



---

**Instituto Politécnico Nacional**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

UNIDAD QUERÉTARO

POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**Fermentabilidad de almidón resistente tipo 3 en un modelo colónico *in vitro* y análisis de la comunidad microbiana implicada**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

**Viridiana Obregón Flores**

Directores de Tesis

Dra. Regina Hernández Gama

Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz



Querétaro, Qro., diciembre de 2021



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, a 14 de diciembre del 2021

El Colegio de Profesores de Posgrado de **CICATA Unidad Querétaro** en su Sesión Ordinaria No. 211210 celebrada el día 10 del mes diciembre del 2021, conoció la solicitud presentada por el alumno:

Apellido Paterno:	Obregón	Apellido Materno:	Flores	Nombre (s):	Viridiana
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	-----------

Número de registro:

del Programa Académico de Posgrado:

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Objetivo general del trabajo de tesis:

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director:

2° Director:

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director de Tesis

Dra. Regina Hernández Gama

2° Director de Tesis

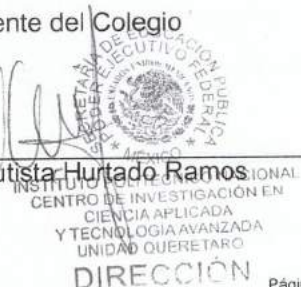
Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz

Aspirante

Viridiana Obregón Flores

Presidente del Colegio

Dr. Juan Bautista Hurtado Ramos





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de  siendo las  horas del día  del mes de  del  se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de:  para examinar la tesis titulada:

de la alumna:

Apellido Paterno:	Obregón	Apellido Materno:	Flores	Nombre (s):	Viridiana
-------------------	---------	-------------------	--------	-------------	-----------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene un **29 %** de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI**  **NO**  **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

#### JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:

En el análisis de similitud del documento de tesis no se encontraron frases completas idénticas a otras fuentes. Los porcentajes más altos de similitud que se detectaron corresponden a palabras aisladas de uso común en el área de estudio, al formato común que se utiliza para citar las referencias en la sección de bibliografía o a la coincidencia de texto con artículos derivados de este trabajo de tesis.

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio y del Director o Directores de tesis el análisis del porcentaje de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

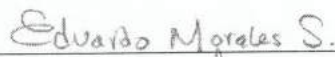
Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR**  **SUSPENDER**  **NO APROBAR**  la tesis por **UNANIMIDAD**  o **MAYORÍA**  en virtud de los motivos siguientes:


El trabajo desarrollado, así como la comprensión y discusión de la información obtenida se considera que se cumple con los requisitos para proceder a sustentar el examen de grado al cual aspira.

#### COMISIÓN REVISORA DE TESIS


  
\_\_\_\_\_  
Director de Tesis  
Dra. Regina Hernández Gama

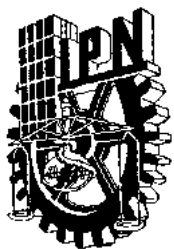
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe del Carmen Méndez Montealvo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Eduardo Morales Sánchez

  
\_\_\_\_\_  
2° Director de Tesis  
Dr. Gonzalo Velazquez de la Cruz

  
\_\_\_\_\_  
M.T.A. Pedro Antonio Martínez Artega

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Bautista Hurtado Ramos  
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN EN TECNOLOGÍA AVANZADA  
UNIDAD QUERÉTARO  
DIRECCIÓN  
Página 1 de 2



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día **26** del mes de **noviembre** del año **2021**, el (la) que suscribe **Viridiana Obregón Flores** alumno(a) del Programa de **Maestría en Tecnología Avanzada**, con número de registro **B190894**, adscrito(a) al **CICATA IPN Querétaro**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Regina Hernández Gama** y del **Dr. Gonzalo Velázquez de la Cruz** y cede los derechos del trabajo titulado **Fermentabilidad de almidón resistente tipo 3 en un sistema colónico *in vitro* y análisis de la comunidad microbiana implicada**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [rehernandez@ipn.mx](mailto:rehernandez@ipn.mx), [gvelazquezd@ipn.mx](mailto:gvelazquezd@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Viridiana Obregón Flores

## **Agradecimientos**

A mis directores de tesis, Dra. Regina Hernández Gama y Dr. Gonzalo Velázquez de la Cruz, que fueron guías importantes en mi formación profesional y personal.

A mis revisores de tesis, Dra. Lupita, Peter y Dr. Morales, que sumaron y enriquecieron mi proyecto de investigación. Siempre llevándome a la reflexión. Gracias.

A mi hija Amelie, que varias veces me acompañó a tomar mis clases nocturnas. Te amo infinitamente Bichito, por todo lo que eres y lo que me has enseñado. Eres maravillosa.

A toda mi familia que siempre me ha apoyado en cada proyecto: mis padres, hermanos, tíos, primos y abuelos.

A mis amigos y compañeros en CICATA, en especial a Mayra y Rudy. Los estimo mucho y aprendí muchas cosas de ustedes.

A CICATA, al Instituto Politécnico Nacional, al programa de becas BEIFI, beca tesis y CONACYT que me dieron la oportunidad de estudiar la maestría y proporcionarme los medios económicos para concretar mi formación en esta investigación.

Y me agradezco a mí, por concluir esta etapa en la vida. Fueron más de dos años en los que la maestría estuvo conmigo en las buenas y no tan buenas. Hoy me siento plena y satisfecha por todo lo que aprendí y me siento orgullosa de lo que soy. Fue una gran experiencia académica incluso en pandemia. Un abrazo fuerte para ti, Viri.

Ahora, es momento de iniciar un nuevo camino...

## Resumen

En este trabajo, se evaluó la fermentación colónica en un sistema *in vitro* de almidón resistente tipo 3 (AR3) e inulina comúnmente utilizados como fibra dietética en la industria alimentaria. El AR3 se obtuvo de almidón nativo de maíz con 70% amilosa (Hylon VII) siguiendo un proceso hidrotérmico para la gelatinización y posterior retrogradación. Se cuantificó la fracción de almidón resistente en el almidón nativo (AR2) y en el almidón retrogradado (AR3), obteniendo un 9% y 29% de AR2 y AR3, respectivamente. Se realizó un tratamiento enzimático del almidón retrogradado simulando su digestión en la zona oral, estomacal e intestino delgado, controlando las condiciones propias de cada fase. Se cuantificó nuevamente el almidón resistente, obteniendo un 56.8% de AR3. Por otro lado, se implementó un sistema para realizar la fermentación *in vitro* que simuló el paso del almidón por el colon, empleándose heces de tres personas saludables como inóculo; la obtención de muestras se realizó mediante un protocolo y consentimiento informado avalado por el comité de bioética con dictamen DIP/802-2020. En total se estudiaron 9 sistemas de fermentación, 3 de ellos como control negativo empleando únicamente las muestras de heces. Se realizó una extracción de AGCC de las muestras tomadas a las 0, 4, 8, 12 y 24 h de la fermentación para cuantificarlos por CG-MS. Además, se llevó a cabo una extracción de ADN total tanto de la materia fecal como de las muestras al término de la fermentación *in vitro* de inulina y AR3. Se realizó una secuenciación de las 9 muestras a través de las regiones V3-V4 del marcador ribosomal 16S en la plataforma Illumina y se efectuó el análisis bioinformático a través de QIIME2, no encontrándose diferencia estadística en diversidad alfa. En diversidad beta tampoco se encontró diferencia en composición microbiana entre tratamientos, pero sí la hubo entre los taxones de los donadores ( $p=0.004$ ). Los taxones predominantes en muestras con inulina y AR3 fueron del género *Bifidobacterium* y *Escherichia-Shigella*, mientras que algunos géneros de la familia *Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* se vieron disminuidos en las fermentaciones de ambas fibras. Por otro lado, en promedio general de AGCC producidos, el acetato fue el mayor

ácido cuantificado en la fermentación con AR3 e inulina, mientras que el butirato no incrementó, lo cual se relaciona con la composición microbiana.

**Palabras clave:** Almidón resistente, colon, Ácidos Grasos de Cadena Corta, fermentación, microbioma.

## Abstract

In this work, colonic fermentation was evaluated in an *in vitro* system of resistant starch type 3 (RS3) and inulin commonly used as dietary fiber in food industry. RS3 was obtained from native corn starch 70% amylose (Hylon VII), following a hydrothermal process for gelatinization and subsequent retrogradation. Resistant starch fraction was quantified in native starch (RS2) and retrograded starch (RS3), obtaining 9% and 29% of RS2 and RS3, respectively. An enzymatic treatment in retrograded starch was performed simulating its digestion in the oral, stomach and small intestine zone, controlling the conditions of each phase. Resistant starch was quantified again, obtaining 56.8% from RS3. On the other hand, a system was implemented to perform an *in vitro* fermentation that simulated the passage of starch through the colon, using feces from three healthy people as inoculum; samples were obtained following of a protocol and informed consent endorsed by the bioethics committee with code DIP/802-2020. A total of 6 fermentation systems were studied and the same 3 stool samples were used as negative control. An extraction of SCFA was performed from samples taken at 0, 4, 8, 12 and 24 h during fermentation and quantified by GC-MS. In addition, total DNA extraction was carried out from feces and samples at the end of *in vitro* fermentation of inulin and RS3. Sequencing of the 9 samples was carried out through the V3-V4 regions of the 16S ribosomal marker on the Illumina platform and bioinformatic analysis was performed through QIIME2, without obtaining statistical differences in alpha diversity. In beta diversity, no difference in microbial composition was found between treatments, but there was a difference between donor taxa ( $p=0.004$ ). The predominant taxa in inulin and RS3 samples were *Bifidobacterium* and *Escherichia-Shigella*

genus, while some genera from *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* families were decreased in both fiber fermentations. On the other side, in overall average of SCFA produced, acetate was the highest acid quantified in RS3 and inulin, while butyrate didn't increase, which is related to the microbial composition.

**Keywords:** Resistant starch, colon, Short Chain Fatty Acids, fermentation, microbiome.



# Contenido

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Introducción .....	1
I. Antecedentes .....	3
1.1 Fibra .....	3
1.1.1 Inulina .....	4
1.1.2 Almidón.....	6
1.2 Comunidad microbiana en colon.....	12
1.2.1 Análisis de microbioma .....	15
1.3 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC) .....	17
1.3.1 Ácido acético .....	17
1.3.2 Ácido propiónico.....	18
1.3.3 Ácido butírico.....	19
1.4 Análisis de ácidos grasos de cadena corta.....	20
1.5 Sistemas de fermentación <i>in vitro</i> .....	22
1.6 Antecedentes del proyecto.....	24
1.7 Objetivo.....	27
1.7.1 Objetivo general .....	27
1.7.2 Objetivos específicos .....	27
1.8 Hipótesis .....	28
1.9 Planteamiento del problema y justificación .....	28
II. Materiales y Métodos .....	30
2.1 Obtención de almidón resistente tipo 3.....	30
2.2 Cuantificación de almidón resistente .....	30
2.3 Predigestión de almidón resistente tipo 3.....	31
2.4 Materia fecal .....	33
2.5 Sistema y condiciones de fermentación .....	33

2.6	Análisis de AGCC .....	35
2.7	Análisis de comunidad microbiana .....	36
III.	Resultados y discusión.....	39
3.1	Obtención de almidón retrogradado.....	39
3.2	Cuantificación de almidón resistente .....	39
3.3	Digestión enzimática de AR3 .....	40
3.4	Estandarización del sistema de fermentación.....	42
3.5	Fermentación.....	43
3.5.1	Registro de ingesta de alimentos .....	43
3.5.2	Fermentación de fibras con inóculo fecal .....	46
3.6	Análisis de ácidos grasos de cadena corta.....	46
3.6.1	Extracción de AGCC .....	46
3.6.2	Cuantificación de AGCC por CG-MS.....	47
3.7	Extracción de ADN y análisis de comunidad microbiana.....	51
3.7.1	Análisis bioinformático con QIIME2 .....	54
3.7.2	Análisis taxonómico.....	58
IV.	Conclusiones.....	79
V.	Referencias.....	80
VI.	Anexos .....	103
	Anexo 1. Formato de consentimiento informado .....	103
	Anexo 2. Dictamen aprobatorio firmado por el comité de bioética .....	109
	Anexo 3. <i>Pipeline</i> utilizado para el análisis bioinformático .....	110
	Anexo 4. <i>Pipeline</i> y análisis bioinformático de eucariotes .....	113

## Índice de Figuras

---

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA INULINA.....	5
FIGURA 2. ESTRUCTURA INTERNA DE UN GRÁNULO DE ALMIDÓN. A) ESTRUCTURA RADIAL DEL GRÁNULO. B) DOBLES HÉLICES DE AMILOPECTINA. C) CRISTALINIDAD TIPO A O B SEGÚN EL ACOMODO DE LAS DOBLES HÉLICES, VISTA DESDE ARRIBA. LOS PUNTOS AZULES INDICAN MOLÉCULAS DE AGUA.....	7
FIGURA 3. ESQUEMA DE SISTEMA DE FERMENTACIÓN CON SUS CARACTERÍSTICAS Y DISTRIBUCIÓN DE TUBERÍAS. ....	35
FIGURA 4. INCUBADORA QUE MANTUVO EL SISTEMA A 37° C .....	42
FIGURA 5. SISTEMA DE FERMENTACIÓN QUE SIMULÓ EL COLON.....	42
FIGURA 6. REGISTRO DE ALIMENTOS Y BEBIDAS DE LOS TRES PARTICIPANTES. ....	44
FIGURA 7. SISTEMA DE FERMENTACIÓN UTILIZADO PARA CADA PARTICIPANTE .....	46
FIGURA 8. PROMEDIO DE AGCC ENTRE LOS TRES PARTICIPANTES. EL EJE SECUNDARIO MUESTRA LA ESCALA PARA LA CONCENTRACIÓN DEL BUTIRATO. ....	48
FIGURA 9. RELACIÓN ENTRE LOS AGCC DE ACUERDO CON LOS TRATAMIENTOS. A) FERMENTACIÓN SIN FIBRA, SÓLO INÓCULO DE MATERIA FECAL EN EL MEDIO. B) FERMENTACIÓN CON INULINA. C) FERMENTACIÓN CON AR3.....	48
FIGURA 10. EXTRACCIÓN DE ADN DE MATERIA FECAL Y DE MUESTRAS POSTERIORES A LA FERMENTACIÓN CON CADA TRATAMIENTO.....	52
FIGURA 11. FLUJO DE TRABAJO EN QIIME2 PARA ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. ....	55
FIGURA 12. FILTRADO DE CALIDAD DESPUÉS DE LA FUSIÓN DE LECTURAS DEMULTIPLEXADAS. ....	56
FIGURA 13. TAXONOMÍA DE MUESTRAS POR DOMINIO.....	58
FIGURA 14. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA POR PHYLUM BACTERIANO.....	60
FIGURA 15. TAXONOMÍA A NIVEL DE CLASE.....	62
FIGURA 16. TAXONOMÍA A NIVEL DE GÉNERO EN CADA MUESTRA. CADA MICROORGANISMO SE IDENTIFICA CON UN COLOR EN PARTICULAR. ....	64
FIGURA 17. CURVA DE RAREFACCIÓN CON ÍNDICE DE SHANNON.....	72
FIGURA 18. SIGNIFICANCIA EN ÍNDICE DE SHANNON POR TRATAMIENTO EN LAS MUESTRAS. ....	73
FIGURA 19. COMPONENTES PRINCIPALES. LAS MUESTRAS CON FIBRA PRESENTAN UN AGRUPAMIENTO, ALEJÁNDOSE DE LA MICROBIOTA INICIAL EN MATERIA FECAL.....	74
FIGURA 20. SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE BRAY-CURTIS CON LAS MUESTRAS SIN TRATAMIENTO CON RESPECTO A LAS MUESTRAS DE AR3 E INULINA. ....	75
FIGURA 21. PCo BRAY-CURTIS POR DONADOR. ....	76
FIGURA 22. SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE BRAY-CURTIS ENTRE LOS DONADORES. SE MUESTRA EL GRÁFICO DE DISTANCIA DEL DONADOR 3 RESPECTO AL 1 Y 2.....	76
FIGURA 23. PCo DE UNIFRAC NO PONDERADO ENTRE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS.....	77

FIGURA 24. SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE UNIFRAC NO PONDERADO POR TIPO DE TRATAMIENTO..... 78

## Índice de Tablas

---

TABLA 1 COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES: FASE ORAL, GÁSTRICA E INTESTINAL.....	32
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS DONANTES DE MATERIA FECAL. ....	44
TABLA 3. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS.....	53
TABLA 4. REPORTE DE CALIDAD DE SECUENCIAS EN PROCARIOTES. ....	53
TABLA 5. CONCENTRACIÓN DE ADN EXTRAÍDO Y COCIENTE DE LAS LONGITUDES DE ONDA REGISTRADAS EN LAS ABSORBIENCIAS 260/280. ....	54
TABLA 6. TABLA DE CARACTERÍSTICAS DESPUÉS DEL FILTRADO CON DEBLUR DENOISE 16S. ....	57
TABLA 7. FRECUENCIA RELATIVA DE TAXONES DEL MOCK SPIKE-IN CONTROL I.....	70

# Introducción

---

La alimentación, en conjunto con otros factores como el estado de salud, ritmo de vida, genética, consumo de medicamentos, entre otros, tiene un efecto relevante sobre la calidad de vida, ya que la dieta modula la comunidad microbiana que habita en el cuerpo humano (De Angelis et al., 2020). En el intestino grueso, también conocido como colon, existen alrededor de  $10^{13}$  millones de microorganismos que habitan como simbioses (Sender et al., 2016), nutriéndose a partir de lo que el huésped consume, mientras que benefician a través de los productos generados, como es el caso de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  y principalmente ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Fernando et al., 2017; Hughes et al., 2008). Estas estructuras químicas tienen funciones importantes a nivel celular y en concentraciones adecuadas ayudan a mantener la salud del ser humano (Lu et al., 2019; Wang et al., 2012).

