



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN
BIOPROCESOS

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FRUCTANOS
LINEALES Y RAMIFICADOS EN BACTERIAS
PROBIÓTICAS Y CÉLULAS DE COLON**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

IA. PAOLA ALVAREZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ALICIA GRAJALES LAGUNES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN
BIOPROCESOS**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE FRUCTANOS
LINEALES Y RAMIFICADOS EN BACTERIAS
PROBIÓTICAS Y CÉLULAS DE COLON**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

IA. PAOLA ALVAREZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ALICIA GRAJALES LAGUNES

SINODALES:

PRESIDENTE:

DRA. ALICIA GRAJALES LAGUNES _____

SECRETARIO:

DR. MIGUEL ANGEL RUIZ CABRERA _____

VOCAL:

DRA LUZ EUGENIA ALCÁNTARA QUINTANA _____

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

AGOSTO 2021



UASLP
Universidad Autónoma
de San Luis Potosí



FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS

San Luis Potosí, S.L.P 11 de agosto del 2021

**Comité Académico del Posgrado en
Ciencias en Bioprocesos**

Respetables Miembros del Comité Académico

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna Paola Alvarez García, cuyo título es: "Evaluación *in vitro* de fructanos lineales y ramificados en bacterias probióticas y células de colon", ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación la cual tendrá lugar el 20 de agosto a las 11 horas en el auditorio chico de la FCQ.

ATENTAMENTE

Dra. Alicia Grajales Lagunes _____

Director de tesis

Dr. Miguel A. Ruiz Cabrera _____

Asesor

Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana _____

Asesor

www.uaslp.mx

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio de Genómica Médica del Centro de Investigación de Ciencias de la
Salud y Biomedicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Laboratorio Molecular de la Coordinación para la Innovación y Aplicación de la
Ciencia y la Tecnología. de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Fondo de Apoyo a la Investigación de la Universidad Autónoma
de San Luis Potosí, México (C16-FAI-09-09.09).

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

“El programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos de la
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad
(PNPC) del CONACYT, registro 000588, en el Nivel Maestría
(Consolidado).

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT:

1008135



Evaluación in vitro de fructanos lineales y ramificados en bacterias
probióticas y células de colon por Alvarez García Paola se
distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Agradecimientos Académicos

A mi directora de tesis, la doctora Alicia Grajales Lagunes, por el tiempo dedicado, por su apoyo y paciencia en cada etapa de este trabajo, por todas las enseñanzas que me brindó, pero sobre todo por confiar en mí para la realización de este proyecto.

A la doctora Luz Eugenia Alcántara Quintana, por guiarme con base en su experiencia, así como su apoyo en la ejecución de este trabajo.

A los doctores Miguel Ángel Ruiz Cabrera, Raúl González García y Fidel Martínez Gutiérrez, por el tiempo y apoyo brindado, y por transmitirme sus conocimientos.

A la ingeniera en alimentos, Cecilia Rivera Bautista, por su apoyo técnico en el desarrollo de experimentos.

Agradecimientos Personales

A mis padres, por el apoyo incondicional que me han brindado en cada paso que doy, por su amor y paciencia, por todos los valores y enseñanzas que me inculcaron, pero sobre todo por ser mi ejemplo de trabajar duro por lo que quieres.

A mi hermana, por sus consejos y palabras de aliento en todo momento.

A Fer, por su apoyo incondicional, por su amor y por siempre creer en mí y en mi capacidad para cumplir mis sueños y metas.

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Abstract.....	1
1. Introducción.....	2
2. Objetivo general.....	3
2.1. Objetivos específicos.....	3
3. Materiales y métodos.....	3
3.1. Preparación de mezclas de fructanos.....	3
3.2. Ensayos de líneas celulares.....	4
3.2.1. Ensayo de viabilidad celular.....	4
3.2.2. Ensayo de proliferación y apoptosis celular.....	4
3.3. Proliferación probiótica.....	4
3.4. Simulación de digestion gastrointestinal.....	5
3.4.1. Simulación de digestion oral.....	5
3.4.1. Simulación de digestion gástrica.....	5
3.4.1. Simulación de digestion intestinal.....	5
3.5. Determinación de ácidos grasos de cadena corta y carbohidratos.....	6
4. Discusión y Resultados.....	6
4.1. Viabilidad celular.....	6
4.2. Proliferación celular.....	6
4.3. Apoptosis celular.....	7
4.4. Proliferación probiótica.....	7
4.5. Digestión de saliva simulada.....	8
4.6. Digestión gástrica simulada.....	8
4.7. Digestión intestinal simulada.....	8
4.8. Determinación de ácidos grasos de cadena corta y carbohidratos.....	8

