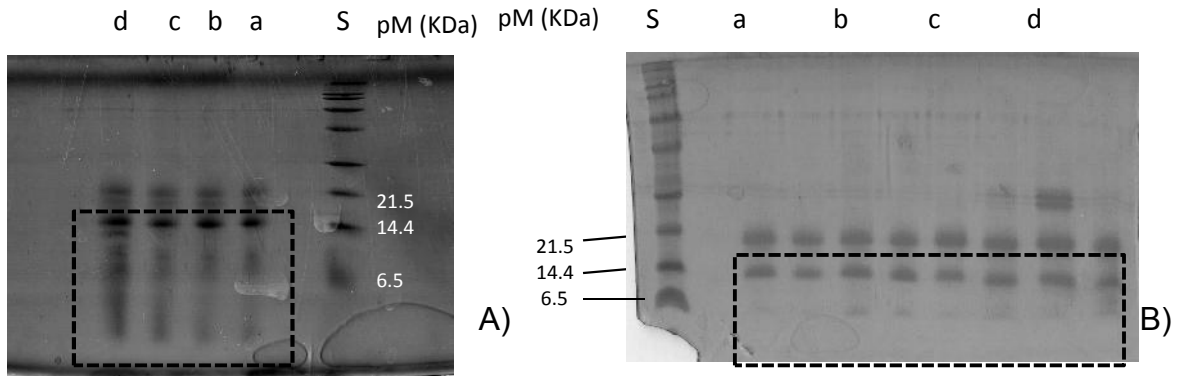


Fig. 14. Separación de péptidos en el sistema enriquecido con aguamiel (A) e inulina (B) durante el almacenamiento a 4°C con *L. rhamnosus* GG. Muestras: S estándar, (a) semana 0, (b) semana 1, (c) semana 2, (d) Semana 3.

En las tablas 2 a y b, se observan los pesos moleculares de los péptidos identificados por el analizador de imágenes ImageJ. En el sistema con aguamiel (tabla 2-a), hay péptidos de alto peso molecular (superiores a 8 KDa) que aparecen y desaparecen en las diferentes semanas del almacenamiento (péptidos 8.8, 9.1, 9.5 y 9.9 KDa). Estos péptidos no se acumularon durante el estudio. Sin embargo, los péptidos de peso molecular intermedio y de bajo peso molecular se observaron desde el final de la fermentación y se encontraron durante todo el almacenamiento refrigerado. Más importante aún es el hecho de que los péptidos de peso molecular menor a 4.6 KDa, se generaron en la semana 1 y se mantuvieron durante todo el estudio (péptidos de 4.2, 3.7, 3.3, 3 y 2.7 KDa). Esto parece indicar que, los péptidos de bajo peso molecular no se degradaron.

En el caso del sistema enriquecido con inulina (tabla 2-b) no hubo acumulación de péptidos de bajo peso molecular y sobre todo, no se encontraron péptidos con pesos moleculares menores a 4.4 KDa. El péptido más pequeño identificado, fue el correspondiente a este peso molecular. Los péptidos que se acumularon durante el estudio fueron los correspondientes a pesos moleculares entre 5.6 y 7.3 KDa (péptidos de 6.8, 6.3 y 5.9 KDa). Esto corresponde con las concentraciones aparentes observadas en los geles.

Pesos moleculares (KDa)	Tiempo (días)				Pesos moleculares (KDa)	Tiempo (días)			
	0	7	14	21		0	7	14	21
a	9.9	9.9	9.9				9.8	9.8	
	9.5	9.5		9.5		9.5	9.5		
			9.1						
	8.8	8.8		8.8					
	8.3	8.3	8.3	8.3					
	7.9	7.9	7.9	7.9					
	7.5	7.5	7.5	7.5					
	7.1	7.1	7.1	7.1					
	6.7	6.7	6.7	6.7					
	6.2	6.2	6.2	6.2					
	5.8	5.8	5.8	5.8					
	5.2	5.2	5.2	5.2					
	4.6	4.6	4.6	4.6					
		4.2	4.2	4.2					
		3.7	3.7	3.7					
		3.3	3.3	3.3					
		3.0	3.0	3.0					
		2.7	2.7	2.7					
		2.4							
	b								

Tabla 2. Pesos moleculares de péptidos producidos durante el almacenamiento en frío de leches fermentadas por *L. rhamnosus* GG y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b).

En el sistema de leche fermentada por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y enriquecida con aguamiel (fig. 15-a), no se observaron diferencias en la concentración aparente de las proteínas del suero (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina) pero si se encontró acumulación en la concentración aparente de los péptidos menores a 14.4 KDa durante todo el almacenamiento refrigerado. Del mismo modo, la concentración de los péptidos de peso molecular menor a 6.5 KDa fue en aumento subsecuente. Al final del almacenamiento se encontró una acumulación de péptidos de bajo peso molecular, que se observó en la frontera del gel (frente de corrida).

La acumulación de péptidos fue superior en el sistema enriquecido con inulina (fig. 15-b). Dicha acumulación se observó a partir de los péptidos de peso molecular alto e intermedio. Sin embargo, en el caso de los péptidos de bajo peso molecular, no se observó un cambio significativo sobre la concentración aparente durante todo el estudio. La acumulación más importante, al parecer, se da en los péptidos de peso molecular intermedio marcados entre los pesos moleculares del estándar correspondientes a 14.4 KDa y 6.5 KDa. Sin embargo, al final de la refrigeración, esta concentración disminuyó y la concentración de péptidos de bajo peso molecular cambió aparentemente.

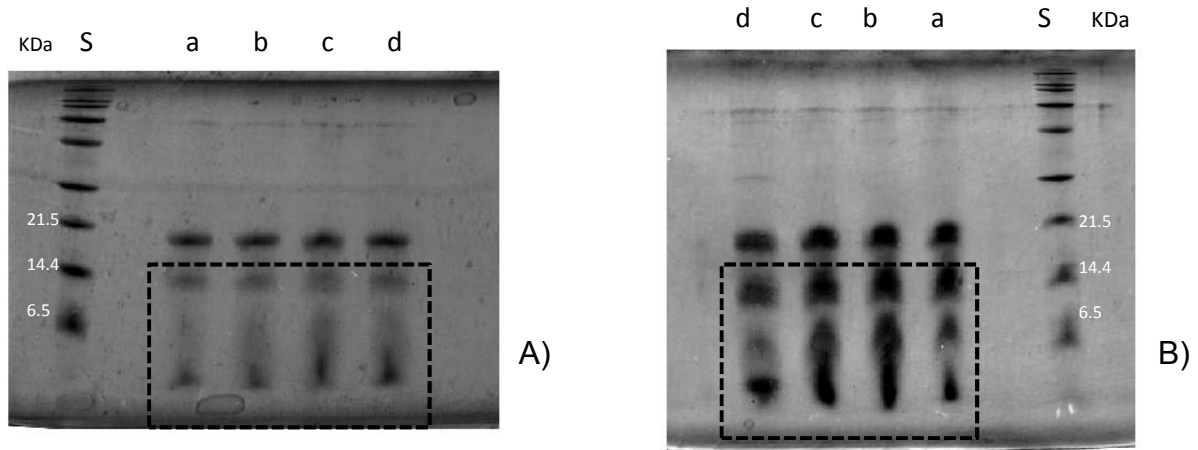


Fig. 15. Separación de péptidos en el sistema enriquecido con aguamiel (A) e inulina (B) durante el almacenamiento a 4°C con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Muestras: S estándar, (a) Tiempo 0, (b) semana 1, (c) semana 2, (d) Semana 3.

En el sistema enriquecido con aguamiel, el péptido con menor peso molecular determinado fue de 4.1 KDa (tabla 3-a). En este mismo sistema, durante todo el almacenamiento (semana 1, 2 y 3), los péptidos encontrados con mayor peso molecular fueron los correspondientes a 9.8, 9.5 y 9.1 KDa. También se observó que durante todo el estudio, hubo presencia de péptidos con pesos moleculares entre 8.7 y 4.5 KDa (8.1, 7.6, 7.3 6.9 6.8, 6.1, y 5.7, 5.3 y 4.9.) lo cual se muestra en la figura 12-a.

En el caso del sistema enriquecido con inulina, en la tabla 3-b se puede apreciar que el péptido de mayor peso molecular fue de 9.7 KDa y que el péptido con el menor peso molecular encontrado fue de 3.8 KDa. En este sistema, los péptidos correspondientes a 7.3, 6.6, 5.6, 5.1 y 4.8 KDa se presentaron durante todo el periodo de almacenamiento refrigerado. Los péptidos de 8.8 y 8.5 KDa se observaron solo en en el tiempo 0 y el tiempo 0 y la semana 3, respectivamente; mientras que los péptidos de 6.1 KDa, se acumularon únicamente en la semanas 2 y 3.

Pesos moleculares (KDa)	Tiempo (días)				Pesos moleculares (KDa)	Tiempo (días)				
	0	7	14	21		0	7	14	21	
a			9.8	9.8	b				9.7	
			9.5			8.8				8.8
		9.1	9.1	9.1		8.5				
		8.7	8.7	8.7		8.1			8.1	8.1
		8.1	8.1	8.1		7.7			7.7	7.7
		7.6	7.6	7.6		7.3			7.3	7.3
		7.3	7.3	7.3		7.0			7.0	7.0
		6.9	6.9	6.9		6.6			6.6	6.6
		6.5	6.6	6.7		6.8			6.1	6.1
		6.1	6.1	6.1		6.1			5.6	5.6
		5.7	5.7	5.7		5.7			5.1	5.1
		5.3	5.3	5.3		5.3			4.8	4.8
		4.9	4.9	4.9		4.9			4.2	4.2
		4.5	4.5	4.5		4.5			3.8	
		4.1		4.1						

Tabla 3. Pesos moleculares de péptidos producidos durante el almacenamiento en frío de leches fermentadas por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b).

Los resultados obtenidos en esta investigación son relevantes ya que se ha comprobado que en almacenamiento refrigerado, la acumulación de péptidos de bajo peso molecular, está relacionada con actividad biológica. Aunque algunos péptidos con actividad antimicrobiana tienen pesos moleculares cercanos a 10 KDa (Kuhn et al., 1993).

Las proteínas de la leche son consideradas como las más importantes fuentes de péptidos bioactivos (Korhonen, 2009). En leches fermentadas, la hidrólisis de proteínas es alrededor de 1 al 2% y esta degradación se realiza en un 80% sobre las caseínas de la leche (Meisel y Bockelman, 1999). Sin embargo, se ha observado que aun cuando la fermentación finaliza, la actividad proteolítica continúa en almacenamiento refrigerado (Nielsen et al. 2009). Vinderola et al. (2002) determinaron que, aun cuando la temperatura óptima de las enzimas del sistema proteolítico de las BAL se encuentra entre 32 y 37°C, la actividad del sistema no se pierde en refrigeración a 4°C. Lo anterior concuerda con lo observado en este estudio ya que en los sistemas analizados se observó actividad durante el almacenamiento refrigerado.