Para que se produzcan AGCC se requieren fuentes de fibra, pues a diferencia de los demás alimentos, estos polisacáridos complejos no son degradados durante su paso por el tracto gastrointestinal, sino que llegan prácticamente intactos hasta el colon, donde son fermentados por la microbiota (Jones, 2014). Sin embargo, actualmente se sabe que cada fibra tiene un impacto distinto a nivel de comunidad microbiana y, por ende, la producción de AGCC diferirá según sea el caso (Luo et al., 2017; Si et al., 2017). Por esta razón, se han llevado a cabo estudios comparativos entre fibras, ya sea en sistemas *in vitro* o *in vivo* para conocer las consecuencias de su consumo como posible proyección en la dieta de las personas.

También, se ha observado que otras estructuras, conocidas como almidones resistentes (AR) tienen un efecto similar a la fibra cuando son consumidos, ya que escapan de la digestión y son fermentados en el intestino grueso para producir AGCC como metabolitos. Existen cinco variantes de almidón resistente, y entre ellos, el tipo 3 (AR3) tiene mayor presencia en la industria alimentaria por las características que provee al alimento (Kaimal et al., 2021).

El objetivo de este estudio fue evaluar el almidón retrogradado obtenido de un almidón alto en amilosa, comparando su respuesta con la inulina, fructooligosacárido que ha sido reportado en diversos proyectos por sus efectos benéficos a la microbiota intestinal. Para ello, se empleó materia fecal de tres personas sanas, que sirvió como inóculo para simular la fermentación de las fibras en el colon a través de un sistema *in vitro*. Para conocer la concentración de AGCC, se tomaron muestras en cinéticas de fermentación y después se analizaron por CG-MS. Además, se caracterizó la comunidad microbiana de las muestras al final de las fermentaciones mediante secuenciación en Illumina 250 PE de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S y su posterior análisis bioinformático.

# I. Antecedentes

---

## 1.1 Fibra

De acuerdo con el Codex Alimentario, la fibra dietética se define como la estructura compuesta de polímeros de carbohidratos con 10 o más unidades monoméricas que no son hidrolizados por las enzimas del tracto digestivo desde la boca hasta el intestino delgado de los seres humanos, sino que llegan hasta el colon donde puede ser aprovechados y fermentados por los microorganismos que allí habitan. La fibra puede provenir de fuentes naturales, de materias primas tratadas por métodos físicos, químicos o enzimáticos, o incluso pueden ser sintéticas (Jones, 2014). Diversos estudios en el área nutricional demuestran que debe formar parte de la alimentación diaria de toda persona, debido a los beneficios que puede aportar al organismo como la sensibilidad a la insulina y la disminución de riesgo en diabetes mellitus 2, haciendo énfasis en casos de sobrepeso (Weickert et al., 2011), además de promover la pérdida de peso corporal y favorecer la salud y abundancia de microorganismos que proveen de efectos benéficos al colon (Desai et al., 2016).

Existen diferentes clasificaciones de la fibra; sin embargo, una de las más conocidas es la clasificación por su estructura química:

**Polisacáridos diferentes al almidón.** Contienen al menos veinte residuos de monosacáridos, por ejemplo, la celulosa, hemicelulosas, pectinas, gomas,  $\beta$ -glucanos, mucílago, etc.

**Oligosacáridos resistentes.** Cadenas de máximo diez moléculas de monosacáridos, divididos en fructooligosacáridos (FOS) y, dentro de estos, la inulina; galactooligosacáridos (GOS), xilooligosacáridos (XOS) e isomaltooligosacáridos (IMOS).



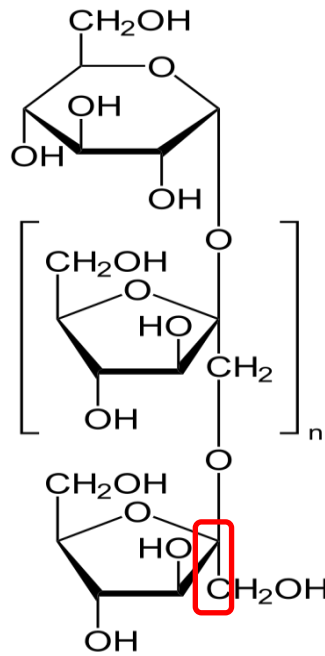
**Ligninas.** Es el resultado de la unión de alcoholes fenilpropílicos. Se considera uno de los biopolímeros más abundantes que existen.

**Sustancias asociadas a polisacáridos diferentes al almidón.** Ejemplos de ellas son la suberina y la cutina, con estructura de poliéster de ácidos grasos e hidroxiácidos.

**Almidones resistentes.** El almidón se ha clasificado en tres tipos: almidón rápidamente digerible (en menos de 20 min), lentamente digerible (digerido de 20 a 120 min) y almidón resistente (AR), que es la parte restante que no es digerida, pero sí es aprovechado por la comunidad microbiana del colon al ser fermentado (Englyst et al., 1999). De esta forma, los almidones resistentes también se encuentran entre las diferentes fibras. El AR se ha subdividido en cinco categorías de acuerdo con sus características físicas y químicas, donde uno de los factores más importantes sobre la formación de almidón resistente desde diferentes fuentes botánicas, es la proporción entre amilosa-amilopectina (Hallström et al., 2011).

### **1.1.1 Inulina**

La inulina es un polisacárido soluble de cadenas de fructosa con una glucosa al final. Se considera una de las mejores fibras que fermentan y se sabe que es precursora para la producción de ácidos grasos en el intestino grueso debido a la  $\beta$  configuración del carbono 2 anomérico que la hace resistente a las enzimas del intestino, como se observa en la Figura 1 (Caleffi et al., 2015). El 10% de la inulina es absorbida en el intestino delgado, mientras que el 90% llega al colon para ser fermentada por la comunidad microbiana que ahí habita (Ellegård et al., 1997).



*Figura 1. Estructura química de la inulina.*

Entre los beneficios de la inulina se encuentra la capacidad de formar geles, la absorción de minerales como calcio, magnesio y fósforo, además de que ayuda al peristaltismo intestinal. Debido a sus propiedades benéficas y funcionales, tiene un alto potencial para utilizarse en la industria alimentaria y en otras aplicaciones. Se ha observado que consumiendo 10 g/día de inulina es posible reducir los niveles de lípidos en el plasma al disminuir la lipogénesis, así como la concentración de triacilglicéridos y colesterol en sangre e hígado, reduciendo el riesgo de padecer arterioesclerosis (Letexier et al., 2003).

Actualmente la inulina se usa para reemplazar las grasas en diferentes productos, ya que sus características sensoriales se aproximan bastante a la cremosidad y consistencia que éstas proporcionan. También se ha observado que es posible reemplazar en cierta medida el azúcar convencional con esta molécula sin que sea detectado por el consumidor, pues potencia el sabor dulce hasta en un 35%, de tal forma que se puede reducir la cantidad de azúcar en los alimentos al añadir inulina, teniendo como ventaja el efecto positivo en la

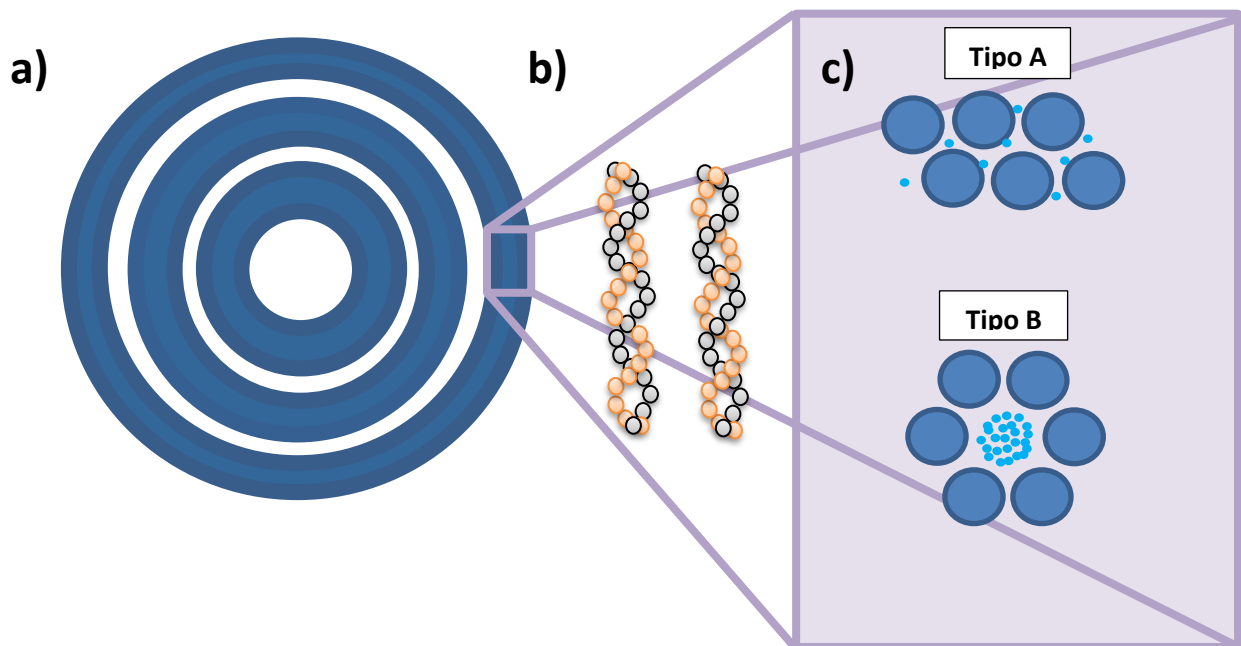
salud (Arcia et al., 2011).

En cuanto a los microorganismos del colon y el aprovechamiento de la inulina, el consumo de esta fibra incrementa particularmente la abundancia de bifidobacterias y lactobacilos, que aportan beneficios a la salud, potenciando una comunidad rica en microorganismos benéficos en el intestino grueso, ayudando a prevenir enfermedades como intestino irritable o el cáncer de colon al reducir la inflamación y estimular al sistema inmune gastrointestinal. Además, por ser una fibra que se fermenta, también es un prebiótico que contribuye a la abundancia de microorganismos potencialmente benéficos para la salud intestinal, evitando inflamación intestinal derivada del exceso de gases y produciendo ácidos grasos de cadena corta, principalmente el butirato, que cumple un rol importante en la integridad de la mucosa en el colon en las células epiteliales (Caleffi et al., 2015).

### **1.1.2 Almidón**

Considerado como una biomolécula abundante en el planeta, el almidón es el carbohidrato de mayor reserva energética en plantas y semillas donde se encuentra en forma de gránulos. Es el polisacárido más consumido por el ser humano, jugando un papel relevante en nuestra dieta. Existen diferentes fuentes de almidón, como arroz, papa, tapioca y maíz, que son alimentos básicos alrededor del mundo. La degradación de este polisacárido proporciona gran parte de la energía que necesitamos (Romano et al., 2016).

La Figura 2 muestra una representación gráfica de gránulos de almidón y la organización radial interna del gránulo desde el hilio (a). Los anillos azules muestran zonas semicristalinas, mientras que las blancas son zonas amorfas compuestas de amilosa. Debido al acomodo de las dobles hélices de amilopectina (b), en la sección semicristalina se encuentra una parte cristalina y amorfa. Estas cadenas pueden agruparse y acomodarse de diferentes formas: tipo A, tipo B o su combinación conocida como tipo C. Los puntos azules indican moléculas de agua.



*Figura 2. Estructura interna de un gránulo de almidón. a) Estructura radial del gránulo. b) Dobles hélices de amilopectina. c) Cristalinidad tipo A o B según el acomodo de las dobles hélices, vista desde arriba. Los puntos azules indican moléculas de agua.*

De forma más descriptiva, la estructura del almidón está compuesta por residuos de  $\alpha$ -D-glucopiranososa, que a su vez conforman tanto la amilosa como la amilopectina; por su conformación y acomodo en el gránulo, cada una de éstas le confieren propiedades particulares a la materia prima como cereales, que después son aprovechados para producir alimentos, por ejemplo el maíz, donde se ha observado que proporciones distintas entre amilosa-amilopectina, repercute en su reología: a mayor proporción de amilosa, mayor viscosidad (Xie et al., 2009).

La amilosa se encuentra entre el 15 y 25 % en el almidón nativo. Es esencialmente una macromolécula que consiste en residuos conectados por enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), con un grado de polimerización de 100 a 10,000. Posee una gran cantidad de grupos hidroxilo que le confieren propiedades hidrofílicas. Sin embargo, por su orientación paralela entre las estructuras, la afinidad con el agua se ve reducida. Es considerada como una estructura

amorfa de forma helicoidal, en desorden que, con respecto a la amilopectina, se encuentra en un acomodo tangencial, lo que limita las interacciones entre ambas (Tester et al., 2004).

Por otro lado, la amilopectina es una estructura altamente ramificada y consta de residuos con enlaces  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) y ramificaciones en  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) y grado de polimerización de 9,600 a 15900. Esta molécula se encuentra en mayor proporción, aproximadamente en un 75% del total del almidón (Tester et al., 2004). La amilopectina consta de cadenas largas en un acomodo de doble hélice dentro de la forma cristalina en el gránulo, anclándose a cadenas más cortas, que se halla primordialmente en la zona amorfa. Por otro lado, las dobles hélices tienen acomodos especiales del tipo A y B en la zona cristalina. El acomodo cristalino tipo A se encuentra más compacto y tiene presencia de 6 a 8 moléculas de agua, mientras que el tipo B tiene un acomodo más laxo, pero en el centro se encuentran alrededor de 36 moléculas de agua interactuando con los grupos hidrofílicos de la cadena polimérica (Cheetham & Tao, 1998).

Se ha observado que, al aumentar la cantidad de amilosa, a su vez se incrementa el almidón resistente, debido al acomodo en el gránulo en conjunto con la amilopectina, aunque no es concluyente en todas las fuentes botánicas: las cadenas de amilopectina son más largas y la estructura cristalina que se presenta es la del tipo B a diferencia del almidón nativo, donde su estructura es A. Esta conformación provee asimetría y deformación a los gránulos que en algunos casos se muestran formas de media luna (Wang et al., 2017). Por otro lado, un gránulo de almidón nativo con cristalinidad de tipo A presenta canales de fosfolípidos y proteínas por donde ingresan las enzimas lo que puede facilitar la digestión del polisacárido hasta unidades de glucosa (Naguleswaran et al., 2011). El almidón alto en amilosa tiene cristalinidad tipo B y hay escasa o incluso nula presencia de poros y canales en el gránulo, que en algunos estudios ha mostrado ser un factor que favorece el incremento de almidón resistente, por lo que no existe una degradación enzimática en su totalidad (Cheetham & Tao, 1998). Por esta razón, se ha buscado trabajar sobre almidones altos en amilosa

integrándolos en productos alimenticios y así aprovechar sus beneficios al no ser degradado en el tracto gastrointestinal por las enzimas digestivas.

Para incrementarse la cantidad de amilosa en los cereales y tubérculos cultivados, es necesario modificar la síntesis de la amilosa y amilopectina que se genera en el gránulo, por lo que se ha experimentado con las diferentes combinaciones y concentraciones de enzimas que generan, ramifican o desramifican estas estructuras, para finalmente obtener el perfil más idóneo y estable de un almidón alto en amilosa, aunque son estudios que continúan en investigación (Wang et al., 2017).

### **1.1.2.1 Almidón resistente**

Al ser el carbohidrato más consumido en el mundo, el almidón no sólo tiene impacto en una sana nutrición, sino que también, en contra parte, se le ha atribuido el aumento de enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos debido a su consumo excesivo que genera niveles altos de glucosa en sangre (Li et al. , 2019). El almidón es ingerido y la enzima  $\alpha$ -amilasa salival comienza a degradarlo y, posteriormente durante el contacto con enzimas estomacales y pancreáticas, se reduce prácticamente a unidades de glucosa, que serán absorbidas en el intestino delgado. Sin embargo, hay una fracción de almidón que puede resistir a esta digestión enzimática y pasa al colon donde es fermentado, que es al que se le conoce como almidón resistente, por lo que se tiene interés en aumentar esa fracción de almidón en los alimentos para ayudar a prevenir enfermedades que afectan la calidad de vida, como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, obesidad, etc.

El almidón resistente se subdivide en cinco tipos de acuerdo con su naturaleza y ubicación:

Tipo 1. Es inaccesible debido a sus características físicas, pues el almidón se encuentra en gránulos dentro del grano protegido por una pared celular y una matriz de proteínas que es resistente a las enzimas digestivas, por lo que llega hasta el colon. La pared no es degradada fácilmente por la temperatura y el almidón no tiene oportunidad de gelatinizarse e

hincharse. Para que pueda ser digerido, debe ser molido previamente para exponer los gránulos (Magallanes-Cruz et al., 2017).

Tipo 2. También conocido como crudo o nativo. Este almidón se constituye de una estructura muy compacta, lo que le provee de resistencia enzimática. Se ha observado que en los almidones nativos altos en amilosa, la cristalinidad tipo B puede ser un factor que eleva la resistencia a hidrólisis enzimática debido a la formación de dobles hélices que actúan como barreras y que evita la presencia abundante de poros en el gránulo, como se ha observado en algunos casos. Por otro lado, estos almidones poseen fuertes enlaces entre sus cadenas debido al alto contenido en amilosa, característica que influye en su procesamiento (Jiang et al., 2010). Se puede encontrar en los plátanos verdes, papas y maíz alto en amilosa.

Tipo 3. También conocido como almidón retrogradado. Es un tipo de almidón modificado físicamente, pues al ponerse en contacto con agua y someterse a altas temperaturas, el almidón se gelatiniza, es decir, el gránulo se hincha y hay una separación de las dobles hélices, así como el rompimiento de puentes de hidrógeno de forma parcial en la amilopectinas y lixiviación de amilosa; pero en un descenso de temperatura (inferior a los 58° C) comienza a retrogradarse, hay un reacomodo complejo tanto de la amilosa como de la amilopectina para formar nuevas asociaciones que dan lugar a un incremento en la proporción de cristalinidad tipo B, por lo que los sitios activos de las enzimas que pueden participar en la degradación del almidón ya no reconocen estas estructuras, además de que hay una disminución de poros en la superficie y las cadenas de amilopectina son más largas, factores que influyen en la disminución de la digestión enzimática, aunque hasta el momento no es irrefutable. Tanto la temperatura en el procesamiento y en su almacenaje, son factores importantes para la formación de AR (Agama-Acevedo et al., 2018; Wang et al., 2015).