5. Conclusiones	10
6. Referencias.....	11
Reseña del artículo: <i>In vitro</i> evaluation of <i>Agave salmiana</i> and chicory inulin fructan mixtures on probiotic fermentation, colon cancer prevention and gastrointestinal simulation.....	12
ANEXO: MANUSCRITO ENVIADO	13

Resumen

Se evaluó el efecto prebiótico de las mezclas de fructanos de agave *salmiana* e inulina de achicoria en proporciones 1: 0, 0: 1, 1: 1, 3: 1, 1: 3, respectivamente, con concentraciones de 2 mg/mL, 3.5 mg/mL y 5 mg/mL de cada proporción, sobre el crecimiento de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *Lactobacillus acidophilus*, la viabilidad, proliferación y apoptosis de tres células de colon (SW480, HT29 y CRL1831). Las mezclas de fructanos (ramificado-lineal, 3: 1) mostraron efecto sinérgico sobre la viabilidad, proliferación y disminución de la apoptosis en células de colon sanas y proliferación de *Lactobacillus* a 5 mg/mL. Las mezclas de fructanos (ramificado-lineal, 1: 1) aumentaron la apoptosis en SW480 a 5 mg / mL, fructanos lineales (1: 0), disminuyeron la proliferación de HT29 y SW480 y apoptosis de HT29 a 2 mg/mL, fructanos ramificados (1: 0) tuvieron los resultados más altos de proliferación de *Bifidobacterium* a 5 mg/mL. Se determinó la producción de ácidos grasos de cadena corta y se realizó una digestión gastrointestinal simulada. Las mezclas de fructanos mostraron un efecto sinérgico sobre la proliferación de *Lactobacillus* y la prevención del cáncer de colon.

Palabras clave: fructanos, células de colon, proliferación de probióticos

Abstract

Agave salmiana and chicory inulin fructan mixtures prebiotic effect was evaluated at 1:0, 0:1, 1:1, 3:1, 1:3 proportions, respectively, with concentrations of 2 mg/mL, 3.5 mg/mL and 5 mg/mL of each proportion, on the growth of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and *Lactobacillus acidophilus*, the viability, proliferation and apoptosis of three colon cells (SW480, HT29 and CRL1831). Fructan mixtures (branched-lineal, 3:1) showed synergic effect on viability, proliferation and decrease of apoptosis on healthy colon cells, and proliferation of *Lactobacillus* at 5 mg/mL. Fructan mixtures (branched-lineal, 1:1) increase apoptosis on SW480 at 5 mg/mL, lineal fructans (1:0), decreased proliferation of HT29 and SW480 and apoptosis of HT29 at 2 mg/mL, branched fructans (1:0) had the highest results of proliferation for *Bifidobacterium* at 5 mg/mL. Short chain fatty acids production was determined and a simulated gastrointestinal digestion was performed. Fructan mixtures showed a synergic effect on *Lactobacillus* proliferation and colon cancer prevention.

Keywords: Fructans, Colon cells, Probiotic proliferation

“Evaluación *in vitro* de mezclas de fructanos de inulina de achicoria y *Agave salmiana* sobre fermentación probiótica, prevención del cáncer de colon y simulación gastrointestinal.”