Aunado a lo anterior, se ha comprobado que la actividad biológica (especialmente la actividad antihipertensiva) aumenta generalmente en leches fermentadas almacenadas a 4°C por 28 días (Donkor et al. 2007). Estas condiciones, son similares a las utilizadas en el presente estudio. De igual manera, la capacidad de generar péptidos durante almacenamiento refrigerado se ha observado también en

leches fermentadas comerciales, sin importar el microorganismo utilizado en el proceso de fermentación (González et al., 2011).

La liberación de péptidos durante el proceso de almacenamiento refrigerado, está asociada al sistema proteolítico de bacterias vivas y a enzimas liberadas después de lisis celular (Nighswonger et al., 1996). El proceso de liberación de péptidos sigue un modelo propuesto por Gasson y de Vos (1994) el cual incluye un proceso de liberación en cascada que comienza con la hidrólisis primaria de las proteínas de la leche. En este proceso, se forman péptidos de alto peso molecular que se hidrolizan para dar péptidos de peso molecular intermedio y a partir de estos, se logra la producción de péptidos de bajo peso molecular. Los resultados obtenidos para los sistemas estudiados en este trabajo, se ajustan al modelo propuesto por estos autores, pues durante todo el almacenamiento refrigerado se observó la aparición y desaparición de péptidos de alto peso molecular y de peso molecular intermedio. Al mismo tiempo, la acumulación de péptidos fue mayor cuando se trataba de péptidos de bajo peso molecular, igual que en dicho modelo.

5.7 Caracterización de péptidos producidos durante la fermentación mediante HPLC por exclusión molecular

En la determinación de la concentración de fracciones peptídicas producidas durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel utilizando *Lactobacillus casei* Shirota como inóculo, la fracción de mayor peso encontrado fue de 37.9 KDa (fig. 16-a). La concentración de esta fracción disminuyó drásticamente y significativamente de las 4 a las 12 horas de fermentación. En este sistema, los péptidos de las fracciones con peso molecular de 7.3, 2.9, 1.6; 8.1 y 6.6 KDa se observaron solamente en uno de los periodos de fermentación analizados (4, 12 y 24 horas, respectivamente). Los péptidos que mostraron acumulación fueron los correspondientes a las fracciones de peso molecular de 3.2, 2.0 y 0.8 KDa (fig. 16-a). La fracción peptídica con mayor concentración aparente fue la de 3.2 KDa.

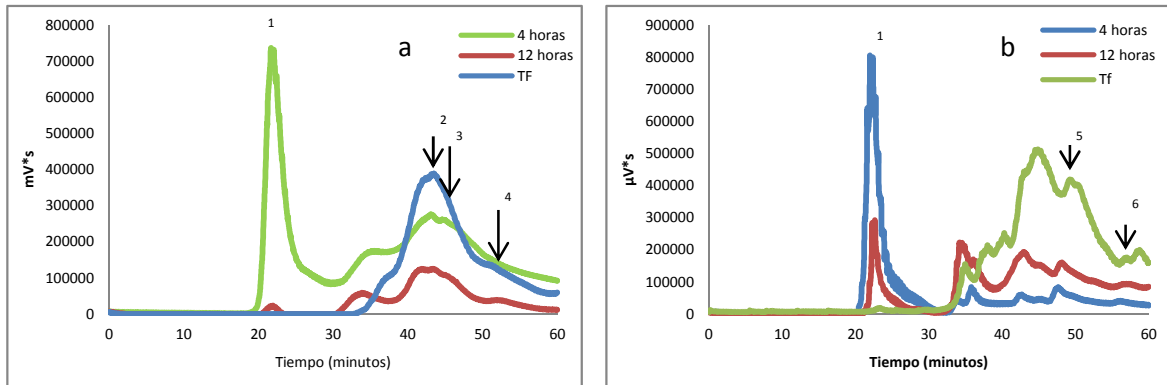


Fig. 16. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando *L. casei* Shirota. En las 4, 12 y tiempo final de fermentación (Tf) (1) 37.5 KDa (2) 3.2 KDa, (3) 2.0 KDa (4) 0.8 KDa, (5) 1.3 KDa, (6) 0.4 KDa.

Con respecto al sistema enriquecido con inulina y fermentado por *L. casei* Shirota (fig. 16-b) se observó la presencia de 2 fracciones con peso molecular mayor a 10 KDa. De estas fracciones, solo la de 33.2 KDa presentó un decremento de concentración de las 4 a las 24 horas de fermentación. Al igual que en el sistema con aguamiel, se observaron péptidos que solo aparecieron en alguno de los periodos de tiempo de fermentación (fracciones de 8.1 y 6.3 KDa a las 4 horas, fracción de 5.8 KDa a las 12 horas y fracciones de 5.1, 2.8, 2.0, 1.0 KDa a las 24 horas). Los péptidos que mostraron acumulación (de las 12 a 24 horas) fueron las fracciones correspondientes a 1.3 y 0.4 KDa.

La concentración total de péptidos de peso molecular menor a 10 KDa fue mayor en el sistema enriquecido con inulina (figura 16 a y b). Sin embargo, como se determinó en el análisis por electroforesis, se presentaron fracciones peptídicas de menor peso molecular en el sistema con aguamiel.

En la determinación de la concentración de grupos amino libres por TNBS no se encontró diferencia significativa entre ambos sistemas, sin embargo, al realizar el análisis de acumulación de péptidos de bajo peso molecular por HPLC si se observó diferencia significativa entre ambos sistemas, siendo mayor esta acumulación en el sistema con inulina aunque en el sistema con aguamiel se observaron péptidos de menor peso molecular.

En el caso del sistema enriquecido con aguamiel y fermentado por *L. rhamnosus* GG (fig. 17-a) se obtuvo una fracción con peso molecular de 29.5 KDa. La concentración aparente de esta fracción disminuyó de las 4 a las 24 horas de fermentación. En este sistema se observó que los péptidos de las fracciones con peso molecular de 3.2 y 1.1 KDa presentaron, de igual manera que en los sistemas fermentados por *L. casei* Shirota, una disminución de su concentración aparente, de las 4 a las 12 horas de fermentación. De las 12 a las 24 horas se

observó una disminución en la concentración de los péptidos de 4.3 KDa y de 0.8 KDa mientras que la concentración aparente del péptido de 0.5 KDa aumentó de las 12 a las 24 horas. El péptido de 1.1 KDa se observó durante todo el proceso de fermentación y su concentración fue constante durante toda la fermentación.

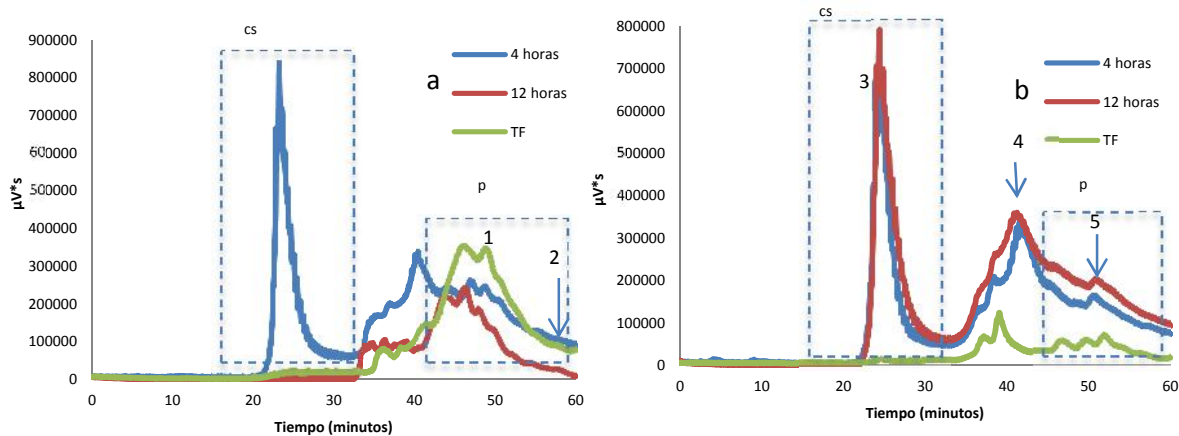


Fig. 17. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando *L. rhamnosus* GG. (1) 1.1 (2) 0.5 (3) 18.6 (4) 3.4 (5) 0.9 KDa (cs) caseínas (p) péptidos

Con respecto al sistema enriquecido con inulina y fermentado por *L. rhamnosus* GG (fig. 17-b), la fracción con mayor peso molecular correspondió a 18.6 KDa y presentó una disminución en su concentración aparente de las 4 horas a las 12 horas de fermentación desapareciendo a las 24 horas. Los péptidos correspondientes a las fracciones de peso molecular de 2.6 y 0.9 KDa aumentaron su concentración de las 4 a las 12 horas de fermentación. Por otro lado, estas fracciones y una correspondiente a 0.4 KDa permanecieron a lo largo de todo el proceso fermentativo. La concentración de la fracción de 0.9 KDa aumentó de las 4 a las 24 horas mientras que la concentración de las fracciones de 2.6 y 0.4 KDa disminuyó significativamente en este mismo periodo de tiempo para la fracción de 0.4 KDa y en el periodo de las 12 a las 24 horas para la fracción de 2.6 KDa.

Tanto en el sistema enriquecido con aguamiel como en el sistema enriquecido con inulina, la concentración de las fracciones con altos pesos moleculares (alrededor de 30 KDa) sufrió un decremento durante el proceso de fermentación (figuras 17-a y 17-b). Estas fracciones corresponden a los pesos moleculares aproximados de las caseínas. Por otro lado, se observó una acumulación de péptidos de bajo peso molecular integrada a las fracciones peptídicas de pesos moleculares menores a 3 KDa, en el sistema con aguamiel. Sin embargo, en el sistema con inulina esta concentración disminuyó.

En el sistema enriquecido con aguamiel y fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, la fracción de mayor peso molecular fue de 32.5 KDa. La concentración de esta fracción presentó un decremento significativo de las 4 a las 24 horas de fermentación (fig. 18-a). En este sistema también se obtuvieron fracciones peptídicas de 8.1, 3.9 y 7.1 KDa que solamente se observaron en un solo tiempo de fermentación (4 y 12 horas, respectivamente). En las fracciones de 5.7 y 0.7 KDa hubo una acumulación al final de la fermentación. Por otro lado, la fracción de 2.3 KDa presentó un aumento de concentración entre las 4 y las 12 horas de fermentación. Sin embargo, al final de la fermentación esta fracción no se volvió a encontrar. Caso contrario a la fracción de 1.6 KDa que se observó durante todo el proceso de fermentación. Esta fracción se acumuló al final de la fermentación.