Actualmente, los almidones retrogradados provenientes de un almidón nativo alto en amilosa, se utilizan en una amplia variedad de alimentos, gracias a que su estructura se

mantiene estable aún en temperaturas de cocción, confiriéndole no sólo propiedades de textura, sino también puede tener una función similar a la fibra dependiendo de la fracción resistente que contenga, ya que esta porción escapará de la hidrólisis enzimática, mientras que el resto será de fácil o lenta digestión.

Tipo 4. Es almidón modificado a través de procesos químicos como la esterificación, eterización o formando retículos con otras moléculas de tal forma que no son reconocidos los sitios activos de las enzimas y así evita su hidrólisis. Entre mayor sea la modificación, habrá mayor concentración de almidón resistente (He et al., 2008). Una de las principales modificaciones se realiza con ácido fosfórico, donde los grupos fosfato proveen redes entre las estructuras de amilosa y amilopectina, lo que dan mayor resistencia comparando con el almidón nativo (Falsafi et al., 2019).

Tipo 5. Se genera debido a la formación de complejos amilosa-lípido. Esta interacción ocurre durante el procesamiento de alimentos con alto contenido de lípidos en combinación con la amilosa del almidón. La resistencia es generada después de la unión del lípido con la alfa-hélice de amilosa lo que impide la acción enzimática para escindir la estructura lineal. Además, la formación de este complejo puede evitar que los gránulos se hinchen y que las enzimas comiencen a degradarlo (Ai et al., 2013).

El almidón resistente posee diferentes propiedades que han atraído la atención de diversas industrias, principalmente la alimentaria debido a su estabilidad o incluso su formación en diferentes temperaturas. Se usa como espesante, gelificante y estabilizador coloidal, mejorando las características reológicas de varios alimentos. Es compatible con otros ingredientes y, por tanto, también se le ha dado uso en el almacenamiento de productos refrigerados. Otra característica es que se mantiene estable a pH ácido y a altas temperaturas, además de que el aporte calórico es bajo (8 KJ/g) comparado con el almidón que es completamente digerible (15 KJ/g) debido a que este último pasa directamente a torrente sanguíneo para incrementar el índice glucémico, mientras que el almidón resistente aportará beneficios hasta llegar al colon, como es la disminución de colesterol



HDL que se ha observado en algunas experimentaciones, por lo que ahora se busca sustituir ingredientes altos en calorías que se usan por ejemplo en el área de repostería (Nasrin & Anal, 2014; Sankhon et al., 2013).

Los alimentos que consumimos representan una fuente de alimento para los microorganismos que habitan en el cuerpo humano y la fibra funge como prebiótico para la comunidad microbiana del colon. Como ya se explicó, el almidón resistente actúa como un tipo de fibra dietética al ser ingerido, fermentado y aprovechado por la microbiota intestinal.

## **1.2 Comunidad microbiana en colon**

En 2008 se inició el Proyecto de Microbioma Humano (HMP por sus siglas en inglés) con el fin de caracterizar a los microbiomas de diferentes partes del cuerpo. Este estudio fue financiado por Institutos Nacionales de Salud (NIH por sus siglas en inglés) y los microbiomas mejor caracterizados hasta el momento son orales, de piel, intestino, pulmón y vagina. Los primeros tres han mostrado tener un mayor impacto por el desarrollo de enfermedades al compararlos tanto en personas sanas como enfermas (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Podemos describir al microbioma del intestino humano como cuantioso y variable con respecto a otras partes del cuerpo, y también entre individuos. Se sabe también, que existe una comunicación muy estrecha entre el microbioma intestinal y las conexiones cerebrales que modulan mecanismos y señalizaciones que impactan sobre la salud debido a los metabolitos producidos por los microorganismos del colon que tienen funciones a nivel cerebral, pues se ha estudiado que cuando hay disbiosis intestinal (incremento de microorganismos patógenos oportunistas y descenso de microorganismos benéficos en el colon), hay una relación estrecha con fisiopatologías como el Alzheimer, trastorno del espectro autista, depresión, ansiedad, obesidad, entre otros padecimientos. Esta interacción, conocida como eje intestino-cerebro, está relacionada con moléculas

sintetizadas por los microorganismos que abundan en el colon, metabolitos como AGCC que desencadenan cascadas de señalización en relación con la estabilidad y funcionamiento adecuado de nuestro organismo. Son muchos los factores que juegan un papel en la composición del microbioma y, a su vez, en la producción de metabolitos para mantener una conexión efectiva con el sistema nervioso central (Berrill et al., 2013).

La población microbiana en el intestino se compone principalmente de bacterias mientras que un grupo más pequeño lo conforman hongos, levaduras, protozoarios, arqueas metanogénicas y virus, que viven de subproductos de fermentación, como dióxido de carbono y acetato. De manera general, los microorganismos que componen al colon son anaerobios estrictos y la gran mayoría son Gram positivos. Se estima que existe un total de  $10^{13}$  a  $10^{14}$  microorganismos por gramo de contenido intestinal, conformando entre 300 y 1000 especies. Sin embargo, el 99% de las bacterias provienen de 30 o 40 especies. Los cuatro *phyla* bacterianos dominantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, seguido de *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, centrándose principalmente en una abundancia importante de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Rumminococcus*, *Peptococcus*, *Bifidobacterium* y *Peptostreptococcus*. Se sabe que la diversidad y concentración de estos microorganismos varía por factores como estilo de vida, modo de nacimiento, alimentación, genética y también la etapa de desarrollo en la que se encuentre el huésped, donde poco después del nacimiento hay una mayor abundancia de *Actinobacterias* seguido de *Proteobacterias* y, aunque inicialmente los *Firmicutes* y *Bacteroidetes* se encuentre en nivel bajo, con el paso del tiempo (etapa de adultez) estos microorganismos ocuparán los primeros lugares, mientras que los iniciales disminuirán en su concentración. Durante la vejez, los *Firmicutes* y *Bacteroidetes* descenderán al igual que las *Actinobacterias*, mientras que las *Proteobacterias* aumentarán ligeramente (Jandhyala et al., 2015).

Aunque en un alto porcentaje las bacterias son los microorganismos predominantes, también se ha encontrado que existen hongos y levaduras que cumplen funciones

importantes en el intestino. En 2010 se realizó un estudio para generar un catálogo con los microorganismos presentes en dicha zona del cuerpo y se encontró que la comunidad fúngica corresponde a un 0.1% del total de microbios. Hasta el momento no existe un consenso de lo que podría conformar una comunidad fúngica equilibrada en el intestino pues, así como se sabe de las bacterias, existen muchos factores que provocan cambios en estas comunidades. Lo que sí es posible, es definir cuáles son los *phyla* fúngicos principales: Ascomycota, Zygomycota y Basidiomycota, donde se ubican los géneros *Saccharomyces*, *Malassezia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Galactomyces*, *Trichosporon* y *Cladosporium* (Hallen-Adams & Suhr, 2017). La comunidad fúngica, también conocida como micobiota, tiene interacciones con las bacterias propias de la zona y con el huésped, participando en procesos como el aprovechamiento de nutrientes, eje intestino-cerebro e inmunidad (Hoffmann et al., 2013).

La comunidad microbiana intestinal es indispensable para que la digestión y nutrición de nuestro cuerpo se lleve a cabo de forma adecuada, cumpliendo con actividades importantes, por ejemplo el desprendimiento constante de células de la mucosa para evitar que otras bacterias se adhieran y permanezcan hasta invadir (Jandhyala et al., 2015). Por otro lado, existen alimentos como las fibras, que sólo pueden ser degradados en el colon, pues allí habitan algunos microorganismos como *Ruminococcus bromii* o *Bifidobacterium adolescentis* que poseen complejos enzimáticos capaces de fraccionar estas estructuras y hacerlas disponibles para otros microorganismos (Jung et al., 2019; Ze et al., 2012). Cuando los microbios aprovechan lo que se ha degradado, se producen ácidos grasos de cadena corta.

Pero el microbioma no sólo aporta en cuestiones nutritivas, sino también a nivel de sistema inmunitario, pues se ha encontrado evidencia de que las bacterias promueven la diferenciación de células T antiinflamatorias y generan la homeostasis inmune (Shreiner et al., 2015). En el caso de los hongos, se ha demostrado que *Saccharomyces boulardii*

puede estimular la producción de inmunoglobulinas tipo A contra ciertas toxinas, además de la activación de células T (Hallen-Adams & Suhr, 2017).

Tanto las bacterias como los hongos producen metabolitos secundarios que regulan la concentración entre ellos, evitando la proliferación y posterior patogenicidad, como es el caso de la producción de ácidos grasos de cadena corta por parte de las bacterias, que tiene un efecto inhibitor sobre la levadura *Candida albicans*. Por otro lado, se ha demostrado que el etanol producido por *Saccharomyces cerevisiae* estimula el crecimiento de *Acinetobacter*, mientras regula su transición de levadura a hifas (Sam et al., 2017).

Es importante recalcar que los microorganismos que habitan en nuestro cuerpo trabajan en conjunto y no individualmente. Se ha observado que cuando los microorganismos del colon aislados se les genera el medio adecuado para fermentar algunas fibras, estos no pueden llevar a cabo el proceso, por lo que requieren de un trabajo en conjunto para finalmente producir ácidos grasos de cadena corta. Un ejemplo es el género *Bifidobacterium* que por sí solo no puede fermentar la inulina. Otro ejemplo es la fermentación de agaro-oligosacáridos, que es degradado por *Bacteroides uniformis* L8 mientras que *Escherichia coli* B2 se ve beneficiado de los subproductos generados de la fermentación para desarrollarse en el intestino (Li et al., 2014).

Para identificar los microorganismos que existen en los diversos microbiomas, y en este caso, el colon, se han empleado técnicas de biología molecular, donde el fundamento principal es evaluar genes específicos que aportan información taxonómica como lo es el marcador molecular ARNr 16S, ya que a través de este ha sido posible conocer la diversidad de microorganismos al ser una secuencia de ADN altamente conservada, en este caso de bacterias, que existe en el intestino y entre más avanza la tecnología en la biología molecular, se encuentran nuevos microorganismos (Jandhyala et al., 2015).

### **1.2.1 Análisis de microbioma**

La disponibilidad de herramientas novedosas, principalmente la secuenciación de próxima generación (NGS por sus siglas en inglés), ha permitido evaluar genes y genomas contenidos dentro de comunidades microbianas complejas (Panek et al., 2018). El método NGS más utilizado para la evaluación taxonómica y filogenética de la composición de la comunidad bacteriana se basa en el análisis de amplicón del gen 16S rRNA, que es una secuencia altamente conservada entre las distintas especies de bacterias y arqueas que se encuentra en la subunidad menor 30S de los ribosomas procariotes. Está compuesto de 1500 nucleótidos y una de sus funciones es proveer de soporte en la posición de proteínas ribosomales (Harris et al., 2019).

A pesar de que es una secuencia muy conservada, en la estructura del gen 16S hay nueve regiones hipervariables (V1-V9) que marcan diferencias entre especies para realizar estudios de filogenia. Las zonas que son conservadas sirven para obtener iniciadores que puedan amplificar la región hipervariable de interés (Bukin et al., 2019).

La selección de las regiones a analizar dependerá de la comunidad microbiana a evaluar. La región V4 del gen 16S es el estándar cuando se analiza el microbioma intestinal pues, de acuerdo con estudios previos, se identifica una mayor cantidad de taxones a partir de esta región (Vital et al., 2018). Sin embargo, hay otros estudios que muestran la importancia de no seleccionar sólo una región sino varias para tener un resultado más confiable, pues de acuerdo con el estudio realizado por Alcon-Giner et al. (2017) el análisis con regiones V1+V2+V3 y V6+V7+V8 mostraron mayor diversidad de microorganismos que las regiones V4+V5. La mayoría de las regiones hipervariables por separado no identifica suficiente variación en las secuencias de alta similitud y los taxones son marcados erróneamente como si fueran un mismo microorganismo (Johnson et al., 2019). Es por eso que, dependiendo de las muestras a analizar, se recomienda seleccionar al menos dos regiones hipervariables que describan taxonómicamente una comunidad.

En el caso de hongos y levaduras, el análisis del gen 18S rRNA es la zona conservada idónea para caracterizar una comunidad. Sin embargo, no es la única, pues también existe el

espaciador transcrito interno de ADN ribosómico nuclear (ITS por sus siglas en inglés). En el caso de las células eucariotas, se divide en dos: ITS1 que se encuentra entre los genes de ARNr 18S y 5.8S, mientras que ITS2 está entre los genes de ARNr 5.8S y 26S (en plantas) o 28S (en otros eucariotes) (Hoggard et al., 2018). El ITS2 ha mostrado ser más consistente en los diferentes estudios que se realizan sobre la filogenia de una muestra, permitiendo concluir que puede ser el marcador ideal para presentar la riqueza de hongos en cierta comunidad ( Yang et al., 2018).

### **1.3 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC)**

Son compuestos orgánicos conformados por un máximo de seis carbonos que tienen un grupo carboxilo y una cola alifática. Se producen en el ciego y en el colon gracias a la fermentación de fibras por parte de la microbiota. Los principales AGCC son el ácido acético, propiónico y butírico en una relación 60:20:20, representando hasta el 95% de los AGCC en el intestino grueso, ya que existen también otros que se encuentran en menor concentración como el isobutirato, isovalerato y el 2-metil butirato. Los AGCC son utilizados por el organismo cumpliendo con distintas funciones que favorecen la salud y la homeostasis (Cummins et al., 1987).

Tanto la dieta como la composición de la microbiota, tienen un impacto sobre la concentración resultante de AGCC por el efecto que genera cada factor, ya que los alimentos que el huésped consume, a su vez serán fuente de alimento para los microorganismos del colon, fomentando el desarrollo de algunos y la disminución de otros.

#### **1.3.1 Ácido acético**

De los ácidos grasos de cadena corta, éste es el que se encuentra en mayor abundancia en el colon y por lo tanto en la materia fecal. Existen dos rutas metabólicas por las que se produce el acetato, pero la comúnmente descrita es la ruta Wood-Ljungdahl en bacterias del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcus* y la especie *Akkermansia*

*muciniphila*, con esta ruta pueden sintetizar acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono o ácido fórmico. La otra vía de síntesis para el acetato es a través del Acetil CoA proveniente del piruvato, donde microorganismos del género *Coprococcus* participan en su generación (Xu et al., 2017).

Después de su síntesis, el acetato es introducido a la biosíntesis lipídica pues es el sustrato principal para la síntesis de colesterol y triglicéridos, observándose en un estudio en ratas que cuando hay un concentración elevada de acetato, incrementan los niveles de colesterol y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) así como de triglicéridos en sangre (Liu et al., 2019). Por otro lado, el acetato presenta interacción con el sistema nervioso central, suprime el apetito a través de mecanismos en el hipotálamo y neuronas proopiomelanocortina (POMC) , que detectan señales sobre el estado energético del organismo y niveles de glucosa, lo que reduce la ingesta de alimentos (Frost et al., 2014).

### **1.3.2 Ácido propiónico**

Existen tres rutas por las que se puede producir este ácido en el colon: ruta del succinato por medio de la descarboxilación de metilmalonil-CoA a propionil Co-A, realizada por microorganismos como *Firmicutes* y *Bacteroidetes*; ruta del acrilato donde el lactato es convertido a propionato debido a la actividad enzimática de lactoil CoA dehidratasa, siendo *Veilonellaceae* y *Lachnospiraceae* las familias de bacterias que participan, además de *Clostridium propionicum*; y por la ruta del propanodiol donde se realiza la conversión de propionaldehído a propionil-CoA a través de la enzima propionaldehído deshidrogenasa, proveniente de algunas bacterias como *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus obeum* y *Salmonella enterica*. En la materia fecal se han encontrado más *Bacteroidetes*, por lo que supone que la ruta dominante para la generación de propionato es la de succinato (Louis & Flint, 2017).

Posterior a su producción, se incorpora a la ruta de gluconeogénesis donde disminuye la síntesis hepática del colesterol por inhibición de la actividad de hidroximetilglutaril coenzima A (Den Besten et al., 2013).

### 1.3.3 Ácido butírico

Se han identificado dos rutas por las que se obtiene este ácido. La ruta de butirato quinasa usa enzimas como butirato quinasa y fosfotransbutirilasa que convierten el butiril CoA en butirato, siendo la ruta más común llevada a cabo por especies del género *Coprococcus*. Por otro lado, la ruta acetato CoA-transferasa, donde el butiril-CoA es convertido a butirato en un solo paso y la llevan a cabo las bacterias del género *Faecalibacterium*, *Eubacterium* y *Roseburia* (Louis & Flint, 2009).

Este ácido graso es el alimento principal de los colonocitos que son las células epiteliales que recubren el intestino, siendo una barrera perfecta para evitar el paso de patógenos o toxinas hacia otros órganos y torrente sanguíneo. También está relacionado con la producción de hormonas intestinales, promueve la motilidad del colon, incrementa la irrigación visceral, inhibe el desarrollo de tumores en los casos de cáncer colorrectal e inhibe citosinas proinflamatorias (TNF) (Ziętek et al., 2021).

Sólo algunos microorganismos producen propionato y butirato en común, como *Roseburia inulinivorans* y *Coprococcus catus* (Louis & Flint, 2017).

Los ácidos grasos de cadena corta representan un lugar importante en la salud humana. La cantidad y abundancia de ellos se considera como biomarcadores para identificar si una persona es sana o no. Un ejemplo de ello, son los pacientes que padecen de cáncer colorrectal, donde la baja concentración de butirato en materia fecal es una de las principales características (Wang et al., 2020). Por otro lado, la producción de AGCC reduce el pH del colon, lo que inhibe microorganismos patogénicos e incrementan la absorción de ciertos nutrientes. El acetato producido por el género *Bifidobacterium* inhibe



enteropatógenos mientras que el butirato funciona como combustible para células del epitelio intestinal (Venegas et al., 2019). También son benéficos en el sistema nervioso central, pues se sabe que estas moléculas pueden activar cascadas de señalización a través de células especializadas (como las enteroendocrinas) ya sea en el intestino o en el hígado, generando respuestas cerebrales, como la regulación de hambre y saciedad (Cani et al., 2009).