1. Introducción

El tracto gastrointestinal está compuesto por billones de microorganismos que contribuyen a funciones metabólicas, inmunológicas y protectoras que juegan un papel importante en la salud humana (Ranjbar, Vahdati, Tavakoli, Khodaie & Behboudi, 2021). El desequilibrio de la microbiota intestinal por una reducción de la diversidad, el crecimiento de un grupo de bacterias o el aumento de bacterias proteolíticas conduce a un fenómeno llamado disbiosis. La disbiosis intestinal puede ser causada por muchos factores, como medicamentos, cirugías, infecciones, mala nutrición, envejecimiento y estilo de vida; esto se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas como el cáncer de colon (Sanders, Merenstein, Reid, Gibson & Rastall, 2019). El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, el cáncer de colon y recto, en concreto, ocupa el segundo lugar en causas de muerte con 935 000 defunciones y el tercer lugar en casos nuevos encontrados en 2020 con 1,93 millones de casos. La modificación de la microbiota intestinal para el propósito beneficioso del huésped se puede lograr mediante el uso de prebióticos. Según la definición actualizada publicada en 2017, un prebiótico es un sustrato que los microorganismos del huésped utilizan de forma selectiva y confieren un beneficio para la salud (Gibson et al., 2017). Existen muchos tipos de prebióticos, principalmente obtenidos a partir de carbohidratos como galactooligosacáridos, almidón, oligosacáridos derivados de glucosa y fructanos, entre otros. La inulina y los fructooligosacáridos, son ejemplos de fructanos, están compuestos de unidades de fructosa con enlace β (2 \rightarrow 1), mientras que los fructanos ramificados son una estructura más compleja con enlaces β (2-1) y β (2-6) de unidades de fructosa (Gomez, Tuohy, Gibson, Klinder & Costabile, 2010). Los prebióticos aumentan la proliferación de la microbiota intestinal probiótica y estos a su vez producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, estos metabolitos ayudan a mejorar la función de barrera del epitelio intestinal y disminuyen el pH luminal provocando la inhibición de patógenos, la

protonación del amoníaco a ion amonio, lo que limita su difusión a la sangre y aumenta su excreción fecal, e inhibe la transformación de las sales biliares primarias en secundarias, que se consideran un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon. Los probióticos compiten con los patógenos por los nutrientes, los sitios de adhesión, la alimentación cruzada y el apoyo a la estabilidad de la microbiota; los probióticos y prebióticos modulan el sistema inmunológico directa e indirectamente, los probióticos interactúan con las células dendríticas y aumentan la actividad fagocítica; aumentar los niveles de citocinas antiinflamatorias como el TNF con repercusiones frente al cáncer de colon; el propionato y el acetato aumentan la citocina antiinflamatoria IL-10 y el butirato inhibe la producción de citocinas proinflamatorias IL-2 e IFN-g (Sanders et al., 2019).

2. Objetivo general

Evaluar el efecto de mezclas de fructanos lineales y ramificados sobre bacterias probióticas y células de colon.

2.1. Objetivos específicos

- a. Determinar la viabilidad, la proliferación y la apoptosis de tres líneas celulares, dos líneas de cáncer de colon SW480 y HT29 y una línea celular de células sanas CRL1831.
- b. Evaluar la proliferación de bacterias como *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.
- c. Evaluar la producción de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico) y determinación de carbohidratos.
- d. Evaluar la digestibilidad *in vitro* de las mezclas de fructanos lineales y ramificados con un modelo de simulación gastrointestinal.

3. Materiales y métodos

3.1. Preparación de mezclas de fructanos.

Se realizó un diseño experimental D-óptimal completamente aleatorizado con dos variables de mezcla y dos variables de proceso para ensayos celulares (viabilidad, proliferación y apoptosis) y fermentación probiótica, utilizando el Software Modde 7.0 (Umetrics Inc.), obteniendo un total de 38 y 30 experimentos, respectivamente. Se prepararon mezclas de inulina y fructanos de *a. salmiana* en proporciones de 1:

0, 0: 1, 1: 1, 3: 1, 1: 3 respectivamente, para obtener concentraciones de 2 mg/mL, 3.5 mg/mL y 5 mg/mL de cada proporción. Para los ensayos de células, las mezclas se disolvieron en medio RPMI 1640 suplementado (FBS al 10% y antibióticos al 1%). Con respecto a la fermentación probiótica, las mezclas se disolvieron en agua destilada al 40% (p / v) y se esterilizaron (121 ° C, 15 min).

3.2. Ensayos de líneas celulares

3.2.1. Ensayo de viabilidad celular

Cada línea celular de colon (HT29, SW480, CRL1831) se complementó con mezclas de fructanos (200 µL) en placas de 96 pocillos (1x10⁴ células / pocillo) y se incubó inmediatamente (37 ° C, 5% CO₂) durante 24, 72 y 120 h. A continuación, se añadieron 20 µl de resazurina a cada pocillo y se incubaron durante 4 h (37°C, 5% de CO₂) para ser leídos posteriormente en un espectrofotómetro (espectrofotómetro de microplacas Multiskan GO, Thermo Scientific) a 450 nm.