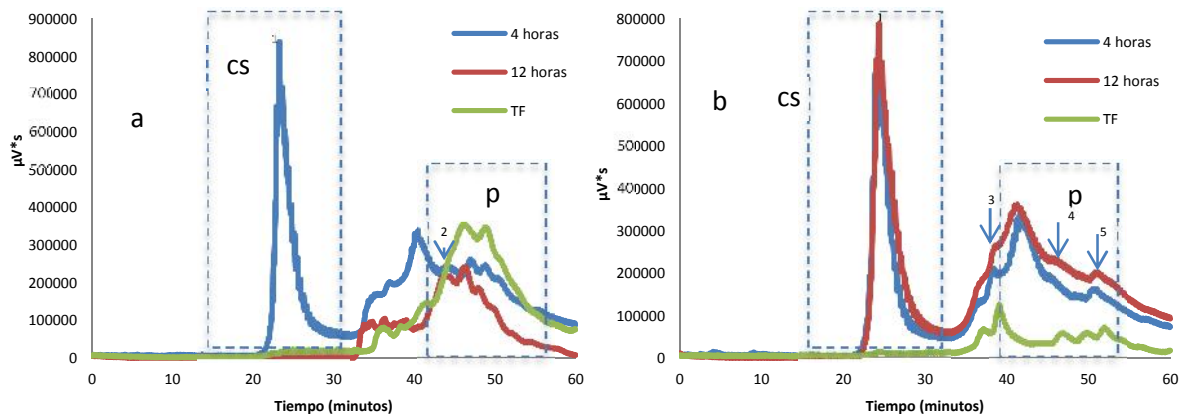


Fig. 18. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante la fermentación de leches enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (1) 32.5 KDa (2)2.3 (3) 4.4 (4)1.9 (5) 0.9 KDa (cs) caseínas (p) péptidos.

En el sistema de leche enriquecida con inulina y fermentada por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (fig. 18-b), se obtuvo una fracción de 32.5 KDa siendo ésta la de mayor peso molecular encontrada en este análisis. Esta fracción desapareció al final de la fermentación. En este sistema la fracción peptídica con peso molecular de 6.1 KDa se observó únicamente a las 4 horas. Este comportamiento puede deberse a que la proteinasa PrtB específica para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tiene la capacidad de degradar de manera directa proteínas hasta péptidos de bajo peso molecular, debido a su especificidad sobre la prolina (Courtin et al., 2002).

En este sistema, la fracción peptídica de 4.4 KDa presentó acumulación hacia el final de la fermentación. Por otro lado, la fracción de 1.9 KDa se detectó a las 4 horas, desapareció a las 12 horas y apareció nuevamente a las 24 horas mostrando

un incremento en la concentración aparente. Adicionalmente, la fracción peptídica de 0.9 KDa tuvo un aumento en su concentración de las 4 a las 12 horas de fermentación, sin embargo esta concentración disminuyó significativamente hacia el final del proceso fermentativo.

Como se puede observar en las figuras 18 a y b, las fracciones cercanas al peso molecular de las caseínas disminuyen en su concentración en diferentes tiempos de fermentación. En el sistema con aguamiel, en las primeras horas, mientras que en el sistema con inulina esta concentración se mantiene constante y disminuye hacia el final del proceso.

Para las fracciones peptídicas de menor peso molecular, se puede observar una mayor acumulación en el sistema con aguamiel que con el de inulina. Adicionalmente en esta misma zona se puede observar que hay mayor número de picos que corresponden a este tipo de péptidos. Estos péptidos tienen pesos moleculares menores a 3 KDa.

Las diferencias entre los sistemas de fermentación, pueden deberse a varios factores. Estos factores, además de ser esenciales en el desarrollo de los microorganismos, son esenciales para su actividad proteolítica. Adicionalmente a los componentes del medio, la concentración y la composición química de los carbohidratos juegan un papel preponderante en el desarrollo metabólico, el cual tiene una relación directa en la degradación protéica (Heller, 2001). Se ha observado que en sistemas de fermentación con fructooligosacáridos, las bacterias lácticas tienen un desarrollo superior que cuando la fuente de carbono es un carbohidrato simple o un disacárido (Miremedi & Shah, 2012).

Aunque algunos estudios donde se han evaluado fibras dietéticas no han encontrado diferencia significativa en la producción de péptidos ni en la acumulación de aquellos con bajo peso molecular (Mei, et al. 2011).

En otro estudio realizado con almidón de maíz resistente e inulina como fuente de carbono, tampoco se encontró diferencia significativa en el nivel de proteólisis durante la elaboración de yogurt (Donkor et al. 2007).

En esta investigación se observó que, cuando se utiliza aguamiel como fuente de carbono y *L. rhamnosus* GG como inóculo, hay una diferencia significativa en la producción de péptidos y en la acumulación de aquellos con bajo peso molecular. Caso contrario a lo observado en los sistemas enriquecidos con aguamiel pero con *L. casei* Shirota o *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* como inóculo. Esto podría indicar que las necesidades nutricionales de *L. rhamnosus* GG son mayores que las de los otros dos microorganismos ensayados, por lo que su sistema proteolítico es más activo. Otra suposición que deriva de estos resultados, es que

el aguamiel provoca una inducción en el sistema proteolítico de la BAL, sin embargo, es necesario realizar otros análisis para confirmar este supuesto.

Una proteólisis mejorada se atribuye a la actividad proteolítica de las BAL y/o a una activación de la proteólisis (Gobbetti et al. 2004). La proteólisis de las BAL es debida a un sistema enzimático proteolítico exhaustivo, debido a sus complejos requerimientos de aminoácidos (Bergamini et al., 2006).

Lo anterior concuerda con lo obtenido en este trabajo donde se observó un patrón establecido de rompimiento de proteínas en los medios utilizados (leche enriquecida con aguamiel e inulina). 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. En este estudio, las proteínas de las fracciones de peso molecular cercano a las caseínas, disminuyeron su concentración durante la fermentación.

Se ha observado que las BAL utilizan las caseínas, principalmente (80% de preferencia) sobre las proteínas del suero para generar los cortes primarios (González, 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 de las BAL. 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).

5.8 Caracterización de péptidos producidos durante almacenamiento refrigerado mediante HPLC por exclusión molecular

Se determinó la acumulación y formación de péptidos de bajo peso molecular en refrigeración, a través de un análisis de HPLC por exclusión molecular. En el caso de las leches fermentadas por *L. casei* Shirota, las fracciones peptídicas de 5.8 y 2.2 KDa solo se observaron en la primera semana de almacenamiento (fig.19-a). Las fracciones de 3.2 KDa y de 1.9 KDa se acumularon al final de la fermentación. La fracción con menor peso molecular fue de 0.7 KDa, cuya concentración disminuyó al final de la fermentación. La disminución de la concentración de este péptido podría deberse a las necesidades nutricionales del microorganismo, el cual degrada estas fracciones peptídicas sin permitir que se acumulen (Gasson & de Vos 1994).

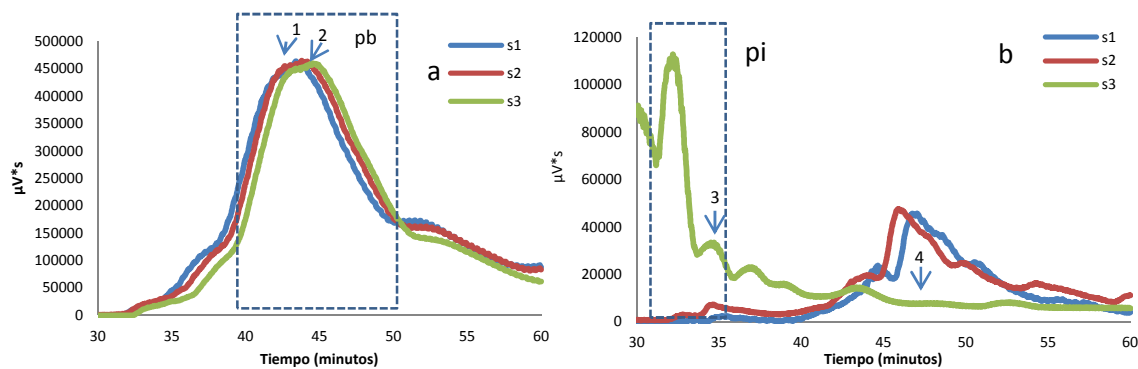


Fig. 19. Cromatogramas obtenidos de HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante el almacenamiento refrigerado de leches fermentadas y aguamiel (a) e inulina (b) usando *L. casei* shirota (1) 3.2 (2) 1.9 (3) 7.3 (4) 9.76 KDa.

En la leche fermentada enriquecida con inulina y almacenada en refrigeración (fig. 19-b) se observó acumulación de las fracciones peptídicas de 2.3 y 1.7 KDa solo hasta la semana 2. Después de este tiempo no se volvieron a detectar. La fracción peptídica de 7.3 KDa se presentó en concentraciones mínimas durante todo el almacenamiento. La fracción de 9.76 KDa se encontró solamente en la tercera semana de fermentación. En este sistema, se encontró una mayor acumulación de péptidos de peso molecular intermedio (es decir, mayor a 7 KDa) (figura 19-b), mientras que en el sistema enriquecido con aguamiel, se observó una acumulación de fracciones peptídicas en la sección de péptidos menores a 4 KDa (figura 19-a).

En el sistema de leches refrigeradas enriquecidas con aguamiel y fermentadas por *L. rhamnosus* GG (fig. 20-a), se obtuvieron, en la primera semana de fermentación, 8 fracciones peptídicas de las cuales, solamente dos (la de 1.0 y la

de 0.5 KDa), se volvieron a observar en la semana 2. Las demás se observaron hasta la semana 3 (7.2, 5.7 y 2.2 KDa) o no se volvieron a encontrar (4.6, 1.8 0.7 KDa). La fracción de 2.2 KDa fue la de mayor concentración aparente en la semana 3. El único péptido que se encontró en todas las semanas de refrigeración fue el de 1.0 KDa. El péptido con mayor concentración aparente al final del almacenamiento refrigerado fue el de 1.5 KDa.

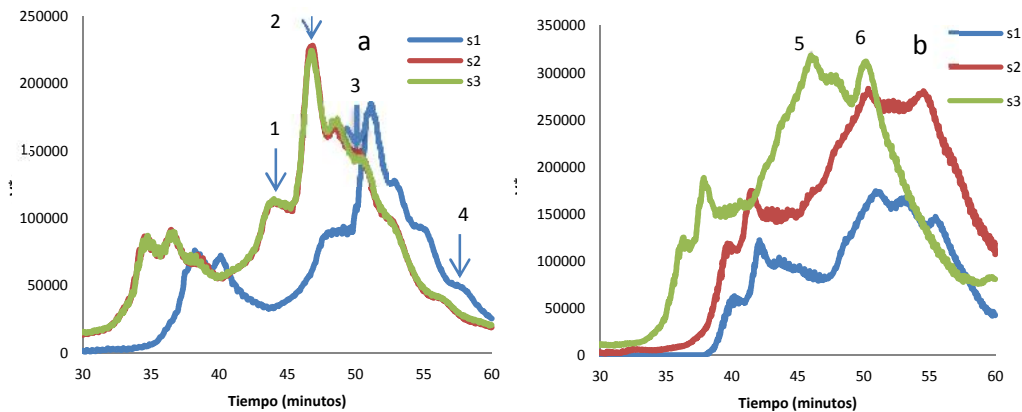


Fig. 20. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante el almacenamiento refrigerado de leches fermentadas y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando *L. rhamnosus GG*. (1) 2.2 (2) 1.5 (3) 1.0 (4) 0.5 (5) 2.1 (6) 1.0 KDa.