## **1.4 Análisis de ácidos grasos de cadena corta**

Debido a la importancia que tienen los AGCC en la salud y en casos de enfermedad en seres humanos, se han aplicado múltiples metodologías para realizar una detección apropiada de ellos en muestras de suero, ciego, plasma sanguíneo, cerebro y medios de fermentación de heces (como en este proyecto). Sin embargo, estas metodologías presentan algunas desventajas para el análisis, pues la manipulación de las muestras que contienen AGCC puede influir en su pérdida y que la cuantificación no sea exitosa, atribuyéndose a su estructura, ya que al tener una cola alifática (hidrófoba) y un grupo carboxilo (hidrófilo), se complica su extracción. Se ha optado por añadir ácidos a las muestras para protonizar a los AGCC e incrementar su hidrofobicidad, facilitando la extracción a través de soluciones acuosas a donde los AGCC son transferidos al ser más hidrofílicos. Otro pretratamiento para los ácidos grasos de cadena corta es la derivatización, que les provee de cromóforos dando como resultado moléculas estables para el análisis a altas temperaturas. En la derivatización se reemplaza el grupo ácido por grupo alquilo, siendo más volátiles, menos polares y térmicamente más estables para el análisis y la detección por UV-Vis o fluorescencia (Kim et al., 2019).

Existen métodos físicos que concentran la muestra de interés (centrifugación o filtración) pero tiene la desventaja del acarreo de impurezas que pueden afectar la separación de los analitos de interés e incluso una vida útil corta de la columna. Otros métodos son la destilación al vacío, donde la temperatura no es un factor que dañe la estructura de los

AGCC. Se utilizan ácidos que aumentan su volatilidad y hacen más preciso al método, pero se requiere de bastante tiempo para realizar el proceso, así que puede haber pérdidas de muestra. El empleo de ácidos previo a una extracción con solventes como el dietiléter, también es una técnica comúnmente usada, pues purifica la muestra, incrementa la volatilidad en los ácidos grasos y les da estabilidad. Sin embargo, puede haber pérdidas de material y, por otro lado, el proceso se vuelve riesgoso por el uso de solventes que son dañinos a la salud de quien los manipule.

Entre los últimos pretratamientos investigados para optimizar el análisis de AGCC se encuentra la microextracción en fase sólida, que es una técnica rápida y sensible para la detección de estas estructuras tan volátiles; sin embargo, es necesario que las muestras estén libres completamente de agua antes de iniciar el análisis (Kim et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Por otro lado, la técnica comúnmente aplicada para el análisis de AGCC es la cromatografía de gases, aunque puede presentar algunas desventajas por la degradación y modificación de los ácidos debido a la temperatura empleada durante el análisis. El pretratamiento de las muestras es indispensable para separar los AGCC de la solución donde se encuentran integrados; sin embargo, debe seleccionarse el mejor método para evitar la pérdida de AGCC antes del análisis. El tipo de columna que se usa para este análisis por su eficacia, es la de tipo capilar, con sílice como material de soporte, mientras que el tipo de fase estacionaria más empleada es polietilenglicol y polisiloxanos por su alta polaridad, resistencia a temperatura y su resolución. El detector más usado es el de ionización de flama (FID), ya que es sensible, preciso y se puede regular su temperatura. Sin embargo, se ha reportado que un detector de espectrometría de masas resulta aún más sensible y selectivo en el análisis.

Para evaluar la producción de AGCC a partir de alimentos que fungen como fibras, se ha optado por hacer análisis utilizando sistemas *in vitro* que asemejen las condiciones corporales, utilizando microorganismos de heces para el proceso fermentativo.

## **1.5 Sistemas de fermentación *in vitro***

El desarrollo de productos para el ser humano requiere de pruebas confiables que validen resultados antes de ponerlas en práctica. Sin embargo, experimentar en modelos animales o humanos, tiene implicaciones éticas, altos costos económicos y actividades laboriosas que dificultan la investigación. Es por ello que se ha buscado la manera de simular condiciones humanas y acercarse a los resultados reales a través de sistemas *in vitro*, y el caso del estudio de la microbiota intestinal, no es la excepción. Los modelos intestinales han presentado ventajas de experimentación con resultados nada despreciables y que están en constante mejora. Sin bien no es posible asemejar al 100% el sistema gastrointestinal, sí proporciona un acercamiento en los diferentes ramos de investigación, cumpliendo con objetivos como la evaluación de nuevos productos alimenticios, medicamentos orales, etc. Las fermentaciones *in vitro* pueden ser por lote usando condiciones anaeróbicas con la muestra de heces o un sistema dinámico representando diferentes partes del sistema gastrointestinal, es decir, desde zona oral, estomacal, intestinal, e incluso el colon en las zonas proximal, transversal y distal.

El sistema de fermentación por lote es muy aplicado para monitorear de forma particular un producto de interés. Algunos de los sistemas por lote reportados van desde pequeñas placas con pocillos, hasta recipientes de 1 L y, dependiendo del objetivo final, se controla pH, temperatura, atmósfera, medio, agitación, etc. (Takagi et al., 2016; Tsitko et al., 2019; Zhou et al., 2020; Berner et al., 2013).

Sin embargo, está limitado por la cantidad de muestra que se quiera analizar, pues una vez añadido es necesario esperar hasta finalizar el proceso, además de que la acumulación de sustancias no benéficas durante el metabolismo de los microorganismos puede tener un efecto sobre el resultado final. Se utilizan para estudios que involucran un periodo de tiempo corto y pruebas no muy complejas, pues si bien no hay un comportamiento como en un sistema *in vivo*, sí puede generar aproximaciones del funcionamiento real.

Recientemente, se han aplicado sistemas dinámicos para establecer un ambiente más complejo bajo condiciones que en el colon son relevantes, ya que pareciera que trabajar en un sistema por lotes resulta más alejado de la realidad. Se utiliza en estudios que requieren de tiempos de fermentación largos. A continuación, se describen tres modelos de fermentación continua basada en varias etapas.

El simulador de ecosistema microbiano del intestino humano (SHIME por sus siglas en inglés) es un modelo intestinal que imita el tracto gastrointestinal e incorpora el estómago, intestino delgado y algunas zonas del colon, controlándose el pH del sistema en las diferentes etapas. Su nombre ha quedado registrado conjuntamente por ProDigest y la Universidad de Gante. Al ser un sistema altamente estandarizado y controlado, los resultados son reproducibles de forma confiable (Van de Wiele et al., 2015)

El simulador gastrointestinal (SIMGI por sus siglas en inglés) es un modelo automatizado gastrointestinal *in vitro* para simular dinámicamente los procesos fisiológicos que tienen lugar durante la digestión en el estómago y el intestino delgado, así como la reproducción de microbiota del colon responsable de bioconversiones metabólicas en el intestino grueso con parámetros controlados por computadora, entre ellos, movimientos peristálticos. Fue desarrollado en el Instituto de Investigación en Ciencias de los Alimentos, en Madrid, España (Barroso et al., 2015).

El sistema de digestión gastrointestinal dinámica (DIDGI por sus siglas en inglés), está conformado de dos fases que permiten el estudio de la desintegración de alimentos en la digestión, simulando el estómago y el intestino delgado. Fue creado en el Instituto Nacional Francés de Investigación Agrícola con el objetivo de evaluar las moléculas liberadas en el proceso de digestión, así como determinar la biodisponibilidad de nutrientes. Todo es controlado por computadora y reproduce de forma muy similar las características de esta sección del sistema gastrointestinal a través de sensores de pH, temperatura, bombas, condiciones anaeróbicas, así como respuesta inmediata a través de gráficos en tiempo real.

Como perspectiva, se ha considerado adicionar membranas que imiten la absorción de nutrientes (Ménard et al., 2015).

En todos los sistemas *in vitro*, para conseguir un sistema anaeróbico se requiere desplazar el oxígeno que se encuentre en el medio, ya que conforme se desciende en el sistema gastrointestinal, la concentración de oxígeno se vuelve ausente, por lo que es necesario el intercambiarlo por gases como nitrógeno y dióxido de carbono en la sección que simula el colon, además de la adición de agentes reductores que secuestren el oxígeno restante en el sistema.

## 1.6 Antecedentes del proyecto

En el trabajo realizado por Shen et al. (2012) se describe el impacto de la ingesta de fibra dietética sobre la microbiota intestinal representada por materia fecal de humanos. En ese estudio se utilizó un modelo colónico *in vitro* de tres etapas (simulando las tres secciones del colon), en tres niveles de una combinación de fibras: dieta típica (almidón 5 g/L, pectina 2 g/L, goma guar 1 g/L, xilano 2 g/L, arabinogalactano 2 g/L e inulina 1 g/L), otro con un contenido de fibra tres veces mayor y una etapa final retornando a la dieta típica. Se analizó el perfil bacteriano mediante secuenciación masiva y las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta obtenidos en la fermentación, dando por resultado el crecimiento de *Bifidobacterium*, grupo *Lactobacillus-Enterococcus* y grupo *Ruminococcus* en los sistemas con alto contenido de fibra, además de variaciones en la cinética de crecimiento entre microorganismos dependiendo del pH de cada zona, pues entre más aumentaba el contenido de fibra, la abundancia de algunos *Firmicutes* decreció, mientras que los *Bacteroidetes* incrementaban. Conforme se aumentó la concentración de fibra, también se observó un aumento en la concentración de ácidos grasos. Sin embargo, al disminuir el contenido de fibra en los sistemas, los taxones también se vieron modificados, retornando a la microbiota inicial. Los autores concluyeron que la ingesta de fibra dietética puede regular la fermentación colónica y también el crecimiento de bacterias dentro de la

microbiota colónica humana, además de potenciar la producción de ciertos AGCC de acuerdo a la fase del colon simulada, ya que, en el caso del butirato, este se produjo en mayor concentración en la simulación del colon transversal, donde el pH aún es ácido y hay una mayor concentración de *Firmicutes* productores de este ácido graso, a diferencia de la sección distal, donde el pH es casi neutro y causa la disminución de algunos microorganismos (Shen et al., 2012).

Haciendo referencia a los almidones resistentes y su comportamiento como fibra dietética al ser consumidos, se han realizado diversos estudios. Uno de ellos es el trabajo que describen Le Leu, et al. (2010), donde el objetivo fue conocer en un experimento en ratas cuál sería el impacto de la fermentación del almidón resistente tipo 2 en combinación con *Bifidobacterium lactis* sobre el cáncer de colon. Los autores observaron un incremento en la concentración de ácidos grasos de cadena corta y una disminución en la proliferación de células colónicas lo cual disminuye el riesgo de mutaciones y desarrollo de cáncer. Si bien, en el estudio también se evalúa el efecto del almidón resistente por sí solo, se observó un efecto potencial en la relación simbiótica con *B. lactis*, debido a la interacción entre este microorganismo y el butirato producido de la fermentación del AR, ya que en conjunto pueden incrementar los niveles de citocinas y favorecer la apoptosis de células cancerosas (Le Leu et al., 2010).

Matínez et al. (2010) evaluaron la materia fecal de 10 personas después de consumir galletas que contenían almidón resistente tipo 2 y otras con tipo 4. Después de secuenciar el gen 16 rRNA se reveló que el consumo de AR alteraba significativamente la población microbiana, pero se obtenían diferencias en la composición, ya que el AR4 indujo el crecimiento de los grupos *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* y una mayor abundancia de taxones en las muestras, mientras que decreció el grupo *Firmicutes*. Por otro lado, se observó que *Ruminococcus bromii* y *Eubacterium rectale* aumentaron considerablemente con el consumo de AR2. Los autores recalcan que las magnitudes varían entre individuos, pero sí están asociadas al consumo de AR (Martínez et al., 2010).

Poeker et al. (2018) realizaron un estudio para conocer la fermentación de tres fibras dietéticas particulares ( $\beta$ -glucano,  $\alpha$ -galactooligosacárido y xilooligosacárido) e inulina como control positivo simulando la zona de colon proximal humano a través de tres bioreactores conectados de forma continua. Además de analizar los ácidos grasos de cadena corta como resultado en la fermentación, también se estudió la microbiota responsable de la producción de dichos ácidos, realizando una secuenciación masiva de los microorganismos. Los autores observaron que la microbiota dominada por *Bacteroidaceae-Ruminococcaceae* produjo más butirato (hasta 96%), mientras que la dominada por *Prevotellaceae-Ruminococcaceae*, produjo más propionato (hasta 40%) (Poeker et al., 2018).

Erickson et al. (2018) compararon el efecto prebiótico potencial y la fermentabilidad de cuatro fuentes comerciales de almidón resistente tipo 4 (papa, tapioca, maíz 1 y maíz 2), midiendo cambios en la producción de gas, pH y formación de ácidos grasos de cadena corta; se usó como control la povidexina y fructooligosacáridos de cadena corta. Como resultado, los autores observaron que después de 24 h de fermentación, el almidón de papa y tapioca mostraron resultados similares de pH, producción de gas y AGCC. El almidón de maíz 1 generó un ligero aumento de pH y el de maíz 2 produjo menor cantidad de gas que el resto, pero con un pH mayor. Como conclusión, los autores mencionan que, si bien los AR4 generan un efecto positivo en la producción de AGCC, el almidón resistente obtenido de maíz 1 puede ser buen candidato para reemplazar a los fructooligosacáridos en algunas aplicaciones debido a que durante la fermentación se produjo menor cantidad de gas, lo que se puede proyectar en una menor inflamación intestinal (Erickson et al., 2018).

En el desarrollo de un sistema *in vitro* que simulara la fermentación del colon, Tsitko et. al (2019), estudiaron once fibras, entre ellas, la inulina y el almidón resistente. El sistema consistió en micropocillos con condiciones similares al colon que favoreció en proceso fermentativo. Se observó que tanto la inulina como el almidón resistente incrementaban el desarrollo del género *Bifidobacterium*, así como familias productoras de butirato, como

*Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*. El tiempo de tratamiento fue de 48 h y se observó que conforme pasaba más tiempo y el pH se elevaba, algunos *Firmicutes* se veían disminuidos, mientras que los *Actinobacteria* incrementaban, es decir, el pH tuvo un efecto sobre la composición microbiana final (Tsitko et al., 2019).

Giuberti et al. (2020) analizaron cuatro fuentes de almidón resistente tipo 3 y además uno del tipo 2 alto en amilosa. Estos sustratos se fermentaron en un sistema *in vitro* con materia fecal de cerdo como inóculo. Los ácidos grasos de cadena corta fueron analizados cualitativa y cuantitativamente. Como resultado, la concentración de AGCC varió de acuerdo con el almidón usado como sustrato. Lo que se resalta es que el almidón retrogradado de maíz y el almidón tipo 2 alto en amilosa generaron mayor cantidad de butirato y propionato, ácidos grasos que muestran mayor beneficio para el cuerpo humano (Giuberti & Gallo, 2020).

## **1.7 Objetivo**

### **1.7.1 Objetivo general**

Evaluar la fermentabilidad del almidón retrogradado como fibra dietética bajo un modelo colónico *in vitro*, analizando los ácidos grasos de cadena corta producidos y los microorganismos involucrados en el proceso.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

1. Obtener el almidón retrogradado a partir de almidón alto en amilosa (Hylon VII) y cuantificar el almidón resistente contenido tanto en el almidón tipo 2 como el tipo 3, además de concentrar la fracción de almidón resistente del AR3 con enzimas, simulando su paso por el tracto gastrointestinal.
2. Obtener las muestras de materia fecal provenientes de tres donadores saludables,



una vez que fue registrada su alimentación habitual por 21 días.

3. Implementar el modelo de fermentación colónica adecuado, tanto del medio de cultivo como del sistema anaerobio controlado, además de los inóculos preparados con materia fecal.
4. Evaluar la producción de AGCC por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas en cinéticas de fermentación con las fibras dietéticas: inulina (control positivo) y almidón resistente tipo 3 como fuente de carbono principal.
5. Caracterizar la comunidad microbiana total seleccionada a partir del proceso de fermentación de las fibras dietéticas, a través de la secuenciación masiva de un marcador ribosomal para procariotes por medio de la plataforma Illumina MiSeq 250 PE y el posterior análisis bioinformático con QIIME2.
6. Comparar los resultados de comunidad microbiana y producción de AGGC obtenidos en la fermentación de las fibras dietéticas *in vitro* para concluir si tiene efecto positivo.

## **1.8 Hipótesis**

La fermentación de almidón resistente tipo 3 en un sistema *in vitro*, tendrá un efecto positivo sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta y un impacto sobre el microbioma asociado al colon.

## **1.9 Planteamiento del problema y justificación**

Actualmente, la industria alimentaria ha evolucionado de forma significativa al adicionar almidón resistente para mejorar sus productos y aumentar la aceptación por el consumidor. Se cree que estos componentes, por pertenecer al grupo de las fibras, tiene un beneficio en la salud. Estudios recientes han demostrado que los almidones resistentes promueven la

producción de ácidos grasos de cadena corta y modificaciones en el microbioma intestinal. Sin embargo, es importante evaluar el almidón resistente tipo 3 proveniente de un almidón alto en amilosa y demostrar el efecto benéfico en el colon, antes de asumir que cualquier AR tiene un efecto positivo en la salud.

Con este proyecto se busca comparar los productos de fermentación del almidón resistente tipo 3 con la inulina (ambos utilizados en la industria alimentaria) para determinar si en sistemas *in vitro* se generan respuestas que puedan asociarse a efectos benéficos, haciendo referencia a la producción de ácidos grasos de cadena corta y a la microbiota que se encuentra en colon.

## **II. Materiales y Métodos**

---

### **2.1 Obtención de almidón resistente tipo 3**

Se utilizó almidón nativo Hylon VII con 70 % de amilosa. Se preparó una suspensión al 5% de almidón y se calentó a 60°C por 15 min antes de gelatinizarla a 121°C por 15 min, y posteriormente se vaciaron en refractarios esterilizados. Después del vaciado se colocaron a 75 °C, pesándose cada 24 h para determinar el agua perdida, hasta obtener el 20% de humedad. Después, la pasta formada se almacenó en refrigeración a 4°C por cinco días. Posteriormente se secó en estufa a 110° C durante 2.5 h. Una vez seco, se molió para disminuir su tamaño de partícula, se pasó a la licuadora y después por un molino (KRUPS GX4100) en 3 ciclos de 10 segundos. Al final, se cribó en malla No. 60.