3.2.2. Ensayo de proliferación y apoptosis celular

Las líneas celulares de colon (HT29, SW480, CRL1831) se complementó con mezclas de fructanos (200 µL) en placas de 96 pocillos (1x10⁴ células / pocillo) y se incubó inmediatamente (37 ° C, 5% CO₂) durante 24, 72 y 120 h. Después de la incubación, se agregaron 10 µL del reactivo de viabilidad a las placas, luego se incubaron (37 ° C, 5% CO₂) durante 30 min para así leer en un espectrofotómetro a 450 nm, luego 20 µL de reactivo Caspase-Glo 3/7 se añadió a las placas para el ensayo de apoptosis y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para su lectura a 620 nm.

3.3. Proliferación probiótica

Se preparó 1 L de medio MRS sin carbohidratos; El medio se introdujo en un biorreactor con una capacidad de 2 L, posteriormente este se esterilizó (121 ° C, 15 min) y se conectó a una entrada de N₂ para crear una condición anóxica bajo una mezcla N₂-CO₂ y un sistema de enfriamiento para disminuir la temperatura, manteniendo el biorreactor en constante agitación. El medio se distribuyó en frascos ámbar de 50 mL. Las mezclas de fructanos correspondientes se agregaron a los frascos a diferentes concentraciones (2 mg/mL, 3.5 mg/mL y 5 mg/mL). Para cada cepa se preparó un inóculo bacteriano estandarizado 0.5 MacFarland (1.5x10⁸

UFC/mL) en medio MRS estéril libre de carbohidratos, se agregó 1 mL a cada frasco, y se mantuvo en constante agitación (75 rpm, 37°C), para el crecimiento cinético se tomó una muestra de 2 mL cada 3 h durante 24 h, siendo el control la muestra a las 0 h. Se eligió un tiempo de 24 h para el crecimiento cinético debido a las pruebas preliminares. Las lecturas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro (BioTek, Epoch) a 600 nm.

3.4. Simulación de digestión gastrointestinal

3.4.1. Simulación de digestión oral

Se prepararon en tubos de ensayo, 4 mL de saliva y 4 mL de fructanos. Los fructanos empleados en este experimento se eligieron de acuerdo a la concentración y proporción de la mezcla de fructanos con mejores resultados en los ensayos de viabilidad celular, proliferación, apoptosis y tratamientos de proliferación bacteriana (5 mg/mL, mezcla de agave-inulina 3:1). Los tubos se agitaron y se colocaron a 37 ° C durante 0, 15 y 30 min, se tomó 1 mL de la muestra y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 5 min para inactivar la amilasa.

3.4.1. Simulación de digestión gástrica

Se preparó una solución electrolítica gástrica usando 3.1 g de NaCl, 1.1 g de KCl, 0.25 g de CaCl₂ y 0.6 g de NaHCO₃ disueltos en 1 L de agua destilada. Se añadieron 1.5 ml de CH₃COONa (1 M, pH 5.0), 35.4 mg de pepsina y 37.5 mg de lipasa gástrica a 150 ml de solución electrolítica gástrica. El jugo gástrico simulado se agitó durante 10 min y el valor de pH se ajustó a 2.0 con HCl 0.1 M. La mezcla de fructanos (mezcla de agave-inulina 3: 1) se disolvió en el jugo gástrico simulado para obtener una concentración final de 5 mg/mL. La mezcla se agitó continuamente y se mantuvo a 37°C durante 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 h, respectivamente, se tomó 1 mL y se mantuvo en agua hirviendo durante 10 min para inactivar las enzimas.

3.4.1. Simulación de digestión intestinal

Se preparó una solución electrolítica gástrica usando 5.4 g de NaCl, 0.65 g de KCl y 0.33 g de CaCl₂ disueltos en 1 L de agua destilada y el valor de pH se ajustó a 7.0 con 0.1 M de NaOH. Luego, se mezclaron 20 g de solución de pancreatina (7%, p / p), 40 g de solución de sal biliar (4%, p / p) y 2.6 mg de tripsina con 20 ml de

solución electrolítica gástrica, el valor de pH se ajustó a 7.5. para obtener jugo intestinal simulado. Finalmente, la solución de digestión gástrica (30 mL) después de 2 h de digestión con pH 7.0 y jugo intestinal simulado (9 mL) se mezclaron suavemente con un agitador magnético a 37 ° C durante 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 h, respectivamente y se tomó 1 mL, se mantuvo en agua hirviendo durante 10 min para inactivar las enzimas.