En el caso del sistema con inulina (fig. 20-b) se encontraron menos fracciones peptídicas durante el almacenamiento refrigerado. Sin embargo, se observó la acumulación de la fracción de 1.0 KDa y la presencia de la fracción correspondiente a 2.1 KDa, que fue la de mayor concentración al final de la refrigeración. Las demás fracciones no se observaron al final del almacenamiento. Estos datos concuerdan con los patrones observados en los geles de electroforesis, para ambos sistemas, en cuanto a la separación de péptidos y acumulación de los de bajo peso molecular.

El péptido de 1 KDa se observó en ambos sistemas, el cual se acumuló durante la refrigeración, lo cual es importante debido a que se ha observado que algunos péptidos que se acumulan en refrigeración, con pesos moleculares menores a 3 KDa tienen potencial bioactivo (Nighswonger et al. 1996; Nielsen et al. 2009).

En el sistema fermentado por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* enriquecido con aguamiel y almacenado en refrigeración (fig. 21-a) se acumularon péptidos de 2.1 y 1.4 kDa hasta la segunda semana de almacenamiento. En la semana tres, la concentración de estos péptidos disminuyó significativamente. Por otro lado, se separó una fracción peptídica de 0.4 kDa que se observó en todo el almacenamiento refrigerado cuya concentración aumentó significativamente al final de

la fermentación. Los demás péptidos observados no tuvieron acumulación y solo se presentaron en una sola semana.

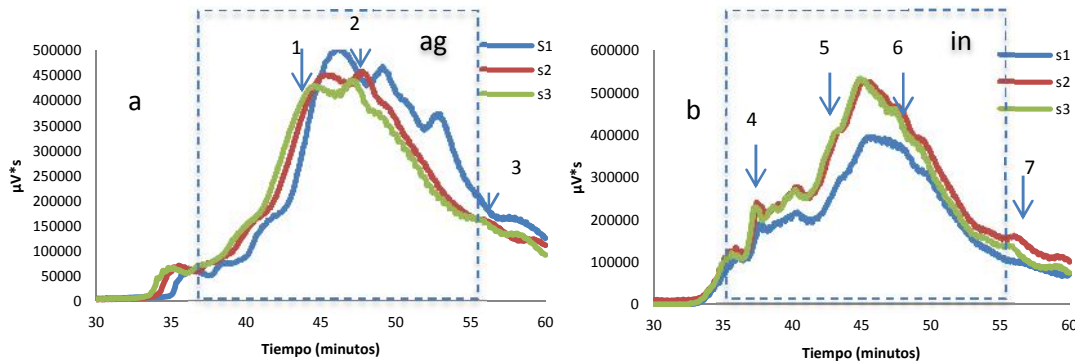


Fig. 21. Cromatogramas obtenidos por HPLC en columna de exclusión molecular a 220 nm durante el almacenamiento refrigerado de leches fermentadas y enriquecidas con aguamiel (a) e inulina (b) usando *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (1) 2.1 (2) 1.4 (3) 0.4 (4) 5.2 (5) 1.9 (6) 1.4 (7) 0.5 kDa.

En el sistema con inulina (fig. 21-b) se observaron tres péptidos acumulados, que fueron los correspondientes a las fracciones de 5.2, 1.9 y 1.3 kDa. La fracción peptídica de menor peso molecular fue de 0.5 kDa, sin embargo esta fracción no se acumuló durante el periodo de estudio.

En la figura 21-a se observa que, en el sistema con aguamiel se encontraron fracciones peptídicas con menor peso molecular comparadas con el sistema con inulina (fig. 21-b), donde no se observó acumulación de estas fracciones. Por otro lado, en ambos sistemas se observaron péptidos acumulados desde la primera semana de almacenamiento. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en electroforesis, donde no se encontró diferencia significativa en los péptidos acumulados durante la refrigeración.

Las BAL predominantemente usan péptidos para cubrir su demanda compleja de nitrógeno. Se ha visto que algunas especies, necesitan aproximadamente 20 aminoácidos diferentes provenientes de péptidos para su crecimiento y sobrevivencia (Gänzle et al., 2007). De la proteólisis de las proteínas de los alimentos, algunos de los residuos peptídicos que no han sido ocupados por las bacterias han sido identificados como bioactivos, por ejemplo, los derivados de las b-caseínas han demostrado actividad opiácea, antitrombótica y antihipertensiva entre otras.

El estado fisiológico de las bacterias probióticas es importante, ya que de ello depende la producción de metabolitos tales como péptidos de cadena corta y bajo peso molecular con potencial actividad biológica o aminoácidos, los cuales contribuyen a las características sensoriales del producto (Smacchi & Gobbetti,

1998). Algunos factores que influyen en el estado fisiológico son el estrés térmico, el medio de fermentación y la fuente de carbono. Se ha observado que al almacenar en refrigeración (8°C) los productos adicionados con bacterias probióticas, éstas reducen drásticamente su actividad proteolítica (Heller, 2001), sin embargo, en el presente estudio, se obtuvo acumulación de péptidos de bajo peso molecular en condiciones de almacenamiento refrigerado y el aguamiel utilizado como medio de carbono permitió la sobrevivencia y la producción de metabolitos por parte de las bacterias probióticas ensayadas.

6. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos y a los objetivos planteados, se puede concluir lo siguiente:

- El aguamiel de Epazoyucan, Hgo. presenta una composición de carbohidratos similar a la reportada para aguamieles provenientes de otras regiones del país.
- El aguamiel promovió el descenso del pH en los sistemas de fermentación inoculados con probióticos.
- El aguamiel utilizado como fuente de carbono en los sistemas ensayados promueve la sobrevivencia de las bacterias probióticas únicamente durante las primeras dos semanas de almacenamiento refrigerado.
- El aguamiel como fuente de carbono podría influir en la actividad proteolítica de las bacterias ácido lácticas ensayadas durante la fermentación y almacenamiento refrigerado, ya que la concentración de los grupos amino libres fue mayor en los sistemas enriquecidos con aguamiel que en los sistemas con inulina.
- Las bacterias ácido lácticas probióticas y la no probiótica produjeron una mayor concentración de péptidos de bajo peso molecular en los sistemas enriquecidos con aguamiel.
- La separación de fracciones peptídicas por HPLC demostró que la acumulación de péptidos de bajo peso molecular sigue un patrón de cascada. Este sistema, incluye la acción de todas las enzimas involucradas en el sistema proteolítico de bacterias lácticas. De igual manera se pudo comprobar que las necesidades nutricionales de cada especie provocan un perfil peptídico diferente para cada una de ellas.
- El aguamiel presenta un elevado potencial como agente prebiótico ya que al igual que cuando se utiliza la inulina como fuente de carbono, permite la obtención de cuentas viables de bacterias probióticas superiores a la mínima recomendada para proporcionar efectos benéficos al consumidor durante el almacenamiento refrigerado.

7. Perspectivas

La investigación de probióticos y sobretodo de la sobrevivencia de estos, con fuentes prebióticas alternas a la inulina, son un campo de estudio de suma importancia para la elaboración de alimentos e ingredientes funcionales.

Dentro de los estudios que se recomiendan en particular para finalizar la investigación y que quede como precedente en las áreas de producción y tecnología, son:

- La investigación de probióticos y sobretodo de la sobrevivencia de estos, con fuentes prebióticas alternas a la inulina, son un campo de estudio de suma importancia para la elaboración de alimentos e ingredientes funcionales.
- Dentro de los estudios que se recomiendan en particular para finalizar la investigación y que quede como precedente en las áreas de producción y tecnología, son:
- Incluir un estudio de fermentación de aguamiel, con un seguimiento vía HPLC, para verificar el uso de oligosacáridos propios de este material, por las bacterias lácticas
- Efectuar estudios de producción de ácidos orgánicos de cadena corta así como de enzimas liberadas por la lisis celular de las bacterias ácido lácticas probióticas para determinar el potencial prebiótico del aguamiel.
- Mejorar los esquemas de separación e identificación de péptidos de bajo peso molecular, por la importancia que guarda su potencial bioactivo. Estas mejoras se pueden realizar utilizando HPLC en fase reversa en separaciones consecutivas.
- Realizar estudios in vitro de sobrevivencia a las barreras biológicas de la digestión, de los probióticos en presencia de aguamiel como prebiótico (simbióticos).

8. Anexos

8.1 Preparación de los medios de cultivo

Agar MRS (Man Rogossa y Sharpe)

Se tomaron 55 g/L de agar MRS y se agregó 1.2% de agar bacteriológico se diluyó en agua destilada se agitó durante 5 min. Aproximadamente y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Medio de fermentación

Matraz madre: Se preparó con leche en polvo diluida en agua destilada al 10% (p/v).

Sistemas de fermentación: se tomaron 100 mL de leche al 10% y se agregaron 100 mL de aguamiel (62.5 mL aforados en 100 mL).

Para el siguiente sistema se tomaron 2 g de inulina comercial (de agave enature) y se aforaron a 100 mL, se le agregaron 100 mL de leche al 10% (%p/v).

Los medios se prepararon en matraces de 250 mL que se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos previamente a su utilización. Después ya con el medio añadido se pasteurizó a 90°C durante 20 minutos en autoclave.

El aguamiel se obtuvo de la región de Epazoyucan, estado de Hidalgo, se obtuvo directamente del productor. Se filtró y se almacenaron en frascos de vidrio (previamente esterilizados) y se pasteurizó a 90° C durante 15 min. Después de esto se almacenó a -18°C. Cuando se requería utilizar el aguamiel se descongelaba en refrigeración y se centrifugaba a 4000 rpm a 4°C durante 20 minutos.