### **2.2 Cuantificación de almidón resistente**

Se cuantificó el almidón resistente contenido en el Hylon VII (AR2) y también en el almidón retrogradado obtenido en el laboratorio (AR3) utilizando el Kit AOAC K-RAPRS 11/19 de Megazyme (Wicklow, Irlanda).

Se pesaron 100 mg de la muestra de almidón y se colocaron en el tubo de polipropileno. Se adicionaron 3.5 mL de buffer de malato de sodio pH 6.0 y se mezcló en vórtex por 5 s. Se colocó en baño de agua por 5 min a 37 °C. Posteriormente se agregaron 0.5 mL de solución PAA/AMG (amilasa pancreática y amiloglucosidasa) y se incubó a 37 °C por 4 h, en agitación a 65 rpm. Se removió el exceso de sobrenadante y se agregaron 4 mL de etanol al 95% y se agitó vigorosamente en vórtex. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 2 mL de etanol al 50%; después de agitó en vórtex. Nuevamente se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, se decantó y se agregaron 6 mL de etanol al 50% para centrifugar por última ocasión, dejando una pequeña cantidad de etanol con el precipitado hasta continuar el análisis. Posteriormente, se agregaron 2 mL de

NaOH 1.7 M frío para resuspender el pellet. Se mantuvo en agitación magnética por 20 min en baño de hielo. Se adicionaron 8 mL de buffer de acetato de sodio 1.0 M pH 3.8 e inmediatamente 0.1 mL de AMG 3,300 U/mL. Se colocó en un baño de agua a 50 °C por 30 min, con agitación intermitente en vórtex. Seguido de esto, se transfirió la solución a frascos de 100 mL y se aforó. Se centrifugó a 11000 rpm por 5 min. Para finalizar, se transfirieron 0.1 mL de cada dilución a tubos de ensayo y se adicionaron 3 mL de GOPOD y se incubó a 50 °C por 20 min. Se colocó 1 mL de cada muestra y duplicado en las celdas de plástico para leerse en espectrofotómetro (DLAB SP-UV1100) a 510 nm.

### **2.3 Predigestión de almidón resistente tipo 3**

El almidón fue sometido a una digestión *in vitro*, simulando el paso desde la boca hasta el intestino delgado y su interacción con enzimas propias de las diferentes zonas del cuerpo humano de acuerdo con una solución reguladora con la composición mostrada en la Tabla 1 para cada fase.

Fase oral: Simulación de fluidos salivales con  $\alpha$ -amilasa de 75 U/mL a pH 7.0, 37 °C por 2 min.

Fase gástrica: Simulación de fluidos gástricos con pepsina 2000 U/mL a pH 3.0 a 37 °C por 120 min.

Fase intestinal: Simulación de fluido intestinal con pancreatina 100 U/mL a pH 7.0, 37 °C por 120 min.

Tabla 1. Composición de soluciones: fase oral, gástrica e intestinal

Constituyente	Solución stock		Fase oral p H 7	Fase gástrica p H 3	Fase intestinal p H 7
	g L <sup>-1</sup>	Conc. molar	Vol. de stock mL	Vol. de stock mL	Vol. de stock mL
KCl	37.3	0.5	15.1	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0.5	3.7	0.9	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	6.8	12.5	42.5
NaCl	117	2	-	11.8	9.6
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30.5	0.15	0.5	0.4	1.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0.5	0.06	0.5	-
<b>Ajuste de pH</b>					
NaOH		1	-	-	-
HCl		6	0.09	1.3	0.7
<b>Concentración de Ca<sup>2+</sup></b>					
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	44.1	0.3	1.5 Mm	0.15 mM	0.6 Mm

Inicialmente, se pesaron 5 g del almidón. Se adicionaron 4 mL de agua y de la pasta obtenida se pesaron nuevamente 5 g que se adicionaron a tubos Falcon de 50 mL. Se ajustó el pH inicial a 7 y posteriormente se adicionó la enzima amilasa maltogénica de *Bacillus* spp (A2986 Sigma-Aldrich), se incubó por 2 min y seguido de ello se añadió la pepsina de mucosa gástrica porcina (P7000 Sigma-Aldrich), se ajustó el pH a 3 y se incubó por 2 horas. Posteriormente se adicionó pancreatina de páncreas porcino (P1750 Sigma-Aldrich) y se ajustó el pH a 7 de acuerdo con el orden de digestión. Se incubó a 37 °C el tiempo correspondiente a cada fase y se mantuvo en agitación constante por inversión cada 2 min. Al finalizar las tres fases, se colocó en un baño de hielo a 4°C mientras se realizaban dos lavados con etanol al 50% (se adicionaron 20 mL de etanol al 95%). Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm 10 min y se decantó. Se dejó secar a 50 °C por 20 h para después ser molido y tamizado en malla No. 60. La digestión se realizó por triplicado.

## **2.4 Materia fecal**

Se eligieron 3 personas donadoras de materia fecal considerando los siguientes criterios: edad de 20 a 40 años, no embarazada, no fumador, no consumo de alcohol constante, sin padecimientos gastrointestinales y que no hubiera consumido antibióticos en los últimos tres meses. Cuando la muestra fue tomada, se mantuvo en congelación (-20°C) para evitar actividad de los microorganismos de la materia fecal. Una vez iniciada la experimentación, las muestras se colocaron a temperatura ambiente antes de preparar el inóculo.

Cabe señalar que previo a la donación de materia fecal, el donante firmó un formato de consentimiento informado (Anexo 1), aprobado por un comité de bioética (Anexo 2). El formato comprende los siguientes puntos:

- Descripción breve y clara del proyecto
- Descripción en qué consistirá la participación del donante
- Riesgos
- Confidencialidad
- Beneficios
- Firma de aceptación

Por medidas de seguridad tanto en la manipulación de las muestras de heces como en la experimentación misma, se realizaron exámenes coprológicos y coproparasitoscópicos de la materia fecal de cada donador, descartando la presencia en abundancia de posibles parásitos u otros microorganismos patógenos. También, los participantes registraron su ingesta de alimentos en los 21 días anteriores a la toma de muestra, con el objetivo de conocer de manera general los posibles efectos de la dieta sobre la microbiota.

## **2.5 Sistema y condiciones de fermentación**

Se utilizaron 0.3 g de almidón resistente tipo 3 y 0.3 g de inulina para cada participante en sistemas de fermentación con frascos de 100 mL, por separado. Se hidrataron en 40 mL del medio de cultivo GAM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) que contiene los componentes similares al colon, además de agentes reductores para evitar la presencia de oxígeno para los microorganismos (Takagi et al., 2016). Posteriormente se pasaron por un baño de agua a 37 °C, incubándose por 2 h. Las muestras de heces (10 g) se mezclaron con un buffer de fosfatos 1:1 y después se combinaron con una solución reductora (2.5 g de L-Cisteína HCl, 16 mL de NaOH 1 N, 2.56 g de sulfuro de sodio anhidro) a una concentración 1:1. Un volumen de 5 mL del inóculo de materia fecal fue añadido a cada frasco una vez enriquecida la atmósfera con N<sub>2</sub>, filtrando el gas por una membrana de 0.22 µm (Whatman). Para liberar el gas producido durante la fermentación, se colocó una manguera desde el sistema hasta una trampa de gas con una solución y carbón activado al 1% para secuestrar el olor, verificando su funcionamiento en la formación de burbujas en la trampa.

Se tomaron muestras de 1.5 mL para analizar los AGCC a las 0, 4, 8, 12 y 24 h. El pH se mantuvo a 5.8-6 agregando NaOH 1N en caso necesario. Para detener el proceso, se añadió 1 mL de solución de sulfato de cobre (200g/L).

En la Figura 3 se muestra un esquema del sistema de fermentación, utilizando un frasco de 100 mL con tapón de caucho. Se realizaron tres perforaciones que se utilizaron como vías de acceso y salida de reactivos, medio de cultivo, inóculo, salida de gas y muestras, además de una perforación más para la colocación del electrodo de pH.

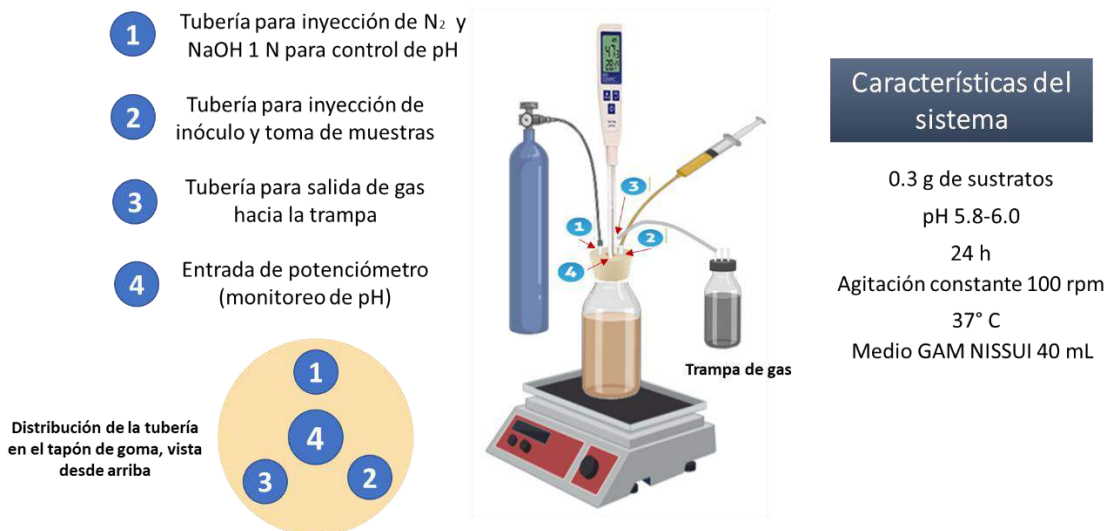


Figura 3. Esquema de sistema de fermentación con sus características y distribución de tuberías.

## 2.6 Análisis de AGCC

### Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas

Se usó ácido succínico como estándar interno al 0.2 M, almacenando a 4 °C, así como NaOH 1N utilizado para la extracción de los AGCC.

Para las muestras, se tomó 1 mL del sobrenadante de cada sistema de fermentación en la cinética establecida (0, 4, 8, 12 y 24 h) y se colocó en tubos Eppendorf. Las muestras se colocaron en vórtex a máxima agitación por 5 s. La muestra se colocó en tubo de vidrio de 10 mL para centrifugación. Se agregaron 50 µL de la solución de estándar interno 0.2 M. Las muestras fueron mezcladas en vórtex por 5 s y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 5 min. Se adicionaron 100 µL de HCl concentrado y se agitaron en vórtex por 15 s. Se adicionaron 5 mL de dietiléter, incubando 20 min a temperatura ambiente y mezclando ligeramente en tiempos intermitentes. Se centrifugó a 3600 rpm por 6 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionaron 500 µL de solución NaOH 1 M. Nuevamente, se incubó por 20 min y posterior centrifugación a 3600 rpm por 6 min. La fase acuosa se



transfirió a un tubo Eppendorf y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado. Se mezcló y las muestras se mantuvieron a 4°C.

En el análisis de GC-MS se utilizó la metodología descrita por Zamora-Gasga et al. (2015) con ligeras modificaciones (Zamora-Gasga et al., 2015). El análisis se realizó en el equipo Agilent Technologies 7890B Network Series GC System y detector selectivo de masas de triple eje 5975C, con columna capilar HP-5ms 19091S-433 (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ .

Las condiciones de los análisis cromatográficos fueron las siguientes: la temperatura del inyector fue de 250°C. La temperatura del horno se mantuvo inicialmente a 50° C durante 5 min y luego se aumentó a 200 °C, la tasa de aumento fue de 5 °C/min y esta temperatura se mantuvo durante 2 min, después se aumentó a 230 °C, la rampa de aumento fue de 15 °C/min y esta temperatura se mantuvo durante 15 min con un tiempo de corrida final de 53.5 min.

El volumen de inyección fue de 2  $\mu\text{L}$  para las muestras y estándares, mediante modo de inyección manual, modo de control de flujo velocidad lineal, flujo en la columna 1.10 mL/min, velocidad lineal del gas 27.45 cm/s, gas de arrastre helio, temperatura de fuente de iones 250 °C, tiempo de inicio 3 min, tiempo de finalización 53.5 min. La detección m/z inicial 50 y m/z final 550. Los datos cromatográficos se procesaron con el programa MS ChemStation y MS interpreter.

## **2.7 Análisis de comunidad microbiana**

Se analizaron los microorganismos responsables en cada fermentación mediante un perfil de microbioma, extrayendo ADN de cada sistema.

### **2.7.1 Extracción de ADN**

Se colocaron 200 mg de cada muestra en tubos ZR BashingBead y se adicionaron 750  $\mu\text{L}$  de la solución de lisis, más 20  $\mu\text{L}$  de MOCK ZymoBIOMICS™ Spike-in Control I (High Microbial Load), que es una comunidad de microorganismos con diversidad y concentración conocida (*Imtechella halotolerans*  $2 \times 10^7/20 \mu\text{L}$  y *Alobacillus halotolerans*  $2 \times 10^7/20 \mu\text{L}$ ), lo que permitió optimizar y validar los procesos con los resultados obtenidos en la extracción de ADN.

Se agitó en vórtex a máxima velocidad por 10 min. Se incubaron en hielo por 20 min y se centrifugaron a 11,400 x g por 1 min. Se transfirieron 400  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a Zymo-Spin IV Spin Filter colocado en tubo recolector y se centrifugó a 8,010 x g por 1 min. Se adicionaron 1,200  $\mu\text{L}$  de buffer ZymoBIOMICS DNA Binding al filtrado, se mezcló y se transfirieron 800  $\mu\text{L}$  de la mezcla del paso anterior a Zymo-Spin IIIC-Z Column en tubo recolector y se centrifugó a 10,040 x g por 1 min. Se descartó el filtrado y nuevamente se transfirieron 800  $\mu\text{L}$  de la mezcla del paso anterior a Zymo-Spin IIIC-Z Column y se centrifugó a 10,040 x g por 1 min. Se eliminó el fluido, posteriormente, se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de ZymoBIOMICS DNA wash Buffer 1 a Zymo-Spin IIIC-Z Column y se centrifugó a 10,040 x g por 1 min y se descartó el fluido. Se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de ZymoBIOMICS DNA wash Buffer 2 a Zymo-Spin IIIC-Z Column y se centrifugó a 10,040 x g por 1 min. Se descartó el fluido, seguido de la adición de 200  $\mu\text{L}$  de ZymoBIOMICS DNA wash Buffer 2 a Zymo-Spin IIIC-Z Column y se centrifugó a 10,000 x g por 1 min. Se transfirió Zymo-Spin IIIC-Z Column a un tubo de 1.5 mL y se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de ZymoBIOMICS DNasa/RNasa Free water a una temperatura de 60 °C directamente a la matriz de la columna y se incubó por 3 min. Se centrifugó a 10,040 x g por 1 min. Se adicionaron nuevamente 50  $\mu\text{L}$  de ZymoBIOMICS DNasa/RNasa Free water directamente a la matriz de la columna y se incubó por 3 min más. Se centrifugó a 10,040 x g por 1 min para eluir el ADN.

Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad de ADN extraído de las nueve muestras: para cada donante una muestra de materia fecal sin

procesar y seis muestras de fermentación con tratamientos inulina y AR3. Para realizar la secuenciación masiva por Illumina, fue necesario conocer la concentración de ADN total extraído por cada muestra, ya que es necesario 20 ng/ $\mu$ L de ADN para la secuenciación de amplicones ribosomales, en este caso, el gen ribosomal 16S.

### ***2.7.2 Secuenciación masiva***

Una vez extraído el ADN de las nueve muestras, se procedió a realizar la secuenciación masiva empleando la plataforma Illumina 250 x pb. Las regiones secuenciadas fueron V3-V4 (341F-806R) 16S rRNA para bacterias y del ITS1-2 (2024F-2409R) para eucariotes. Se realizó a través de los servicios genómicos Novogene. Posteriormente se realizó un análisis bioinformático mediante la edición y control de calidad de secuencias, ensamble y clasificación taxonómica empleando el conjunto de programas QIIME2 y la base de datos de genes ribosomales Silva 138 99% OTUs full-length sequences.

Finalmente, se compararon los resultados, analizando si la fermentación de los almidones presentaba una concentración competitiva de ácidos grasos comparada con la inulina (control positivo) y, además, la composición de la comunidad microbiana seleccionada por fermentación de las diferentes fuentes de carbono.

### **III. Resultados y discusión**

---

#### **3.1 Obtención de almidón retrogradado**

Se obtuvo el almidón retrogradado a partir del almidón nativo Hylon VII con 70% amilosa siguiendo el procedimiento descrito.

El proceso fue tomado de trabajos previos con una modificación en el tiempo de retrogradación, pues en este caso se dejó en refrigeración cinco días, mientras que en trabajos previos se reportan hasta siete días en almacenamiento a 4 °C. Sajilata et al. (2006) realizaron una revisión acerca del impacto de ciertas técnicas sobre el contenido final de almidón resistente cuando este polisacárido es manipulado. Los autores mencionan que en el AR3, cuando ocurre el proceso de retrogradación es importante tomar en cuenta el almacenamiento. Si es de interés incrementar el AR, entonces será conveniente mantener el almidón a temperaturas bajas, permaneciendo así por al menos dos días, aunque en su mayoría puede permanecer en almacenamiento a baja temperatura hasta siete días (Sajilata et al., 2006).

#### **3.2 Cuantificación de almidón resistente**

Siguiendo las instrucciones del Kit AOAC K-RAPRS 11/19 usado para la cuantificación, se obtuvo el 9% de almidón resistente tipo 2 en el almidón nativo Hylon VII, mientras que en el almidón retrogradado se obtuvo el 29% de almidón resistente tipo 3. Con respecto a estos datos, hay otros estudios que muestran una mayor cantidad de almidón resistente tanto en el almidón nativo como en el retrogradado. Un ejemplo es en el trabajo realizado por Giuberti et al. (2020), donde reportan 46.9% de almidón resistente en el almidón retrogradado alto en amilosa (Novelose 330), mientras que, en el almidón nativo alto en amilosa, el 55.1%.