3.5. Determinación de ácidos grasos de cadena corta y carbohidratos

Las muestras bacterianas se centrifugaron (Sigma, 3-18K) a 13000 rpm durante 10 min y se almacenaron a -80 ° C hasta su uso posterior. Consecutivamente, se introdujeron 20 µL en un HPLC (Thermo Fisher Scientific UltiMate 3000, columna Aminex BioRad HPX-87H) a 30 ° C con 0,008 N H₂SO₄ como fase móvil 100 A, en modo isocrático, a un caudal de 0,4 mL/min, con detector IR, con un tiempo de ejecución de 40 min. Para la determinación de AGCC y carbohidratos, sólo se evaluó la proporción óptima de la mezcla de fructanos (agave-inulina; 3: 1) a concentraciones de 2, 3.5 y 5 mg / mL a las 0 y 21 h (punto más alto de la fase logarítmica).

4. Discusión y Resultados

4.1. Viabilidad celular

Los porcentajes más altos de viabilidad celular en células CRL1831 a las 72 h, se obtuvieron utilizando mezclas de agave-inulina, donde el componente predominante fueron fructanos ramificados (3:1) con una concentración alrededor de 5 mg/mL. Mientras que para HT29 y SW480 a las 72 h tuvieron un comportamiento similar con los menores porcentajes de viabilidad obtenidos al utilizar mezclas de agave-inulina, siendo la inulina el componente predominante (3:1) con concentraciones alrededor de 2 mg / mL.

4.2. Proliferación celular

Las mezclas de agave-inulina (1:1) proporcionaron los mayores porcentajes de proliferación de células CRL1831 a las 120 h, con concentraciones alrededor de 5 mg / mL. Para las células HT29 a las 24 h, los porcentajes de proliferación se mantuvieron constantes con las mezclas de agave-inulina en general, esto indica que los fructanos son capaces de controlar la proliferación de las células HT29,

teniendo los mejores resultados con la inulina como componente predominante (1:0) utilizando concentraciones alrededor de 2 mg/mL; mientras que a concentraciones más altas (5 mg/mL) se tuvo un efecto opuesto. Lo mismo sucedió con las células SW480 a las 24 h, con inulina como componente predominante (1:0) en concentraciones alrededor de 2 mg/mL, excepto que, también a concentraciones más altas no solo de inulina sino también de fructanos de agave (5 mg/mL) se mostró el mismo efecto aumentado, lo que indica que el aumento de las concentraciones de inulina o agave podría ser contraproducentes para la proliferación de células cancerosas.

4.3. Apoptosis celular

A las 120 h, las células CRL1831 dieron los porcentajes más bajos de células apoptóticas en comparación con las células cancerosas, los mejores resultados se obtuvieron con las mezclas de agave-inulina, donde el componente predominante fueron fructanos ramificados (3:1) en donde la concentración fue indistinta (2 mg / mL o 5 mg / mL). Para las células HT29 a las 72 h, los porcentajes de células apoptóticas fueron significativamente altos con fructanos ramificados (3:1) como componente predominante a una concentración de alrededor de 5 mg/mL. Mientras que para las células SW480 los porcentajes de células apoptóticas en general fueron significativamente altos, donde los mejores resultados se obtuvieron mediante mezclas de agave-inulina (1:1) con una concentración también alrededor de 5 mg/ mL. El hecho de que las mezclas de fructanos puedan incrementar el número de apoptosis en células cancerosas, nos dice que la implementación de estos fructanos podría prevenir el cáncer de colon.

4.4. Proliferación probiótica

Lactobacillus acidophilus tuvo los mejores resultados de proliferación en general, siendo la densidad óptica más baja y más alta de 1.41 a 1.82, respectivamente, en comparación con *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* con densidades de 0.78 a 1.12, respectivamente. Para *Lactobacillus acidophilus* los mayores valores de DO (densidad óptica) se obtuvieron utilizando mezclas de agave-inulina, donde el componente predominante fue el fructano ramificado (3:1) con una concentración alrededor de 5 mg/mL, mientras que para *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* el mayor número de bacterias se obtuvo utilizando fructanos de agave (1:0) con una

concentración alrededor de 3,5 mg/mL. Esto indica que aplicando las mismas condiciones (PD de fructanos, temperatura, tiempo, proporciones de fructanos y concentraciones de mezclas), las mezclas de fructanos (ramificado-lineal; 3: 1) sí tienen un efecto sinérgico sobre la proliferación de probióticos para *Lactobacillus acidophilus*, a diferencia de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* que mostró predilección por los fructanos ramificados.