8.2 Preparación de reactivos para TNBS

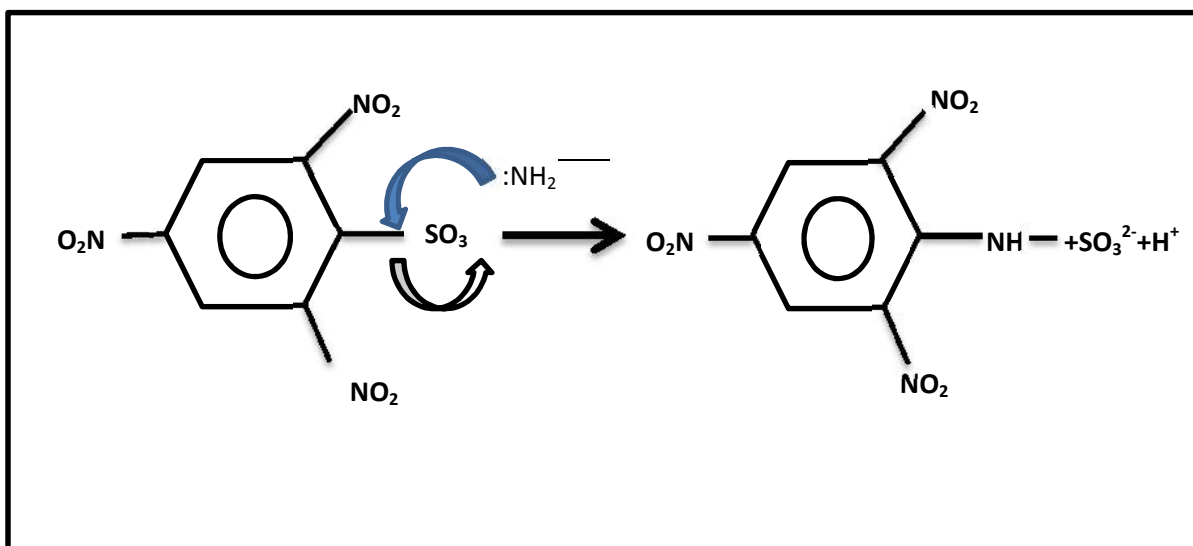


Fig. 22. Reacción de un grupo amino libre con el ácido 2-3, trinitrobenzil sulfónico.

Amortiguador de fosfatos pH=8.2 (0.21 M)

Se aforan a 250 mL 9.2525g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) y también se afora a 50 mL 1.3360 g de fosfato de potasio monobásico. Se ajusta el pH agregando el fosfato de potasio monobásico al fosfato de potasio dibásico hasta un pH de 8.2.

- ❖ Solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N.

Se aforan 0.970 mL de HCl 10.3 N a 100 mL

- ❖ Solución de ácido de TNBS 0.10%.

Se aforan a 25 mL con amortiguador de fosfatos (pH=8.2) 500 μ L de TNBS (5% p/v).

8.3 Curva de concentración para el análisis de grupos amino libres

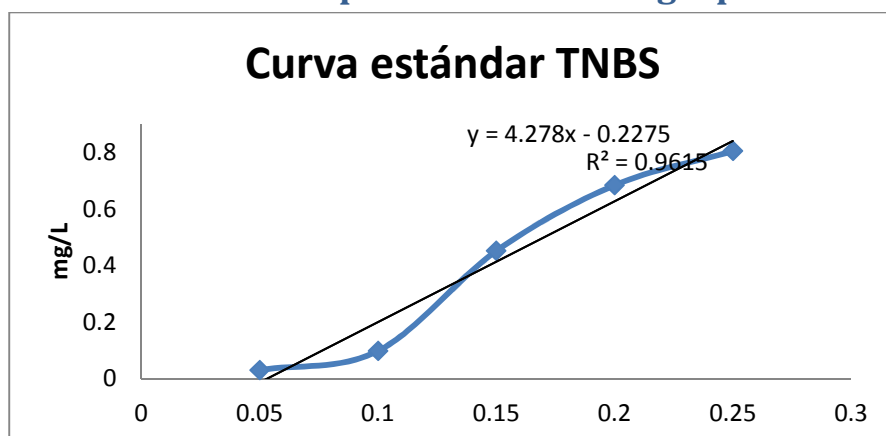


Fig. 23. Curva obtenida con concentraciones conocidas para determinación de concentración de grupos amino libres.

8.4 Reactivos para electroforesis

AZUL DE COOMASSIE

Reactivos:

- 450 mL de etanol al 96%
- 50 mL de ácido acético glacial
- 2.5 g de azul de Coomassie
- 500 mL de agua destilada

Preparación:

A partir de una solución de agua, ácido acético y etanol, mezclados se añade el azul de coomassie. Se agitó durante toda la noche para que el tinte se disolviera bien, se filtró y se guardó en frascos ámbar hasta su uso.

Solución de stock de acrilamida (30%)

Se diluyó del reactivo de Acrylamida Bis solución (BIO-RAD) con concentración de 40% hasta llegar a 30% de concentración.

COMPOSICIÓN DEL GEL DE SEPARACIÓN (T=15%)

Solución de stock de acrilamida	5 mL
Buffer de separación pH 8.8	5mL
SDS	160 µL

El %T denota el porcentaje total de concentración de ambos monómeros (acrilamida y bisacrilamida), el %C denota el porcentaje de enlaces intercrossados relativos. La solución se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

Solución amortiguadora de la muestra

Se mezclaron 0.95 mL de agua desionizada, 0.25 mL de Buffer tris-HCl 0.5 M pH= 6.8, 0.20 mL de glicerol, 0.40 mL de SDS al 10% y 0.10 mL de azul de bromofenol al 1%.

SOLUCIÓN REGULADORA TRIS HCl 1.5 M PH 8.8

Tris (hidroximetil amino metano) 18.15 g. Se disolvió en 80 mL de agua desionizada y se ajustó a pH de 8.8 con HCl 6 N y por último se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Solución reguladora tris HCl 0.05 M pH 6.8

Tris (hidroximetil amino metano) 6.0 g. Se disolvió en 60 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 6.8 con HCl 6 N y por último se aforó a 100 mL con agua desionizada.

SOLUCIÓN DE DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS) 10%

Se tomaron 0.1 g de dodecil sulfato de sodio y se aforaron a 1 mL con agua desionizada. Se almacenó a 0°C.

Solución de persulfato de amonio al 10%

Se pesó 0.1 g de persulfato de amonio. Solución reguladora Tris-HCl pH 8.8 y 6.8 1 mL. Esta solución se preparó inmediatamente antes de usarse en un vial limpio.

SOLUCIÓN REGULADORA DE CORRIDA TRIS-GLICINA-SDS PH 8.3 (1X)

Tris (hidroximetil) aminometano 4.5 g

Glicina 21.6 g

SDS 1.5 g

Se ajustó el pH a 8.3 con HCl 6 N y se aforó a 300 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4° C.

Solución destiñidora ácido acético (7%)-metanol (10%)

Se tomaron 20 mL de metanol, 14 mL de ácido acético, se mezclaron y aforaron a 200 mL con agua desionizada se almacenó a 4° C.

8.5 Estándar de pesos moleculares

Proteína	PM (KDa)
Miosina	200
β -galactosidasa	116.25
Fosforilasa b	97.4
Sero albúmina	66.2
Ovoalbúmina	45
Anhidrasa carbónica	31
Inhibidor de tripsina	21.5
Lizosima	14.4
Aprotonina	6.5

Tabla 4. Pesos moleculares correspondientes a las proteínas utilizadas como muestra estándar.

Proteína	Peso molecular (KDa)
Trisofosfato isomerasa	26.625
Mioglobina	16.950
α -Lactoalbúmina	14.437
Aprotonina	6.512
Insulina	3.496

Tabla 5. Pesos moleculares correspondientes a las proteínas utilizadas como estándar para análisis en HPLC.

8.6 Curva de calibración para los geles de electroforesis

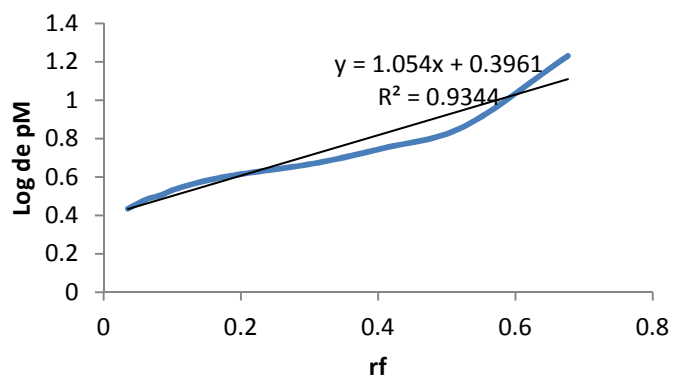


Fig. 24. Curva de calibración. Almacenamiento en refrigeración *L. casei* Shirota.

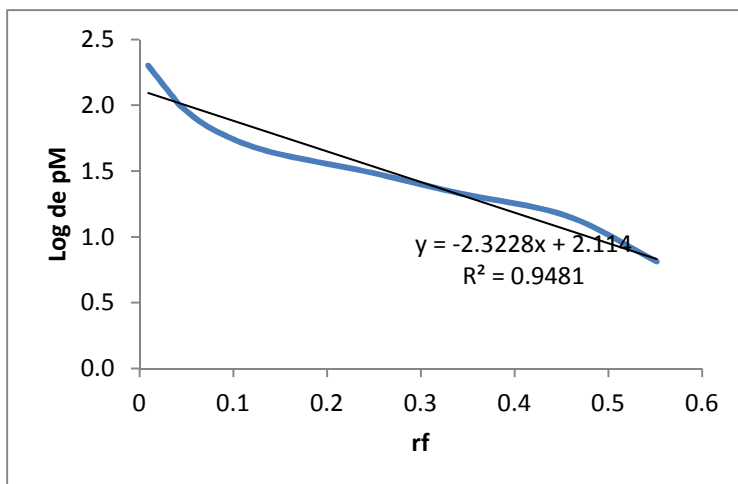


Fig. 25. Curva de calibración. Almacenamiento en refrigeración. *L. casei* Shirota. Sistema enriquecido con inulina.

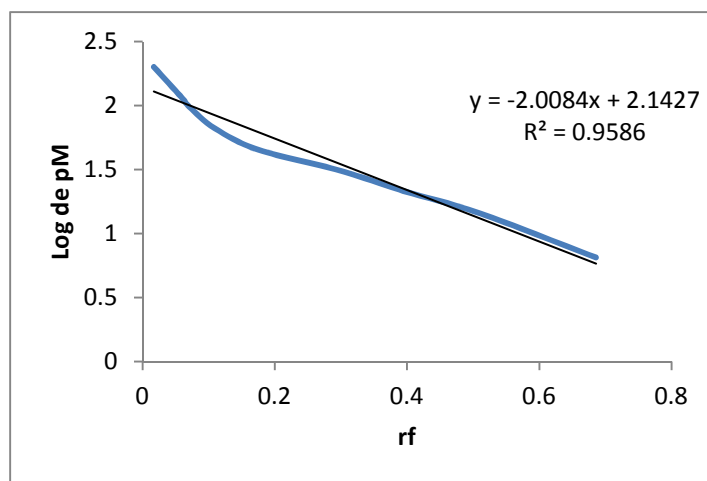


Fig. 26. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado, Sistema enriquecido con aguamiel. *L. rhamnosus*.