Existen diferentes situaciones por las que se puede obtener mayor concentración de almidón resistente, pues según las técnicas de procesamiento realizadas se verá afectada la gelatinización, retrogradación y, por ende, el contenido final de almidón resistente. La extrusión en conjunto con enfriamiento puede conseguir mayor abundancia de AR, así como los tratamientos por calor, horneado, sancochado, radiación de microondas y la esterilización en autoclave, donde se ha observado que después de realizar varios ciclos de calentamiento y enfriamiento se puede lograr mayor cantidad de AR (Yadav et al., 2009). Por otro lado, el tiempo y el modo de enfriamiento donde ocurre y se promueve la retrogradación, también tendrá un efecto importante sobre la formación de almidón resistente, pues la amilosa y amilopectina se reorganizan en cierto periodo. Entre mayor sea el lapso de los geles en retrogradación durante el almacenamiento a una baja temperatura, mayor será el reacomodo de las cadenas poliméricas a formas semicristalinas (Park et al., 2009). Las cadenas de amilosa en forma de hélices se conjuntan, lo que incrementa la formación de almidón resistente.

Con respecto a la metodología seguida en este proyecto, se mantuvo el almidón retrogradado en refrigeración a 4 °C por cinco días, obteniéndose un 29% de AR, mientras que Pineda (2019) se reportó un 32.69% del AR3 alto en amilosa, con la diferencia de que se mantuvo en almacenamiento siete días a 20° C, después 2 h a 110° C y por último, 12 h a 40° C, por lo que, de acuerdo con lo reportado, es posible que el tiempo de retrogradación a diferentes temperaturas haya influido en la concentración de almidón resistente final (Pineda Cruz, 2019).

### **3.3 Digestión enzimática de AR3**

Después de tratar el AR3 con enzimas, se obtuvieron 5.31 g de almidón después del proceso digestivo simulado, tomando en cuenta que inicialmente se pesaron 10.05 g del almidón, esto equivale a un rendimiento del 52.83%. Además, se cuantificó el almidón resistente del almidón resultante de la digestión y se obtuvo un 56.84% en el almidón retrogradado.

En el trabajo realizado por Giuberti et al., en el 2020, donde se evaluaron distintos almidones resistentes en sistemas *in vitro*, la digestión de almidones retrogradados fue realizada bajo la misma metodología estandarizada, pero al final no se menciona una cuantificación posterior de almidón resistente, sino que pasan directamente a su evaluación en los sistemas de fermentación que ellos emplearon. Por otro lado, en la investigación de Erickson et al. (2018), donde también se buscó evaluar almidones resistentes en sistemas *in vitro*, se empleó método de predigestión por AOAC 991.43 y cuantificación de fibra total. Se utilizaron tres enzimas: amilasa, proteasa y amiloglucosidasa. Sin embargo, los tiempos de retención que simula cada fase fueron menores (30 min), las temperaturas superaron los 37 °C y las concentraciones de las enzimas superaron las condiciones corporales. No se menciona la concentración de almidón resistente resultante después de esta digestión.

En el presente trabajo de estudio, después de la simulación de la digestión desde la boca hasta el intestino delgado, se observó que al final no todo el almidón era resistente después de cuantificar la fracción con el kit Megazyme K-RAPRS 11/19. Sin embargo, la implicación que tiene el colocar un almidón compuesto por una fracción fácilmente digerible y una fracción resistente, tendrá un impacto importante en el sistema de fermentación. Es muy probable que la comunidad microbiana seleccione el almidón digerible como primera opción para ser consumido. Posteriormente continuará con el almidón resistente. Los resultados del análisis de AGCC y de la diversidad en la comunidad microbiana se verán influenciados por ambas fracciones del almidón y no sólo por la parte resistente.

Si bien una simulación *in vitro* tendrá desventaja con respecto a un sistema *in vivo* por la complejidad de fluidos de cada zona así como las células y microorganismos que están presentes y los metabolitos que producen, la metodología seleccionada para llevar a cabo este proceso se describe como un estándar adecuado para simular la digestión de cualquier alimento, el cual ha sido consensuado internacionalmente por 200 científicos que trabajan en proyectos relacionados a la digestión. Cabe señalar que el proceso ha tenido pequeñas mejoras desde su publicación en el 2014.

### 3.4 Estandarización del sistema de fermentación

El sistema está compuesto de un frasco ámbar de 100 mL, con un dispositivo de monitoreo de pH, agitación magnética, tapón de goma con tres orificios de 4 mL de diámetro y uno central de 9 mm de diámetro, manguera de silicón y jeringas de 3 y 5 mL (Figura 5).

El sistema permitió llevar a cabo la fermentación en condiciones anaeróbicas. Además, se adecuó una incubadora con un control automático para mantener la temperatura constante a 37 °C (Figura 4). Un foco se acondicionó con el objetivo de elevar la temperatura en el interior cuando se requiriera, o se apagara si se había alcanzado el calor suficiente. También se adecuó un extractor que permitió la salida de aire.

De acuerdo con lo reportado en estudios anteriores, cuando es de interés analizar la función del sistema gastrointestinal, es preferible hacerlo a través de un sistema continuo. Sin embargo, los resultados obtenidos con un sistema por lote son aceptables, es decir, representando sólo la zona de análisis, con las condiciones adecuadas: temperatura de 37 °C, ausencia de oxígeno, pH 5.8-6.0 (Barroso et al., 2015).

La estandarización consistió en pruebas realizadas con levadura para panificación y azúcar convencional como fuente de carbono, permitiendo el ajuste de pH, el mantenimiento de temperatura y agitación.



*Figura 5. Sistema de fermentación que simuló el colon*



*Figura 4. Incubadora que mantuvo el sistema a 37° C*

## **3.5 Fermentación**

### **3.5.1 Registro de ingesta de alimentos**

Previo al proceso de fermentación, se acordó con los participantes donadores el comienzo de su registro de alimentos, así como la condiciones para la recolección de las muestras. Además, se realizaron pruebas coprológicas y coproparasitoscópicas para descartar la presencia de microorganismos patógenos y evitar posibles contagios al momento de su manipulación.

Cada uno de los participantes registró su dieta durante 21 días consecutivos, donde la descripción fue lo más detallada posible en cuanto a las porciones de alimentos y bebidas consumidos. Una vez realizado el registro, se procedió a la recolección de muestras en un frasco estéril cerrado herméticamente, y se entregaron de forma inmediata para su procesamiento en laboratorio. El registro que se realizó permitió conocer hábitos alimenticios de cada participante y aunque no llevaron una dieta designada, el efecto que tiene el tipo y cantidad de proteínas, carbohidratos y grasas presentes en los alimentos que consumen, tienen un efecto importante sobre la composición de la microbiota y también los metabolitos resultantes.

Los alimentos registrados por cada participante fueron clasificados en alimentos de origen animal, frutas, verduras, cereales, grasas y botanas/golosinas. También se realizó una clasificación de las bebidas: agua natural, agua azucarada, bebidas procesadas, café y leche.

En la Tabla 2 se muestra la descripción de cada participante y en la Figura 6 se muestra un gráfico comparativo de los alimentos como bebidas registradas por los tres participantes.



Tabla 2. Características de los donantes de materia fecal.

Parámetro	Donador 1	Donador 2	Donador 3
Género	Masculino	Masculino	Femenino
Edad	30 años	22 años	22 años
Peso	71 kg	76.5 kg	66 kg
Estatura	1.76 m	1.70 m	1.58 m
Índice de masa corporal	22.9 (normal)	23.9 (normal)	26.4 (sobrepeso)

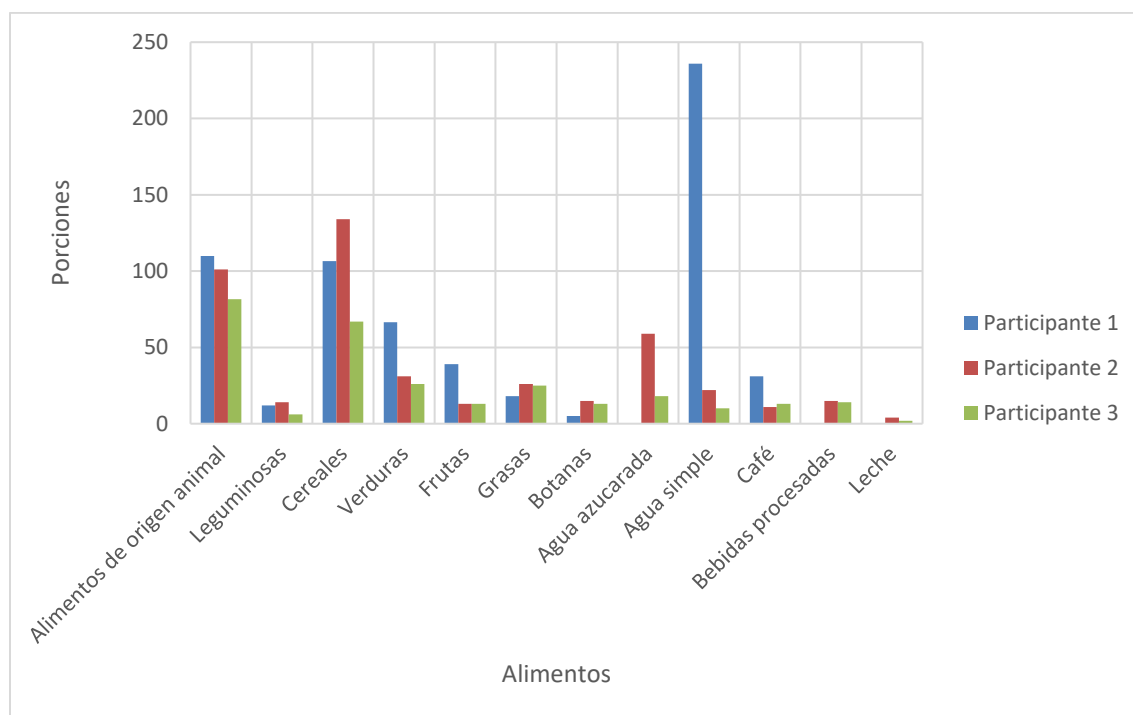


Figura 6. Registro de alimentos y bebidas de los tres participantes.

La dieta habitual juega un papel importante en la composición del microbioma intestinal, así como en los productos generados del aprovechamiento de los alimentos por parte de estos microorganismos. De acuerdo con Wu et al. (2011), el enterotipo *Bacteroides* se relaciona con una alimentación alta en proteínas y grasas, mientras que *Prevotella* se asocia con una dieta alta en carbohidratos.

Una alimentación basada en verduras y almidones incrementa los grupos *Firmicutes*, *Xylanibacter*, *Bacteroidetes* y *Prevotella* (De Filippo et al., 2010). Específicamente, hablando

de frutas y verduras, algunos *Firmicutes* como *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* y *Eubacterium rectale* se ven incrementados cuando se consumen estas fuentes de fibra. Por otro lado, una dieta basada en grasas impulsa el desarrollo del *phylum Proteobacteria* y promueve el desarrollo de *Firmicutes* con respecto a los *Bacteroidetes*, en especial los de orden *Erysipelotrichales* y *Clostridiales* (*Firmicutes*). También se promueve el crecimiento de la familia *Micrococcaceae* del *phylum Actinobacteria*, mientras que las familias *Prevotellaceae* y *Rikenellaceae* (pertenecientes a *Bacteroidetes*) disminuyen. Cuando la dieta está conformada principalmente por azúcares, aumentan los microorganismos de orden *Clostridia* (familia *Laachnospiraceae* y *Ruminococcaceae*) mientras que los *Bacteroidetes* se ven disminuidos, principalmente *Prevotella*; los géneros *Sutterella* y *Bilophila* del *phylum Proteobacteria* también se ven potenciados cuando hay un elevado consumo de azúcar en la dieta (Sen et al., 2017). En el caso del consumo de una dieta alta en proteínas, se ha observado un aumento en la abundancia de *Arkenmansia* spp., que pertenece al *phylum Verrucomicrobia* y puede tener un efecto benéfico sobre la obesidad y la diabetes gracias a su producción de acetato y propionato, además de la activación de señalizaciones (Wang et al., 2017).

Cabe señalar que la microbiota del intestino de cada individuo es única, pues existen diversos factores tanto endógenos como exógenos que impactan sobre los microorganismos que allí habitan desde el nacimiento hasta la vejez, manteniéndose estable como una especie de “huella digital” (Jandhyala et al., 2015). Aun cuando ocurren cambios bruscos en la forma de vida o alimentación, los taxones clave permanecen y la microbiota vuelve a su estado normal en un lapso de tiempo corto.

Dado que la microbiota se ve modificada incluso 24 h después de un cambio brusco en la dieta, en este trabajo se evaluó si efectivamente las fuentes de fibra inulina y almidón retrogradado fomentan la abundancia de microorganismos benéficos una vez caracterizada la comunidad microbiana en el estudio *in vitro*.

### 3.5.2 Fermentación de fibras con inóculo fecal

En la Figura 7 se muestran los sistemas de fermentación *in vitro* de cada tratamiento para cada participante, de acuerdo con las especificaciones mencionadas en la metodología.



*Figura 7. Sistema de fermentación utilizado para cada participante*

## 3.6 Análisis de ácidos grasos de cadena corta

### 3.6.1 Extracción de AGCC

Por su estructura, los ácidos grasos de cadena corta (menos de seis carbonos) son más volátiles que los ácidos grasos de cadena larga, por lo que su extracción debe ser cuidadosa cuando se analizan.

En este proyecto la extracción se basó en la metodología de De Baere et al. (2013), donde se realizó una extracción líquido-líquido (ácido-base) (De Baere et al., 2013). Los AGCC son parcialmente hidrófilos y por esta razón deben ser protonizados para que sean hidrófobos y puedan ser extraídos con un solvente orgánico. En esta metodología se utilizó HCl concentrado que se adicionó inicialmente a la muestra para acidificarla y posteriormente se agregó éter dietílico para la extracción de la fase acuosa hasta la orgánica. Se centrifugó

para retirar la mayor cantidad de impurezas y el sedimento. Después, se adicionó NaOH, que provee de carga a los AGCC y luego de una nueva centrifugación, los AGCC pasaron a fase acuosa, de donde se recuperó la mayor cantidad de muestra posible y se adicionó HCl para regresar a su estado ácido.

Se ha descrito que el uso de ácidos y bases para la extracción de AGCC purifica mejor la muestra en comparación con otras metodologías; sin embargo, tiene algunas desventajas, como el tiempo de procesamiento de muestra, posible pérdida de ácidos grasos, así como la exposición a reactivos peligrosos, tanto ácidos y bases, como los solventes orgánicos (Zhang et al., 2013).

### **3.6.2 Cuantificación de AGCC por CG-MS**

Después de cuantificar los AGCC a través de la cinética en cada fermentación (0, 4, 8, 12 y 24 h), se obtuvieron 45 resultados, uno por cada muestra. En cada participante hubo un total de 15 muestras: 5 de la fermentación con inulina, 5 con AR3 y 5 más de la fermentación de materia fecal sin fibra. Se realizó un monitoreo de pH y se observó que la mayor variación ocurrió entre las 4 y las 12 h, con un pH mínimo registrado de 4.9.

Los resultados de la cuantificación de AGCC fueron muy variables entre los tres participantes, no sólo entre cada ácido, sino también en la cinética de su producción durante las fermentaciones de fibras, por lo que se optó por promediar las concentraciones del ácido acético, propiónico y butírico de cada participante, y a su vez se conjuntaron y se promediaron los resultados finales de los tres donantes por tipo de ácido en su producción total en la fermentación de cada sustrato, así como el control negativo, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 8.

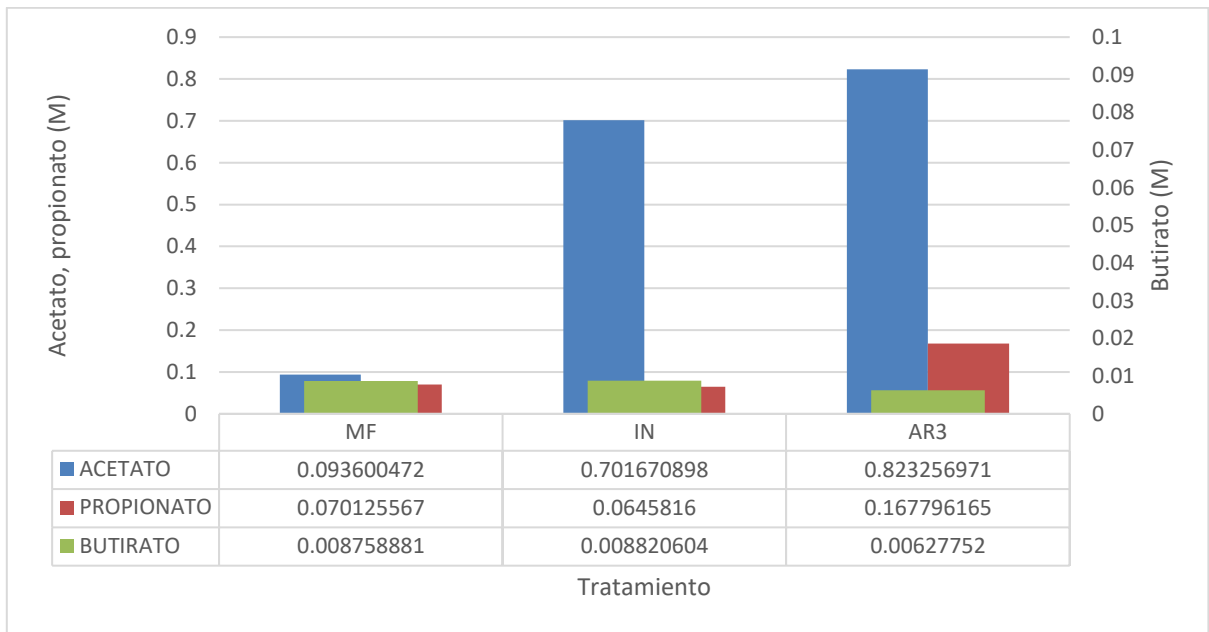


Figura 8. Promedio de AGCC entre los tres participantes. El eje secundario muestra la escala para la concentración del butirato.