4.5. Digestión de saliva simulada

No hubo diferencias significativas en los fructanos después de la digestión de la saliva en términos de concentración de 7.98 ± 1.82 a 6.95 ± 0.68 , mientras que, para los azúcares reductores como la glucosa y fructosa, hubo una disminución significativa en la concentración de 1.27 ± 0.04 a 99 ± 0.01 y 5.41 ± 0.20 a 3.46 ± 0.03 , respectivamente.

4.6. Digestión gástrica simulada

No hubo diferencias significativas en los fructanos después de la digestión de la saliva en términos de concentración de $16.94 \pm 0,34$ a $16.54 \pm 0,89$. Aunque para los azúcares reductores como la glucosa, hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de 2.14 ± 0.02 (0 min) a 2.22 ± 0.07 (60 min) para luego alcanzar 2.38 ± 0.05 (120 min) mientras que para la fructosa también hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de 12.50 ± 0.19 (0 min) a 13.40 ± 0.75 (60 min) para luego alcanzar 14.60 ± 0.14 (120 min).

4.7. Digestión intestinal simulada

No hubo diferencias significativas en los fructanos después de la digestión del intestino delgado en términos de concentración de 9.42 ± 0.55 a 9.09 ± 0.50 . Mientras que para los azúcares reductores como glucosa hubo un aumento significativo pasando de 0.70 ± 0.02 (0h) a 0.76 ± 0.00 (30 min) para finalmente obtener 0.87 ± 0.02 (120 min) mientras que para la fructosa hubo un ligero aumento de concentración, pero no fue significativo, pasando de 4.35 ± 0.35 a 4.51 ± 0.55 .

4.8. Determinación de ácidos grasos de cadena corta y carbohidratos

Para *Lactobacillus acidophilus*, las concentraciones más altas en general las dio el ácido láctico, sin diferencias significativas entre las concentraciones de la mezcla; mientras que para el ácido acético hubo diferencias significativas entre cada

concentración de mezcla dentro del mismo tiempo, pero no hubo diferencias significativas entre cada tiempo con de la misma concentración; en cuanto al ácido propiónico, solo se produjo a concentraciones más altas de la mezcla (3,5 mg/mL y 5 mg/mL) a las 21 h, sin diferencias significativas entre concentraciones. Con respecto a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, el ácido láctico fue significativamente diferente entre 2 y 5 mg/mL, no siendo 3.5 mg/mL significativamente diferente de todas las concentraciones de cada mezcla al mismo tiempo (21 h); mientras que para el ácido acético no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de las mezclas dentro del mismo rango de tiempo, solo se mostraron diferencias significativas en 3.5 y 5 mg/mL entre cada tiempo dentro de la misma concentración; al igual que para el ácido propiónico, las diferencias significativas entre cada mezcla de concentración en diferentes momentos solo se mostraron con 3.5 y 5 mg/mL. Las diferencias significativas entre bacterias solo se mostraron por el ácido láctico a las 21 h, y el ácido propiónico solamente con 5 mg /mL a las 21 h.

Para *Lactobacillus acidophilus*, la cantidad de glucosa en el tiempo 0, se mostraron diferencias significativas entre 2 y 5 mg/mL, siendo 3,5 mg/mL no significativamente diferente de cada concentración de la mezcla. Mientras que para la fructosa se mostraron diferencias significativas a diferentes concentraciones de mezclas entre el mismo tiempo (21 h) y la misma concentración de mezcla en diferentes tiempos, mientras que, a 0 h, 2 mg/mL fue significativamente diferente de 3.5 a 5 mg/mL, siendo estos últimos, no significativamente diferentes. Con respecto a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* para la glucosa, hubo diferencias significativas entre la concentración de cada mezcla dentro del mismo tiempo (0 h) y la misma concentración de la mezcla en diferentes tiempos, mientras que a las 21 h no hubo diferencias significativas dentro de cada concentración de la mezcla; En cuanto a la fructosa, se mostraron diferencias significativas entre las mismas concentraciones de mezcla en diferentes momentos a las 0 h entre las concentraciones de mezcla, mientras que a las 21 h, 2 y 5 mg/mL fueron significativamente diferentes. No hubo diferencias significativas entre bacterias.