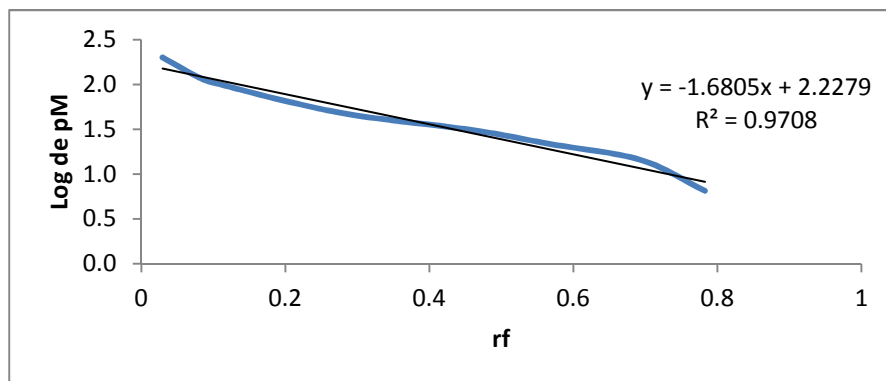


Fig. 27. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con inulina. *L. rhamnosus*.

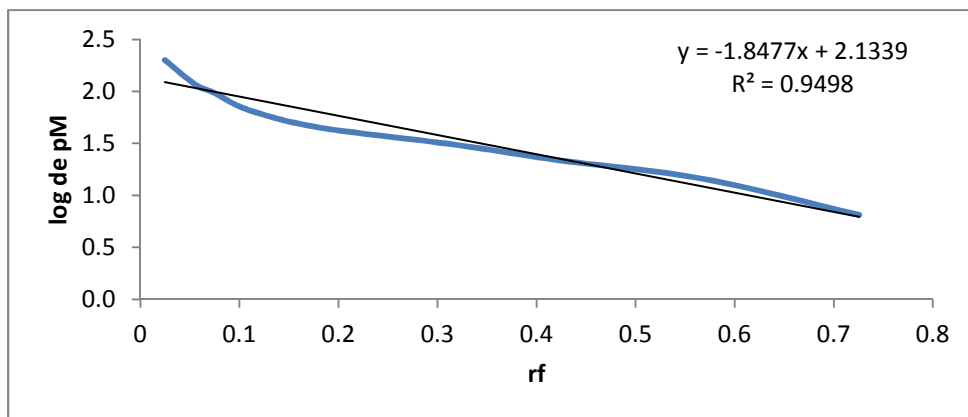


Fig. 28. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con aguamiel. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

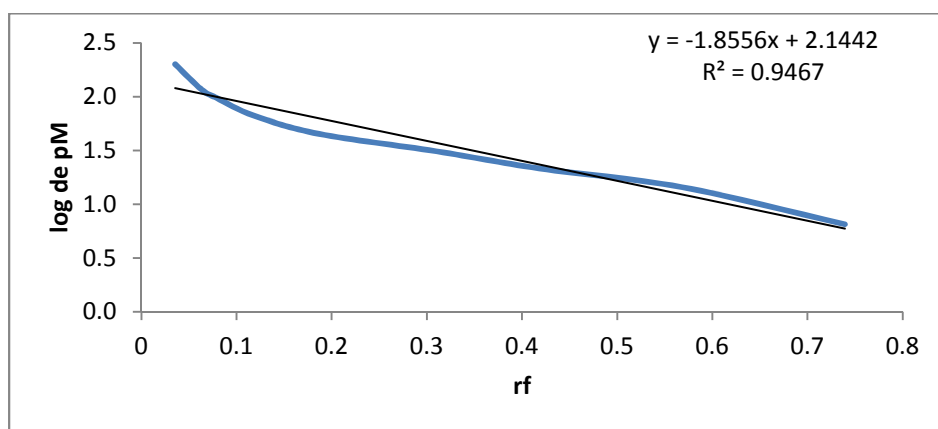


Fig. 29. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con aguamiel. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

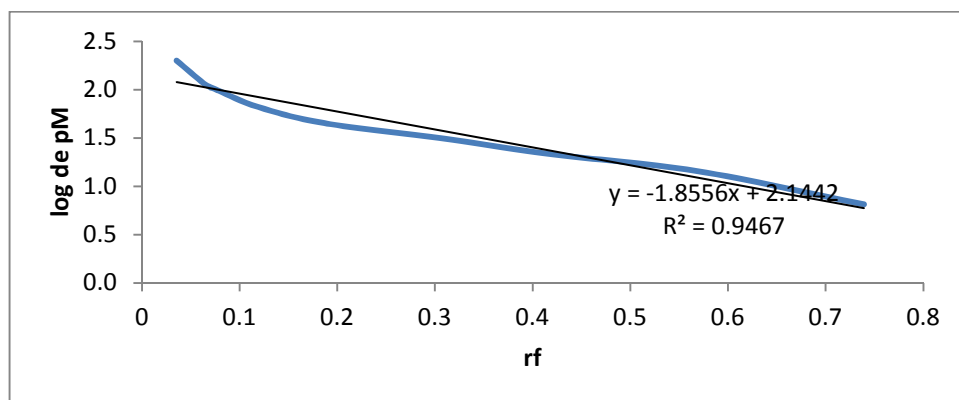


Fig. 30. Curva de concentración. Almacenamiento refrigerado. Sistema enriquecido con inulina. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

8.7 Electroferogramas obtenidos para el análisis de electroforesis en almacenamiento refrigerado

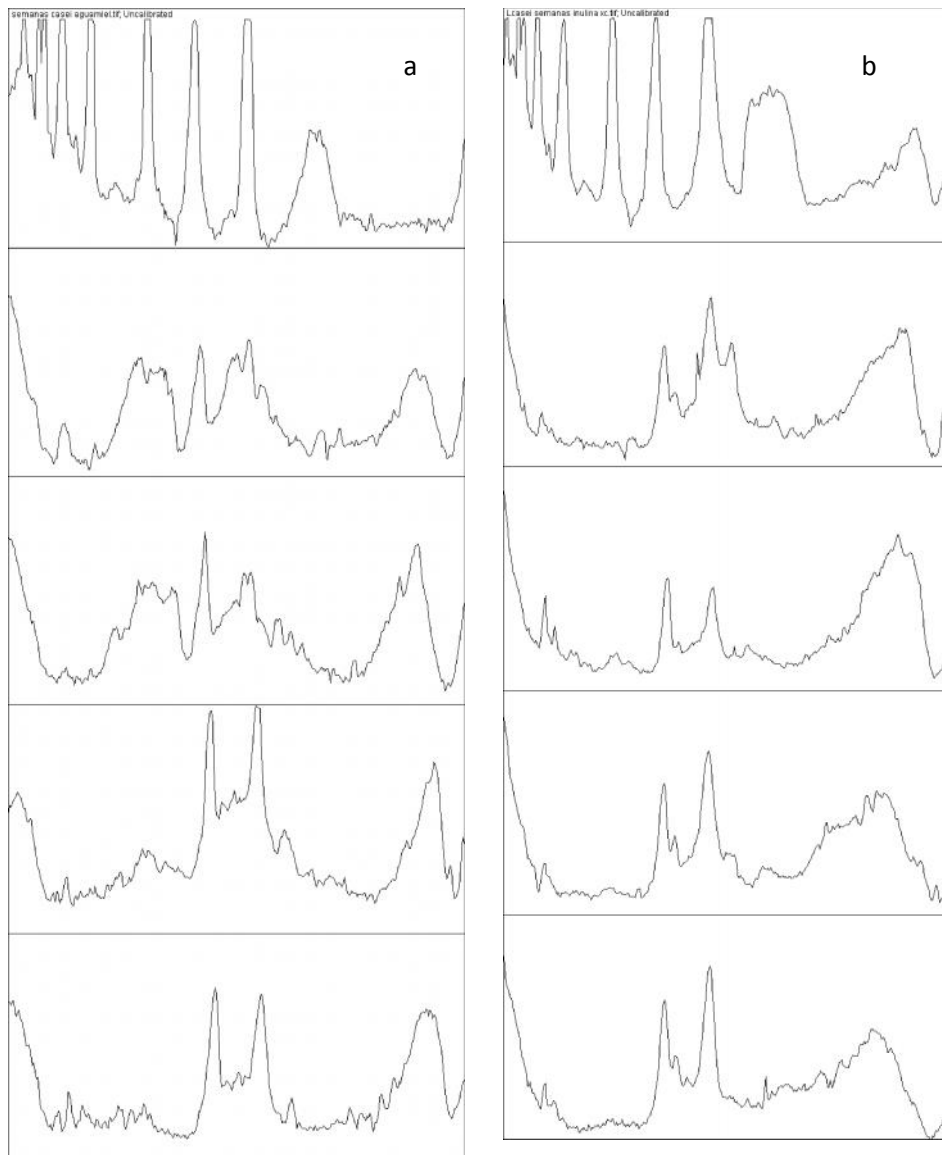


Fig. 31. Electroferogramas obtenidos por electroforesis SDS-PAGE durante el almacenamiento refrigerado de *L. casei* Shirota en sistemas enriquecidos con aguamiel (a) e inulina (b).