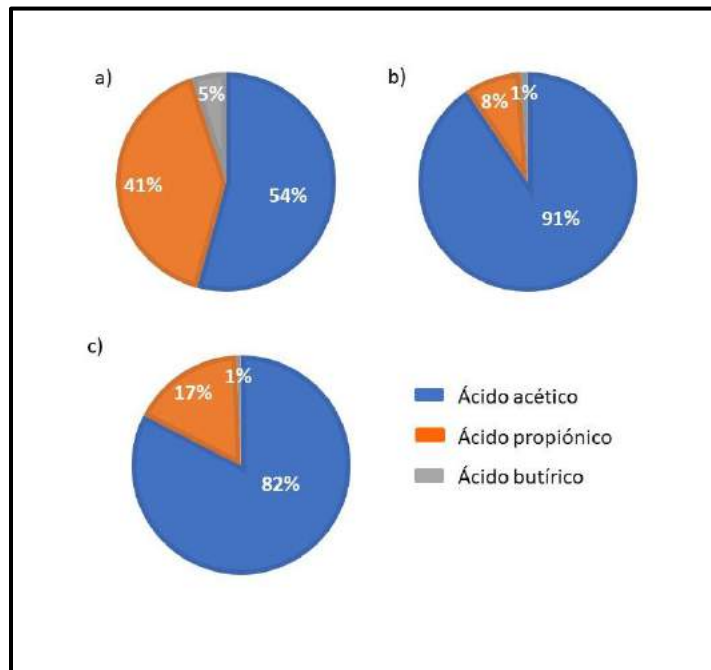


Figura 9. Relación entre los AGCC de acuerdo con los tratamientos. a) Fermentación sin fibra, sólo inóculo de Materia Fecal en el medio. b) Fermentación con Inulina. c) Fermentación con AR3.

Las relaciones que se mantuvieron entre los AGGC de acuerdo con cada tratamiento y con los promedios obtenidos, se presentan en la Figura 9.

De forma global no se observó la proporción 60:20:20 de acetato, propionato y butirato teórica mencionada en diversos estudios, siendo el butirato el que registró una menor abundancia en los tres casos de experimentación. Para la fermentación con AR3, el porcentaje de butirato fue del 1% al igual que la fermentación con inulina, a diferencia de la fermentación sin fibra, donde la proporción fue mayor, lo que muestra un efecto sobre la síntesis de este ácido graso a partir de la inulina y el almidón retrogradado como fuente principal de carbono para el inóculo. Existen estudios que mencionan un aumento de AGCC después del consumo de inulina y almidones resistentes, ya que ciertos microorganismos pueden degradar parcial o totalmente las estructuras complejas y hacerlas disponibles a productores tanto de propionato como butirato. El butirato es el ácido graso más estudiado entre los tres principales, debido a que en diferentes estudios se ha observado un incremento en éste después del consumo de almidón resistente. Sin embargo, deben existir varias condiciones para que ocurra: degradadores de AR, productores de butirato (de forma directa o a través de acetato-lactato) y una fuente adecuada de fibra. En un estudio *in vitro* se observó el efecto de 13 condiciones de tratamiento (ocho de ellas, almidones resistentes) sobre inóculos fecales de 10 personas, entre los que se destacó el AR3 obtenido de papa molida y otro AR3 con una extracción desde la papa. En ambas fuentes, se cuantificó un 20% de almidón resistente, pero se observó un efecto diferente sobre los inóculos fecales de cada participante. Aunque el almidón provenía de la misma fuente botánica, además de presentar la misma fracción de almidón resistente en ambos, el efecto sobre los microorganismos fue diferente, incluso en los degradadores *B. adolescentis* y *R. bromii*, y productores de butirato como *F. prausnitzii*, pues no en todas las muestras se vieron incrementados después de las fermentaciones. En este estudio se concluyó que el microbioma inicial tiene un importante efecto en el aprovechamiento de almidones resistentes, generación de AGCC y cambios en la composición del microbioma (Teichmann & Cockburn, 2021). Relacionando estos resultados con el proyecto trabajado, tampoco se

observó un incremento en el género *Faecalibacterium*, principales productores de butirato, aunque sí se observó un incremento con el género *Bifidobacterium*, asociado a la producción de acetato. Más adelante se abordarán estos resultados.

En un proyecto realizado *in vitro* con inóculo fecal de personas obesas y con tratamientos de la inulina y almidones resistentes obtenidos de arroz sin simular la digestión desde zona oral hasta intestinal, se observó un incremento de los tres AGCC principales hasta finalizar la fermentación, aunque la producción fue más rápida durante las primeras 12 h y después se mantuvo estable, lo cual se relacionó con cambios de pH en el medio. En comparación con la inulina, el almidón resistente de arroz tuvo una mayor producción de butirato al final de la fermentación hasta del 67% mayor, además de asemejar la relación proporcional entre los tres ácidos (Tao Li et al., 2021).

Continuando con los resultados de este proyecto de investigación con AR3 e inulina, se observó una disminución en el propionato en las fermentaciones con ambos tratamientos, pero el acetato se vio potenciado al tener esta fuente principal de carbono. Se sabe que las fibras tienen un efecto bifidogénico en el intestino, es decir, favorecen el desarrollo de bacterias como el género *Bifidobacterium*, que puede producir lactato y acetato a partir de la degradación de carbohidratos complejos (Lyte et al., 2016). La alta concentración de acetato en comparación con los otros AGCC puede tener impacto adverso sobre la salud de las personas, pues se ha demostrado que el acetato participa en la síntesis de lípidos, por lo que se le ha relacionado con la obesidad (Huang et al., 2018). Además, se sabe que potencia el crecimiento tumoral en casos de cáncer (Kamphorst et al., 2014). Sin embargo, también se le ha relacionado con la pérdida de apetito debido a su interacción con el sistema nervioso central y el hipotálamo que inhibe la ingesta de alimentos. En cuanto a la producción de propionato, se ve potenciado principalmente por la fermentación de AR3 en comparación con la inulina y la muestra sin tratamiento, como se observa en la Figura 8. Como se mencionó en párrafos anteriores, la producción de acetato a partir de la fermentación de fibras se ha relacionado con el género *Bifidobacterium* es uno de los

mayores productores de este ácido, que además genera lactato, precursor del propionato, pues es una de las tres vías por las que se sintetiza. El lactato es aprovechado por microorganismos de las familias *Veilonellaceae* y *Lachnospiraceae*, además de *Clostridium propionicum*, aunque también se ha observado la producción de este ácido graso a partir de especies de *Bifidobacterium*, como *B. bifidum*, *B. lactis*, *B. infantis* y *B. longum* en sistemas *in vitro* con salep (raíz de origen turco) como sustrato (Usta-Gorgun & Yilmaz-Ersan, 2020).

Entre las diferentes variables que pueden tener un efecto sobre la cuantificación de AGCC, se encuentran tanto el tipo de sustrato como la comunidad microbiana, además de las condiciones en los sistemas de estudio. Al tener muestras de tres personas con características particulares, los resultados también serán muy variables entre cada uno, por lo que, al reunir la información de los donadores, da pie a que no se obedezca la relación 60:20:20 que se ha establecido teóricamente en varios estudios, ya que, dependiendo de cómo cambia la abundancia de ciertos microorganismos a través del tiempo en el medio establecido, algunas bacterias se verán favorecidas por cambios como pH, agitación, atmósfera, aprovechamiento de sustratos, mientras que otras se verán disminuidas. Tal es el caso de algunos *Firmicutes* productores de butirato y propionato, que al aumentar el pH baja su abundancia en comparación con el pH más ácido, mientras que los microorganismos productores de acetato se ven potenciados (Walker et al., 2005).

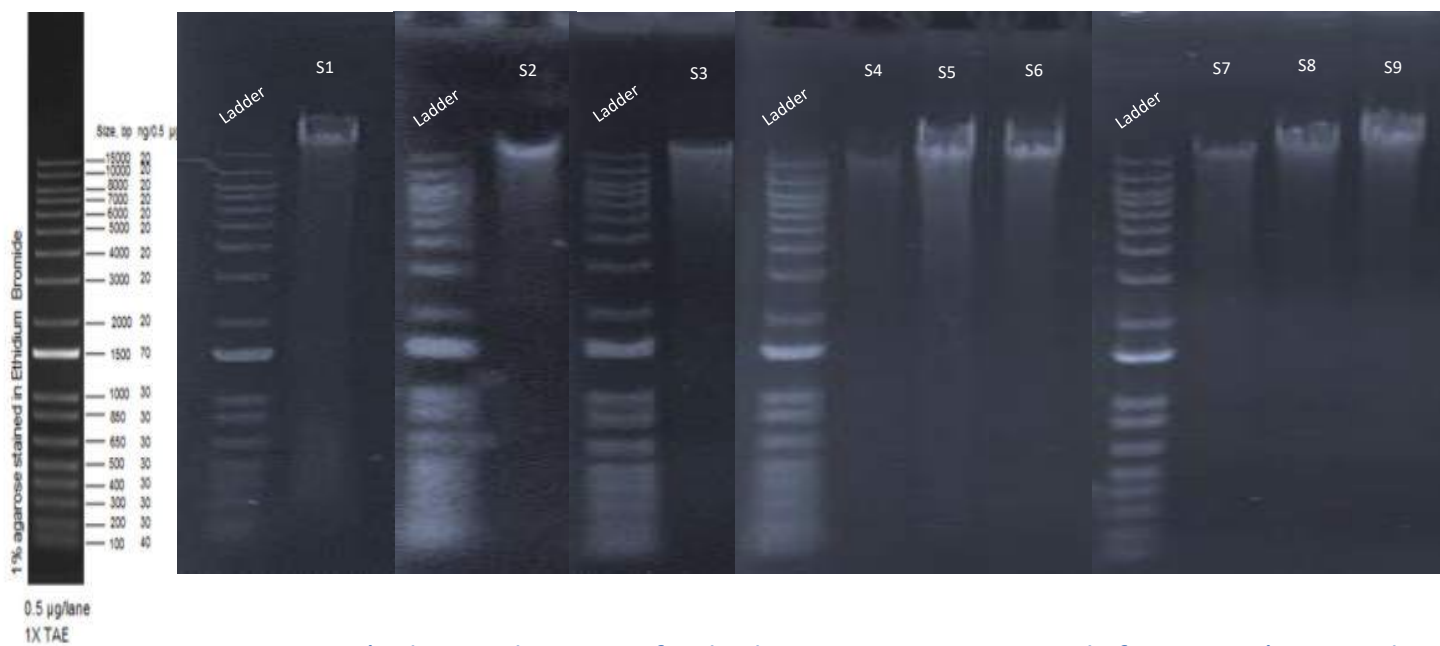
### **3.7 Extracción de ADN y análisis de comunidad microbiana**

Para la extracción de ADN desde las muestras antes y después de la fermentación se utilizó el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep. Después de realizar la electroforesis en gel de agarosa al 1%, se observó ADN de alto peso molecular mayor a 15000 pb en todos los casos como se aprecia en la Figura 10 y, aunque se presentó cierta fracción degradada (barrido debajo de la banda), la secuenciación no se vio comprometida, pues hubo una concentración suficiente para la identificación de taxones. Por otro lado, se apreció una menor cantidad



de ADN en las muestras que correspondían a la materia fecal sin tratamiento, mientras que en los tratamientos después de la fermentación hubo una mayor abundancia (bandas más intensas). De acuerdo con este resultado, se infiere que las fibras fungieron como fuente de alimento para los microorganismos durante la fermentación, lo cual nos lleva a un cambio en la composición de la microbiota. En la Tabla 3 se muestra la identificación de las muestras de acuerdo con los códigos presentados en la Figura 10. La S y F hacen referencia a Sample y Fermentación, respectivamente.

También, se muestra el reporte de calidad de las secuencias obtenidas por la plataforma Illumina. El indicador principal de calidad es el promedio de la calidad en la identificación de las bases después de que las muestras son secuenciadas, expresando este puntaje en valores de la escala Phred 33. Los porcentajes Q20 y Q30 fueron altos, lo que indica que las secuencias obtenidas son confiables para la asignación de taxones en el posterior análisis bioinformático (Tabla 4), es decir, que es confiable la identificación de microorganismos.



*Figura 10. Extracción de ADN de materia fecal y de muestras posteriores a la fermentación con cada tratamiento.*

*Tabla 3. Identificación de muestras*

<b>Donador</b>	<b>Muestra</b>	<b>Fermentación</b>
1	S1MFF1	Materia fecal
	S2INF1	Inulina
	S3ARF1	AR3
2	S4MFF2	Materia fecal
	S5INF2	Inulina
	S6ARF2	AR3
3	S7MFF3	Materia fecal
	S8INF3	Inulina
	S9ARF3	AR3

*Tabla 4. Reporte de calidad de secuencias en procariotes.*

<b>Muestra</b>	<b>NovoID</b>	<b>Lecturas crudas</b>	<b>Lecturas limpias</b>	<b>Error (%)</b>	<b>Q20 (%)</b>	<b>Q30(%)</b>
S2INF1	FKDN210178192-1A	135372	135231	0.03	96.87	91.53
S8INF3	FKDN210178198-1A	154818	154587	0.03	96.89	91.63
S5INF2	FKDN210178195-1A	142995	142610	0.03	96.73	91.29
S1MFF1	FKDN210178191-1A	165065	164825	0.03	96.85	91.61
S3ARF1	FKDN210178193-1A	143915	143832	0.03	96.87	91.58
S7MFF3	FKDN210178197-1A	151648	151406	0.03	96.81	91.51
S4MFF2	FKDN210178194-1A	133426	133061	0.03	96.83	91.57
S9ARF3	FKDN210178199-1A	148410	148120	0.03	96.85	91.59
S6ARF2	FKDN210178196-1A	161027	160965	0.03	96.62	91.11

En la Tabla 5, se observa la concentración de ADN en ng/ $\mu$ L cuantificada por espectrofotometría, la cual superó lo necesario para su análisis, es decir, el método de extracción permitió una concentración de ADN abundante. También, fue indispensable conocer la pureza y a su vez, calidad del ADN extraído y para ello se evaluó el cociente entre las longitudes de onda en absorbancias de 260 y 280. Un resultado de 1.8 - 2.0 indica un ADN de buena calidad, mientras que valores inferiores indican posible contaminación. En este caso, se observan valores inferiores a 1.8 en todas las muestras; sin embargo, un factor

que posiblemente pudo impactar sobre estos resultados fue el equipo empleado, ya que es preferente usar nanodrop cuando se trata de cuantificación de ADN, pero en este caso se empleó un espectrofotómetro DLAB SP-UV1100.

Previo a la secuenciación masiva, también se realizaron nuevos análisis de concentración y calidad, donde todas las muestras pasaron los filtros.

*Tabla 5. Concentración de ADN extraído y cociente de las longitudes de onda registradas en las absorbancias 260/280.*

Donador	Tipo de muestra	Concentración de ADN (ng/μL)	A260/A280
1	Inulina	312.5	0.89
	AR3	737.5	0.97
	Materia fecal	962.5	1.01
2	Inulina	1037.5	1.01
	AR3	550	1.02
	Materia fecal	512.5	1.02
3	Inulina	525	1.07
	AR3	675	1.26
	Materia fecal	437.5	1.03

Además de la secuenciación para bacterias, también se intentó realizar la secuenciación para hongos a través del ITS2. Sin embargo, no fue posible, ya que no se encontraba cantidad suficiente de ADN para conocer las unidades taxonómicas de estos eucariotas, pues sólo se obtuvo información de un participante, por lo que los resultados basados en las fibras no serían concluyentes. Sin embargo, se incluyen resultados del análisis bioinformático de la muestra del participante 3 que sí amplificó para ITS2 con y sin fibras en el Anexo 4.

### 3.7.1 Análisis bioinformático con QIIME2

Una vez que las nueve muestras fueron secuenciadas por Illumina MiSeq 250 PE, se procedió a realizar el análisis bioinformático a través de la plataforma de QIIME2 con la

versión 2021.4, el cual es utilizado para analizar secuencias de ADN sin procesar, provenientes de microbiomas complejos.

En la Figura 11 se muestra el diagrama de trabajo empleado para el análisis bioinformático en QIIME2 (Bolyen et al., 2019), mientras que el *pipeline* (lenguaje informático) empleado se detalla en el Anexo 3.