La esterilización de los prebióticos (121 ° C, 15 min) podría haber ocasionado una hidrólisis mínima, haciendo que los azúcares reductores sean alcanzables para las bacterias.

5. Conclusiones

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio in vitro que evaluó el efecto de la mezcla prebiótica (*A. salmiana* e inulina de achicoria) en la búsqueda de un efecto sinérgico en la prevención del cáncer de colon y la proliferación de probióticos. Además, se presume que es el primer estudio in vitro en el que se evaluó el efecto prebiótico directamente en las células y no como un tratamiento indirecto.

Con base en estos resultados, las mezclas de fructanos (ramificado-lineal, 3: 1) sí tienen un efecto sinérgico en el aumento de la viabilidad, proliferación y disminución de la apoptosis en células de colon sanas, con tratamientos de mayor tiempo (72 y 120h) a concentraciones alrededor de 5 mg / mL; la mezcla de fructanos (ramificado-lineal, 1: 1) aumentó la apoptosis de las células SW480 a las 120 a 5 mg/mL, los fructanos lineales (1:0) mostraron los mejores resultados en tratamientos de menor tiempo (24 y 72 h) en 2 mg/mL para la proliferación de HT29 y SW480, y apoptosis de HT29. La acción prebiótica directamente en las células debe evaluarse más a fondo. Los mejores resultados para la proliferación de *Lactobacillus* se obtuvieron con mezclas de fructanos (ramificado-lineal, 3: 1) con concentraciones de 5 mg/mL, demostrando un efecto sinérgico. *Bifidobacterium* mostró el mayor crecimiento de proliferación con fructanos ramificados (1: 0) a 5 mg/mL, coincidiendo con otros estudios. La producción de AGCC fue indistinta de los microorganismos excepto el ácido láctico, con una mayor producción con *Lactobacillus*. Las mezclas de fructanos resisten la digestión gastrointestinal. Los presentes hallazgos indican un efecto sinérgico de mezclas de fructanos ramificados y lineales para la proliferación de bacterias ácido lácticas y la prevención del cáncer de colon.

6. Referencias

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491-502.

Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A., Costabile, A. (2010). *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 2114–2121.

Ranjbar, R., Vahdati, S. N., Tavakoli, S., Khodaie, R., Behboudi, H. (2021). Immunomodulatory roles of microbiota-derived short-chain fatty acids in bacterial infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111817.

Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10, 605-616.

Reseña del artículo: *In vitro* evaluation of *Agave salmiana* and chicory inulin fructan mixtures on probiotic fermentation, colon cancer prevention and gastrointestinal simulation.

El artículo correspondiente a este trabajo fue enviado para su publicación a una revista científica indexada (**ANEXO**).

ANEXO: MANUSCRITO ENVIADO

Thank you for your submission to Carbohydrate Polymers

em.carbpol.0.754be0.eaf1b766@editorialmanager.com
<em.carbpol.0.754be0.eaf1b766@editorialmanager.com>

en nombre de
Carbohydrate Polymers <em@editorialmanager.com>

Vie 13/08/2021 03:26 PM

Para: ALICIA GRAJALES LAGUNES <grajales@uaslp.mx>

Dear Dr. Grajales Lagunes,

Thank you for sending your manuscript In vitro evaluation of Agave salmiana and chicory inulin fructan mixtures on probiotic fermentation, anticancer potential in human colon cells, and gastrointestinal simulation. for consideration to Carbohydrate Polymers. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

For Carbohydrate Polymers, the average editorial time (in weeks) from submission to first decision is: 5.7
and from submission to final decision is: 9.01.

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Editorial Manager (EM).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EM will be "With Editor".

2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Carbohydrate Polymers, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/CARBPOL>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: AGrajales Lagunes-758

13/8/2021

Correo: ALICIA GRAJALES LAGUNES - Outlook

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/CARBPOL/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Carbohydrate Polymers.

Kind regards,

Professor John Kennedy, Professor Manuel Coimbra

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

#AU_CARBPOL#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/carbpol/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.