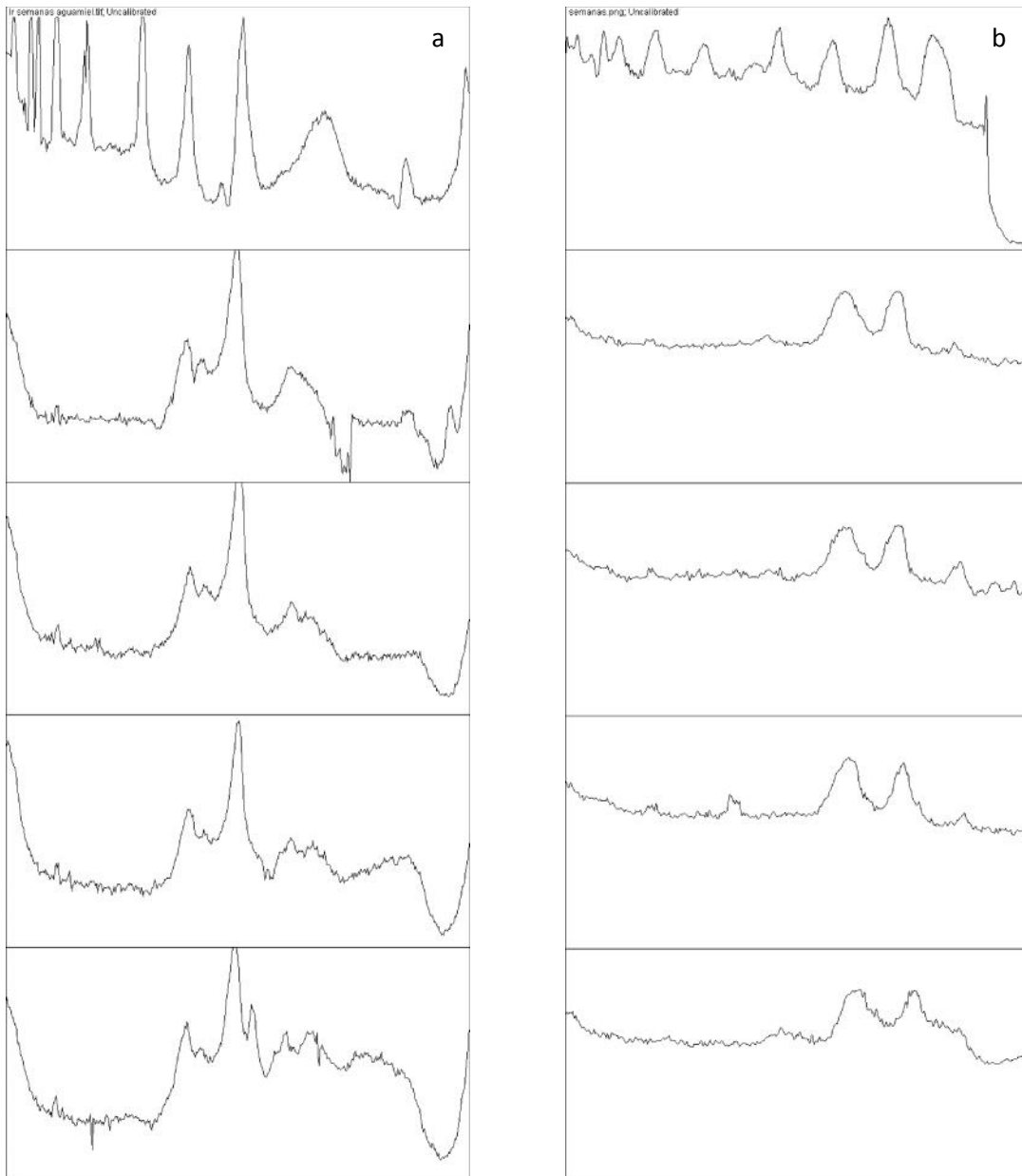


Fig. 32. Electroferogramas obtenidos por electroforesis SDS-PAGE durante el almacenamiento refrigerado de *L. rhamnosus GG* en sistemas enriquecidos con aguamiel (a) e inulina (b).

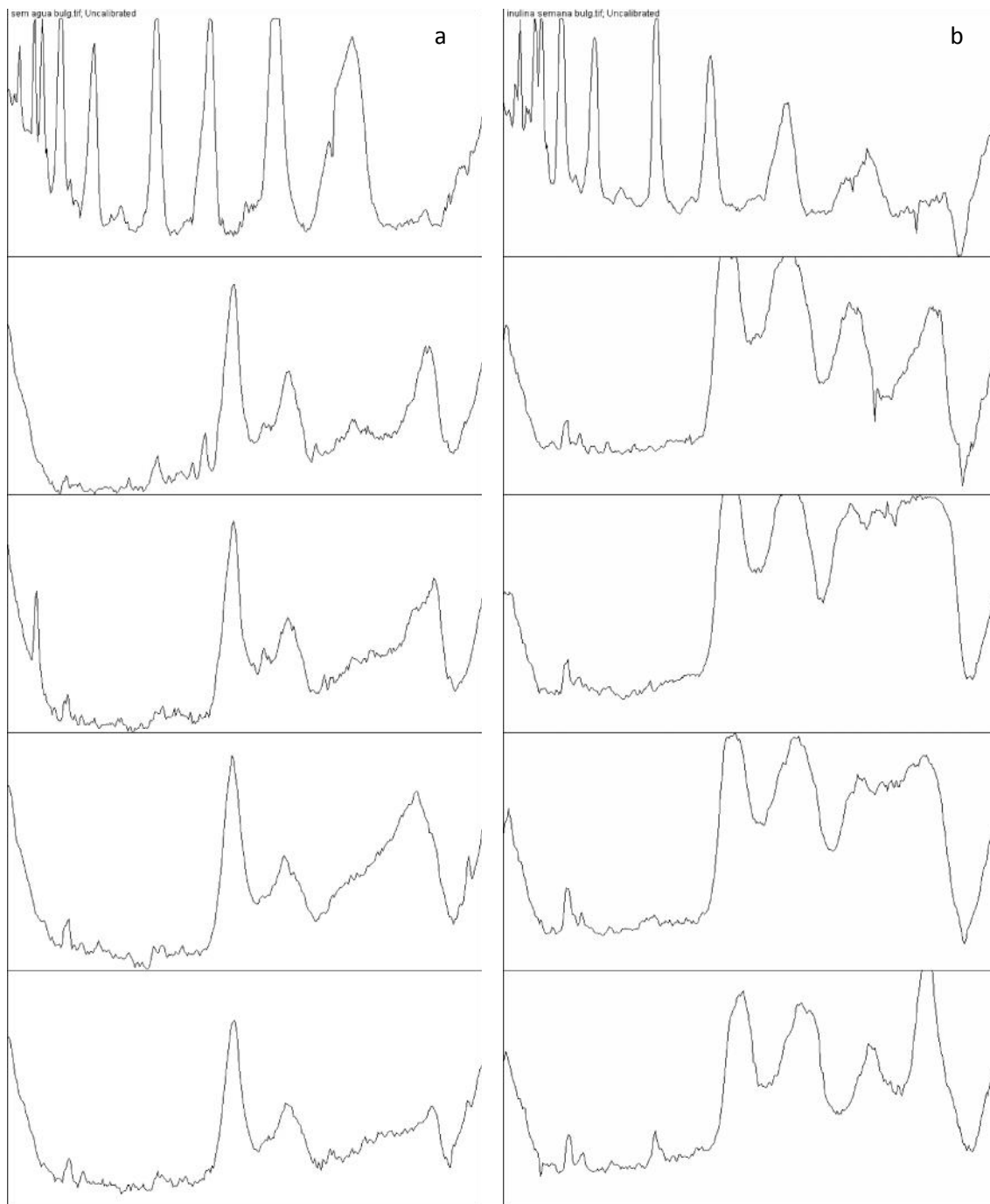
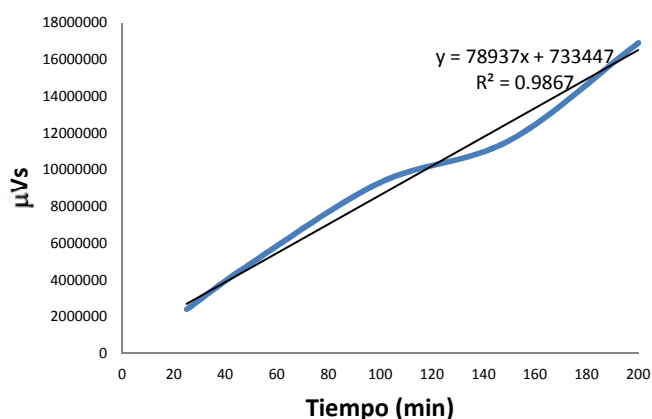


Fig. 33. Electroferogramas obtenidos por electroforesis SDS-PAGE durante el almacenamiento refrigerado de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en sistemas enriquecidos con aguamiel (a) e inulina (b).

8.8 Preparación de la solución buffer para HPLC

Para elaborar el buffer de fosfatos con un intervalo de pH de 6.5 a 7 se prepararon 8.238 g de fosfato dibásico de sodio y 11.33 g de fosfato monobásico de sodio para después aforar hasta 1 L en agua desionizada. Como paso final, se filtró la solución.

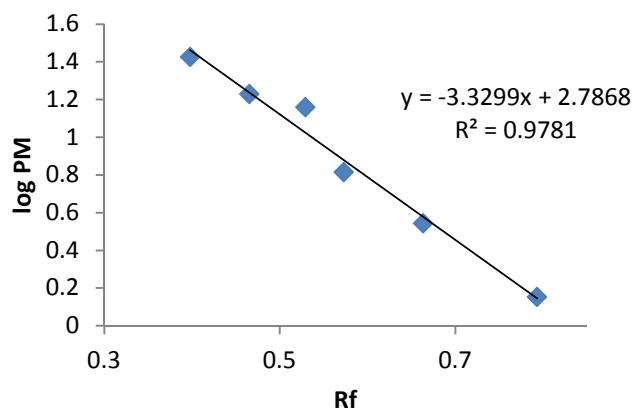
8.9 Curvas de concentración y estándar para HPLC



A (μV*s)	C (ppm)
2402513.56	25
4911216.96	50
9306165.79	100
11588488.1	150
16900804.4	200

Tabla 6. Área obtenida a partir de muestras con concentraciones conocidas.

Fig. 34. Curva de concentración obtenida en HPLC.



log Pm	Rf
1.4	0.4
1.2	0.5
1.2	0.5
0.8	0.6
0.5	0.7
0.2	0.8

Fig. 35. Curva estándar para la determinación de pesos moleculares en HPLC.

Tabla 7. Pesos estándar y factor de retención para la determinación de pesos moleculares en HPLC.

9. Trabajos citados

- Adhikari, K; Mustapha, A.; Grün, I.U. & Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83, 1946-1951.
- Aggett, P.J., et al. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, s1–s27.
- Akpemado, K. M & Bracquart, P. A. (1983). Uptake of Branched-Chain Amino Acids by *Streptococcus thermophilus*. *Applied Environmental Microbiology*, 45(1), 136-140.
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y tecnología de la leche*. España, Madrid: Acribia, S. A. Pp 31-32.
- Anema S. G., (2007). Role of K-Casein in the Association of Denatured Whey Proteins with Casein Micelles in Heated Reconstituted Skim Milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 3635-3642.
- Aracenta J. y Serra LI. (2005). *Leche, Lácteos y Salud*. Madrid, España: Panamericana. Desde:

http://books.google.com.mx/books?id=RnR9M8HTOngC&pg=PA21&dq=proteinas+de+la+l+eche&hl=es&sa=X&ei=ITJ5UqkE_bJsQTKwILQCw&ved=0CDUQ6AEwAQ#v=onepage&q=proteinas%20de%20la%20leche&f=false
- Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T. & Yamamoto, K. (2009). Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology*, 9(19), 1010-1017.
- 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, 856-866.
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), 1147-1162.
- Borchers, T. A. et al. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of gastroenterology*, 44(1), 26-46.

- Bourgeois, C. M., Mescle, J. F. y Zucca, J. (1988). Microbiología alimentaria 1 Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Zaragoza España: Editorial Acribia, S. A. Pp 27.
- Bozoglu. T. F., Özilgen, M. & Bakir, U., (1987). Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microbiology Technology*, 9, 531-537.
- Bu, G., Yongkang, L., Ying, Z. & Fusheng, C. (2010). Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. *Journal of Science and Food Agriculture*, 90, 2015-2020.
- Carter, D. C. & Ho, J. X. (1994). Advances in protein chemistry. Reino unido: Editorial Academic Press, 45, Pp 162.
- Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Review*, 46, 269-281.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi J. & Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology Biotechnology*, 50, 253-256.
- Courtin, P.; Monnet, V. & Rul, F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148, 3413-3421.
- 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.
- Donkor, O.N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N. P., (2007). ACE- inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 1321-1331.
- Early, R., (1998). Tecnología de los productos lácteos. España: Editorial Acribia. 2, Pp 366-370.
- Fox, P. F., & Brodtkorb, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18, 677-684.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudencio, E. S., Amboni, R., Pinto, S. S., Negrao-Murakami, A. N. & Murakami, F. S., (2012). Microencapsulation of

bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45, 306-312.

- Fu, W. & Mathews, A. P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 163-170.
- Gänzle, M. G., Vermeulen, N. & Vogel, R. F., (2007). Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*, 24, 128-138.
- Gasson, M. J. & Vos, W. M. de., 1994, Cap.4 : The proteolytic system of lactic acid bacteria, *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, editor Gasson, M. J.; Vos, W. M. de., ed. Blackie Academic y Professional an Imprint of Chapman y Hall. 169-210.
- Gill, H. S., & Rutherfurd, K. J., (2001). Viability and dose–response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *British Journal of Nutrition*, 86, 285-289.
- Gobbetti, M., Minervini, F. & Rizzello, C., (2004) Angiotensin I-converting-enzyme –inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2), 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, 179-188.
- Guo, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, W., Liu, X. & Zhang, H. (2009). In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. *Food Science and Technology*, 42, 1640-1646.
- Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Nutrition*, 73(suppl), 374s-9s.
- Higuchi, M. (1984). The effect of oxygen on the growth and mannitol fermentation of *Streptococcus mutans*. *Journal of Genetic Microbiology*, 130, 1819-1826.

- Hove, H., Norgaard H. & Mortensen, B. P. (1999). Review Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53, 339-350.
- ICMSF, (International commission on Microbiological Specifications for foods) (1980). Ecología microbiana de los alimentos 1. España: *Editorial ACRIBIA*, Pp 5-8.
- Jay, M. J. (2000). Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza España: Editorial Acribia, 4, Pp 33.
- Kaplan, H., & Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Applied Environmental of Microbiology*, 66(6), 2682–2684.
- Kawajima, K., (1996). The molten globule state of α -lactalbumin. *The FASEB journal*, 10, 102-109.
- Kieran, M., *et. Al.*, (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Reviews therapeutic focus*, 8, 692-700.
- Korhonen, H., (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.
- Kruif, C. G. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9, 183-188.
- Kruif, C. G., Hupperts, T., Urban, V., S. & Petukhov, A., V., (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172, 36-52.
- Kuhn, M., Raida, M., Adermann, K., Schulz-Knappe, P., Gerzer, R., Heim, J. & Forssmann, W. (1993). The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 KDa). *Febss Letters*, 318(2), 205-209.
- Kunji, E. R. S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. & Konings, W. N. (1996). The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.
- Kurman, J.A. & Rasic, J.L. (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. In: *Therapeutic Properties of Fermented Milks* (edited by R.K Robinson). London: *Elsevier Applied Food Sciences*. Pp. 117–158.

- Law, J. & Haandrikman, A. (1997). Proteolytic Enzymes of Lactic Acid Bacteria Review Article. *International Dairy Journal*, 7, 1-11.
- Leclerc, E. & Calmettes, P., (1998). Structure of β -casein micelles. *Physical B*, 241-243, 1141-1143.
- Leroy, F., Falony, G. & Vuyst, L., (2008). Latest developments in probiotics. Toldrá F. *Meat Biotechnology* (Capítulo 10). Valencia, España: Springer.
- López, G. M., Mancilla, M. N. A. & Mendoza, D. G., (2003). Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 51, 7835-7840.
- Luquet, M. F., (1993). Leche y productos lácteos vaca-oveja-cabra. España: Editorial Acribia, 2ª edición, Pp 38.
- Maldonado, G. C., Moreno de Leblanc, A., Carmuega, E., Weill R, & Perdígón, G. (2009). Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *Journal of Dairy Research*, 76, 446-454.
- Marteau, P. & Boutron-Ruaul, M. C. (2002). Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87(2), s153-s157.
- Martínez, M. J., (2010). Impacto de la interacción entre β -lactoglobulina, caseinoglicomacropéptido y polisacáridos en coloides alimentarios. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires*.
- Mei, G. Y., Carey, C. M., Tosh, S. & Kotstrzynska, M. (2011). Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(10), 857-865.
- Meisel, H. & Bockelmann, W., (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 207-215.
- Meurman, J. H., Antila, H., Korhonen, A. & Salminen, S. (1995). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC 53103) on the growth of *Streptococcus sobrinus* in vitro. *European Journal of Oral sciences*, 103(4), 253-258.
- Molis, C., et al. (1996). Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64, 324-8.

- Narváez, Z. J. A. & Sánchez, T. L. F. (2009). Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 3(3), 185-191.
- Nielsen, S. M., Martinussen, T., Flambard, B., Sorensen, I. K. & Otte, J., (2009). Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*, 19, 155-165.
- Nighswonger, B.D., Brashears, M. M. & Gilliland, S. E. (1996). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 79, 212-219.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Revisado el 22 de marzo del 2014
- Ocampo, R. C., Amalia, L. R V., Betancur, A. L. J. & Ocampo, M. D S. (2008). Curso práctico de química orgánica enfocado a biología y alimentos. *Editorial Universidad de Caldas*. Pp. 135.
- Oliveira, R. P. S., Florence, C. R. A., Silva, C. R., Perego, P., Coonverti, A., Gioielli, L. A. & Oliveira, N. M. (2009). Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 467-472.
- Ortíz-Basurto, R. I, Pourcelly, G., Doco T., Williams P., Dornier M. & Belleville M. P. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period. *Journal of Agriculture and food Chemistry*, 56, 3682-3687.
- Özer, D., Akin S., & Özer, B. (2005). Effect of Inulin and Lactulose on Survival of *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium Bifidum* BB-02 in *Acidophilus-Bifidus* Yoghurt. *Food Science Technology International*, 11(1), 19-23.
- Palaria, A., Johnson-Kanda, I. & O'Sullivan, J., (2011). Effect of a Synbiotic Yogurt on Levels of Fecal *Bifidobacteria*, *Clostridia*, and *Enterobacteria*. *Applied of Environmental Microbiology*, 78(4), 933-940.

- Pinheiro, R. S., Perego, P., Nogueira, M. de O. & Converti, A. (2011). Effect of inulin as prebiotic and synbiotic interactions between probiotics to improve fermented milk firmness. *Journal of food Engineering*, 107, 36-40.
- Rajagopal, S. N. & Sandine, W. E. (1990). Associative Growth and Proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in Skim Milk. *Journal of Dairy Science*, 73(4), 894-899.
- Rhee, S. K. & Pack, M. Y. (1980). Effect of Environmental pH on Chain Length of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 144(3), 865-868.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition*, 137, 830S-837S.
- Roberfroid, M. B. & Delzenne N. M. (1998). Dietary Fructans. *Annual Review of Nutrition*, 18, 117-43.
- Roberfroid, M. B., (2005). Introducing inulin-type fructans. *British journal of nutrition*, 93(1), s13-s25.
- Rodríguez, D. J., Monedero, V. & Yebra, J. M. (2011). Utilization of Natural Fucosylated Oligosaccharides by Three Novel-L-Fucosidases from a Probiotic *Lactobacillus casei* Strain. *Applied and environmental microbiology*, 2(77), 703-705.
- Rodríguez, H. M. E., et al. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Research International*, 40, 1299-1306.
- Rolfe, R. D., (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The journal of nutrition*, 130(2S), s396-402s.
- Rose, A. H. (1968). Physiology of microorganisms at low temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 31, 1-11.
- Rybka, S. & Kailasapathy, K. (1995). The survival of culture bacteria i fresh and freeze-dried AB yogurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 50, 52-56.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. & Mattila-Sandholm, M., (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197-215.

- Saavedra, J.M. & Tschernia, A. (2002). Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *British Journal of Nutrition*, 87, 241-246.
- Sadaghdar, Y., Mortazavian, M. & Reza, M, E. (2012). Survival and activity of 5 Probiotic Lactobacilli strains in 2 types of Flavored Fermented Milk. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 151-157.
- Saier, M.H. & Mansour, N. M. (2005). Probiotics and prebiotics in human. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 10, 22–25.
- Santos, A. M., (2000). Leche y sus derivados. México: Editorial trillas. 4° reimpresión, Pp 68-69.
- Savijoki, K., Ingmer, H. & Varmanen, P., (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Servin, A. L., (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 405-440.
- Shah, N.P, Lankaputra, W.E.V. Britz, M.L. & Kyle, W.S.A. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* in comercial yogurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5, 515-521.
- Shi, J., Yongkang, L, Xiao, Y., Li, Z., Xu, Q. & Yao, M. (2014). Effects of fermentation by *Lactobacillus casei* on the antigenicity and allergenicity of four bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 35:75-80.
- Shin, H.S.; Lee, J.H.; Pestka, J.J. & Ustunol, Z. (2000). Viability of bifidobacteria in comercial dairy products during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 63, 327-331.
- Singh, V.P. & Sachan, N., (2011). Nutraceutical properties of milk and milk products: A review. *American Journal of Food Technology*, 1-6.
- Smacchi, E. & Gobetti, M. (1998). Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 687-694.
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G. & Fitzgerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13, 447-453.

- Stanton, C., Ross, P. R., Fitzgerald, G. F. & Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Fermented Functional Foods*, 16, 198-203.
- Stiles, M, E., (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 70, 331-345.
- Talwalkar, A. & Kailasapathy, K., (2004). The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5, 1-8.
- Tovar, R. C. L., Perales-Segovia, C., Nava, C. A., Valera-Montero, L. L., Gómez-Leyva, J. F., Guevara-Lara, F., Hernández-Duque, L. M. J. & Silos-Espino, H. (2011). Effect of aguamiel (agave sap) on hematic biometry in rabbits and its antioxidant activity determination. *Italian Journal of Animal Science*, 10(e21), 106-110.
- Vijin, I. & Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a Reserve Carbohydrate?. *Plant Physiology*, 120, 351-359.
- Vinderola, C.G., Bailo, N. & Renheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in argentinian yogurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.
- Wang, X. G., Kidder, M. J., Scagliotti, J. P., Klempner, S. M., Noríng, R. & Hu, T. L. (2004). Analysis of Differences in the Functional Properties of the Substrate Binding Proteins of the *Borrelia burgdorferi* Oligopeptide Permease (opp) Operon. *Journal of Bacteriology*, 186(1), 51-60.
- Willems, J. L. & Low, N. H. (2012). Major Carbohydrate, Polyol, and Oligosaccharide Profiles of Agave Syrup. Application of this data to Authenticity Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8745-8754.
- Yadab, H., Jain, S., & Ravindra, P., S. (2007). Formation of oligosaccharides in skim milk fermented with mixed dahi cultures, *Lactococcus lactis* ssp *diacetylactis* and probiotic strains of *Lactobacilli*. *Journal of Dairy Research*, 74, 154-159.