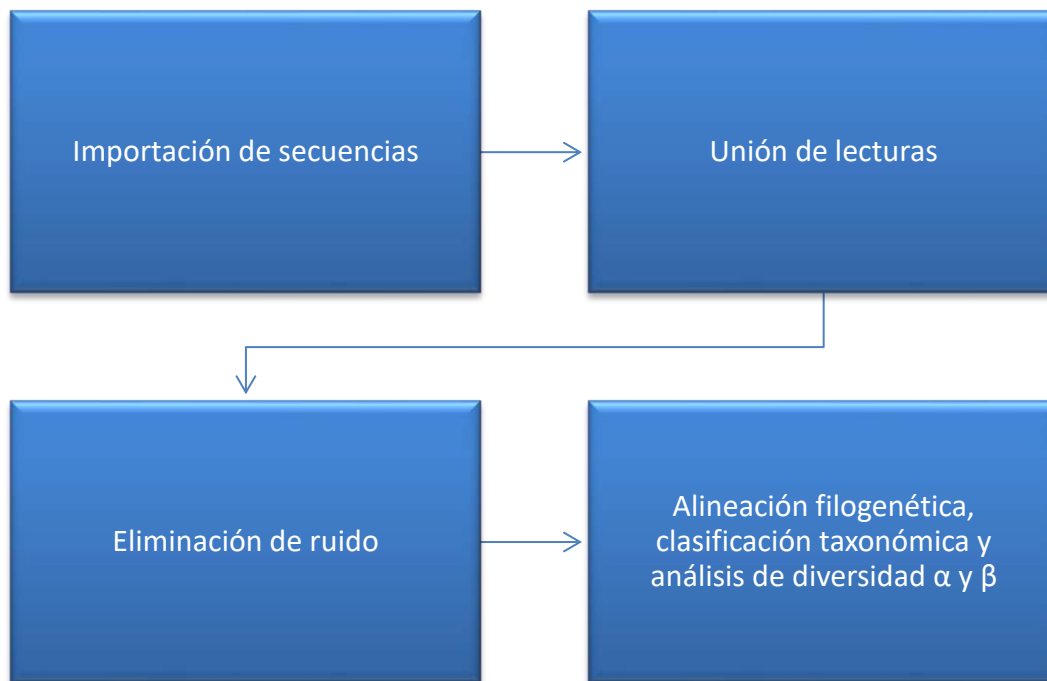
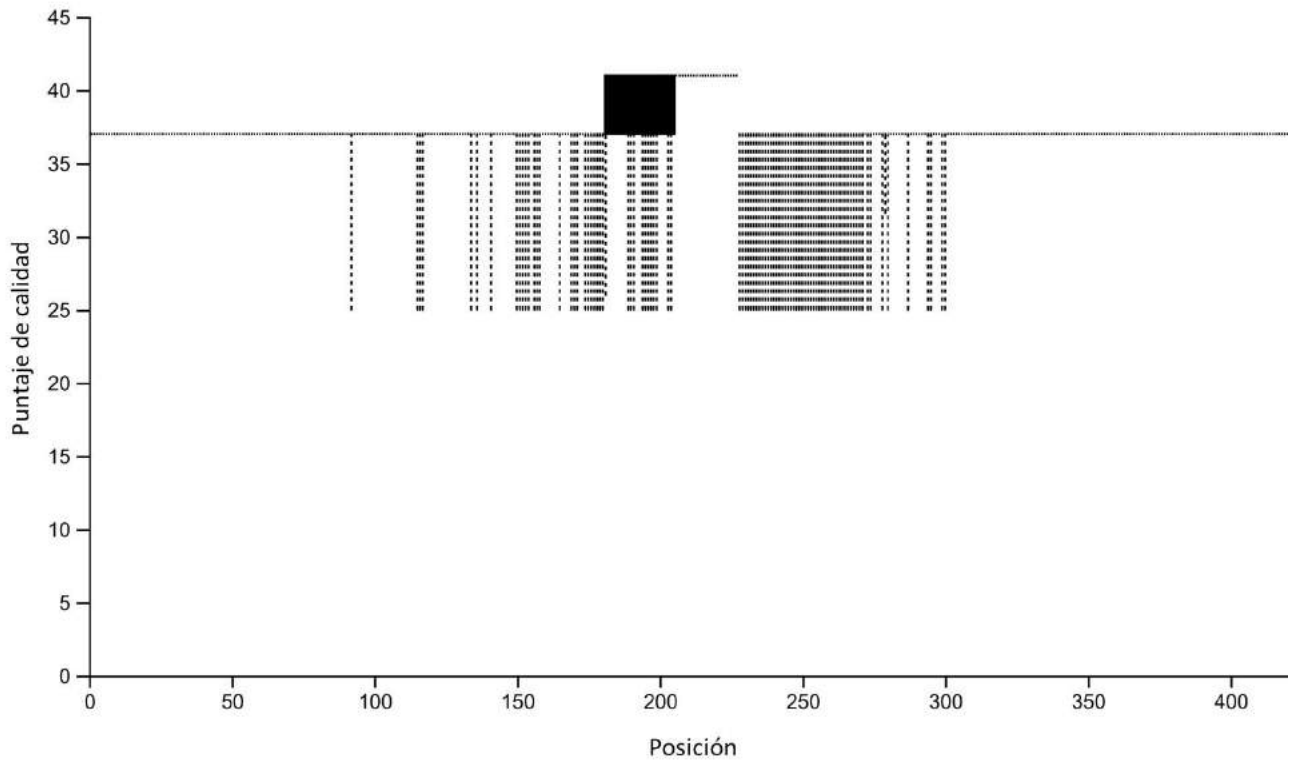


Figura 11. Flujo de trabajo en QIIME2 para análisis bioinformático.

Las secuencias fueron importadas en formato FASTQ, para después continuar con la fusión de las lecturas *forward* y *reverse*, pasando por alto el paso de demultiplexación, ya que las secuencias estaban ubicadas previamente con la muestra correspondiente, es decir, las secuencias ya estaban identificadas de acuerdo con la muestra de procedencia, por lo que no fue necesario realizar este proceso.

Una vez que las lecturas se fusionaron, se realizó un filtrado para la eliminar aquellas que no cumplieran con la calidad requerida (superior a 20, de acuerdo con el Q-score),

obteniendo el resultado mostrado en la Figura 12. Todas las lecturas tienen una calidad mayor a 25 del PHRED score, por lo que son convenientes para utilizarse en el resto del análisis.



*Figura 12. Filtrado de calidad después de la fusión de lecturas demultiplexadas.*

Para generar la tabla de características se utilizó el q2 feature-table (Bokulich et al., 2013; McDonald et al., 2012), es decir, la clasificación de las secuencias en características, que son posibles Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU, por sus siglas en inglés). Se realizó un filtrado de calidad, la eliminación de ruido y la eliminación de quimeras a través de q2 Deblur 16S (Amir et al., 2017), que descartó todas las lecturas que no presentaron al menos el 60% de similitud de identidad con las secuencias que se encuentran en la base de datos de GreenGenes 85% OTU, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 6 al generar agrupaciones de secuencias. Las características son las posibles OTU's en las muestras.

Tabla 6. Tabla de características después del filtrado con Deblur denoise 16S.

Resumen de datos obtenidos

<b>Número de muestras</b>	9
<b>Número de características</b>	508
<b>Frecuencia total</b>	424,644

Además, una frecuencia media de estas características por muestra de 46,794 y una selección de profundidad de muestreo máxima de 46,635 con el 86.12% de las características retenidas, sin pérdida de muestras, información que proporciona la identificación de taxones de cada sistema de experimentación.

Después de encontrar las características de todas las muestras, fue necesario conocer cómo se relacionaban entre sí y cuál era la similitud entre ellas a través de un árbol filogenético. Esto se obtuvo con q2 phylogeny, utilizando el programa mafft (Kato & Standley, 2013) que realiza una alineación de secuencia múltiple de las secuencias que se encuentran en las muestras. El resultado es filtrado eliminando posiciones que son altamente variables, ya que pueden ocasionar ruido en el árbol filogenético final, que es construido con el programa FastTree (Price et al., 2010). Dicha construcción no tiene raíz, pero en el último paso de la sintaxis en el *pipeline*, se coloca una en el punto medio del árbol. No fue necesario visualizar el árbol filogenético para continuar con el proyecto, ya que para fines de este estudio, no se requiere conocer las relaciones e historial taxonómico entre microorganismos.

Estos datos fueron de indispensable conocimiento para continuar con el análisis taxonómico, es decir, el filtrado de calidad realizado permite asignar nombres a los taxones encontrados.

### 3.7.2 Análisis taxonómico

Para realizar la clasificación taxonómica de las OTU's encontradas, se utilizó el clasificador de características classify-sklearn (Pedregosa et al., 2011) en contraste con las secuencias de la plataforma de referencia de alineación SILVA en su versión 138 (129063 bacterias, 2846 arqueas y 14887 secuencias de microorganismos eucariotes referenciados) y, con esta información, se obtuvo el análisis taxonómico de cada muestra (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014).

En la Figura 13 se muestra el gráfico de barras que representa los dominios en los cuales se clasificaron los taxones secuenciados en las muestras.

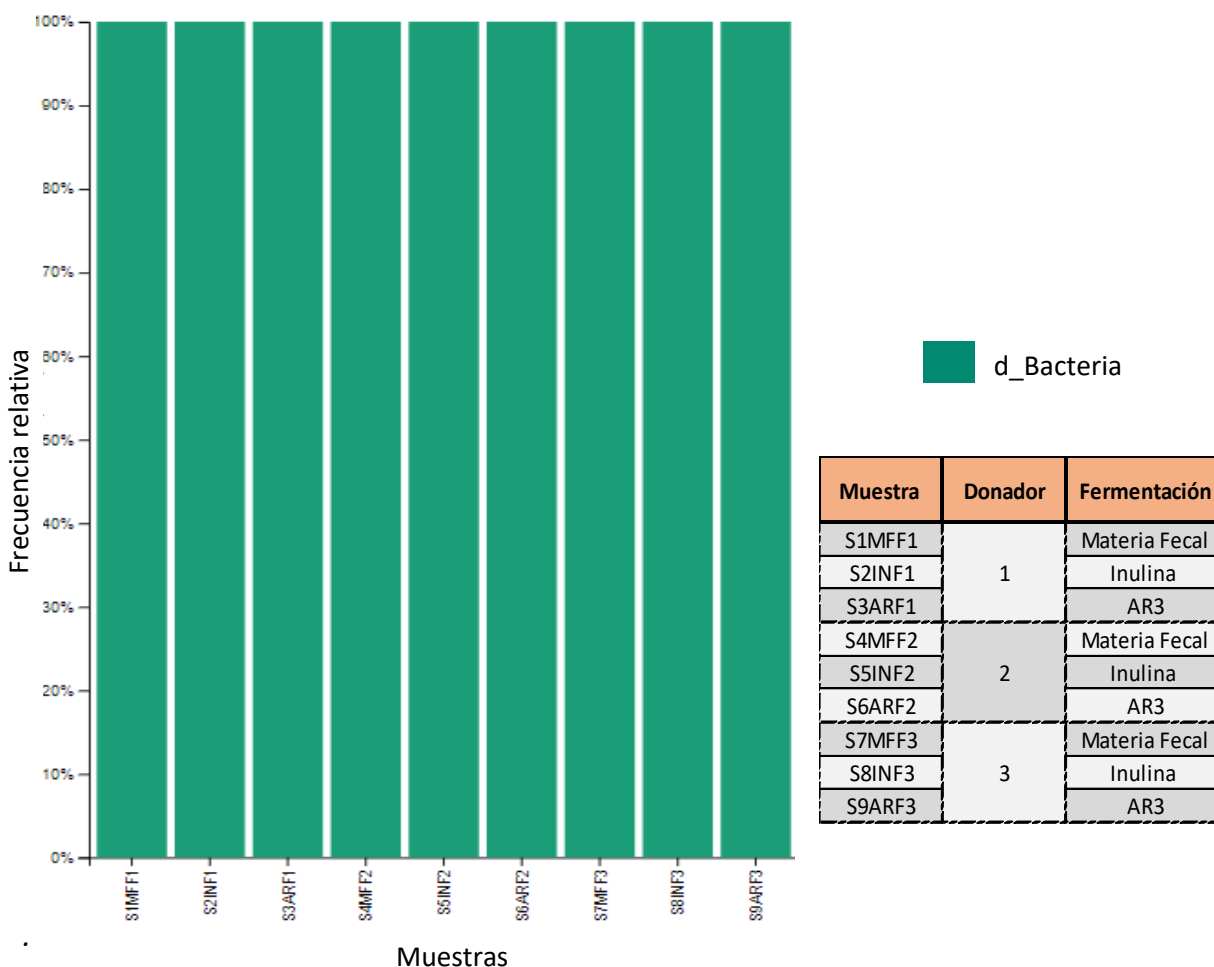


Figura 13. Taxonomía de muestras por dominio.

Como se observa en la Figura 13, el total de los microorganismos que se presentan en las muestras está conformado por bacterias, esto después de realizar el filtrado de las secuencias en QIIME2. Es posible que entre las secuencias también se identificaran arqueas porque presentan el marcador ribosomal 16S, sin embargo, al ser menos abundantes que las bacterias y después del filtrado, es probable que estos microorganismos hayan sido eliminados. Las arqueas, en conjunto con las bacterias y eucariotas, son otro de los dominios de microorganismos que habitan en el colon. Investigaciones describen que las arqueas, principalmente *Methanobrevibacter smithii* tiene la función de metabolizar los productos que se obtienen de las fermentaciones, incluyendo los AGCC, alcoholes, CO<sub>2</sub> y sobre todo, H<sub>2</sub>, por lo que esta arquea se ve potenciada cuando hay un alto consumo de fibra en la dieta habitual (Chassard & Bernalier-Donadille, 2005; Dridi et al., 2009), aunque en este proyecto no se presentó después de los tratamientos. Un estudio más reciente muestra que *Methanobrevibacter smithii* juega un papel importante incluso a nivel de nutrición, pues se observó que, en un grupo de niños con condición de desnutrición severa, *M. smithii* disminuyó significativamente en comparación con un grupo control de niños nutridos. También se observó que resulta complicado incrementar la abundancia de esta arquea cuando se intenta reajustar la alimentación lo que, en el futuro, puede llevar a la inhibición de funciones de microorganismos relacionados con la fermentación de fibras, producción de AGCC y la misma digestión de alimentos. Una posible forma de enriquecer la microbiota intestinal con esta arquea es a través del consumo de lácteos orgánicos o como probiótico, pero hacen falta estudios para comprobar su efectividad (Camara et al., 2021).

En la Figura 14 se presenta la clasificación taxonómica a nivel de *phylum* en cada muestra. Debido a la variabilidad entre los resultados de cada participante, así como sus características, se optó por evaluar el comportamiento de microorganismos de acuerdo con los tratamientos evaluados: fermentación de inulina, AR3 y control negativo.



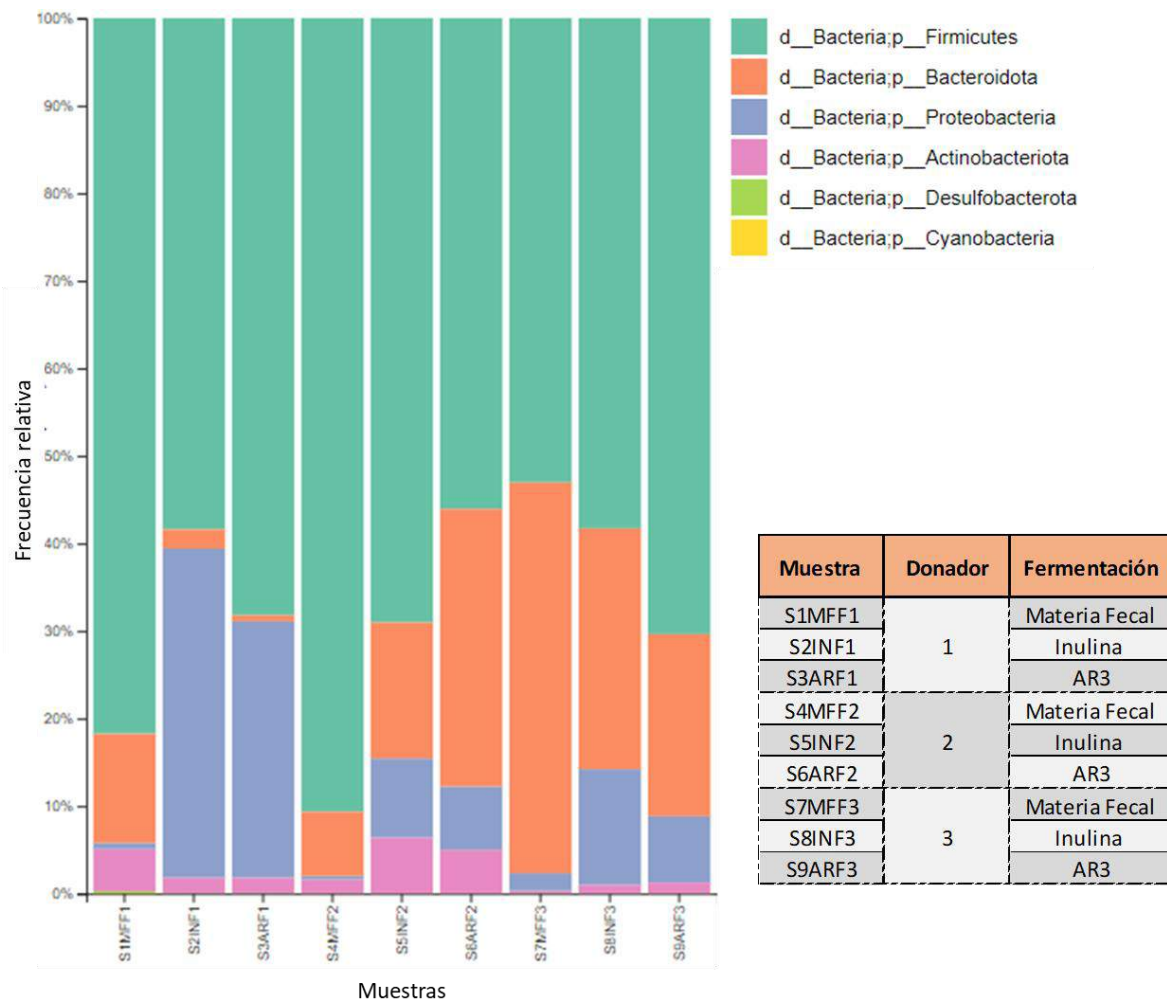


Figura 14. Clasificación taxonómica por phylum bacteriano.

En la Figura 14 se observan los principales *phyla* que conforman el microbioma del colon: en mayor abundancia se encuentran los *Firmicutes*, después los *Bacteroidetes*, seguido de *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y, en la muestra fecal del participante 1, también se identificaron los *phyla* *Desulfobacteria* y *Cyanobacteria*. Se aprecia que el *phylum* *Proteobacteria* incrementó en presencia de Inulina y AR3 en los tres participantes, mientras que los demás *phyla* no mostraron un comportamiento general. Si bien, en diversos estudios se ha constatado la relevancia que tiene la proporción del *phylum* *Firmicutes* con respecto a *Bacteroidetes* como un indicador de obesidad (Bervoets et al., 2013; P. Xu et al., 2012), también se ha demostrado que esto no se cumple en todos los casos (Schwiertz et al.,

2010) como ocurrió en este proyecto de estudio, ya que cada *phylum* puede incluir millones de géneros, y a su vez, especies, que colaboran en el índice de masa corporal de forma sinérgica en el aprovechamiento de alimentos y metabolitos, por lo que puede resultar contradictorio hacer inferencias con base en esta relación de *phyla*. Además, se ha reportado que los estudios que resaltan la proporción *Firmicutes/Bacteroidetes* en personas obesas o sanas, no cuentan con un sustento experimental suficiente para determinar una diferencia significativa entre ellos, pues se requiere de un gran número de personas para tener evidencia estadística de la tendencia de los *phyla* descritos (Sze & Schloss, 2016).

Para este proyecto se utilizaron muestras de heces de tres personas saludables, lo que incluye personas sin obesidad. Al analizar la Figura 13, se observa que los resultados obtenidos con respecto a la relación *Firmicutes/Bacteroidetes*, no corresponde con las características de los participantes de acuerdo con los estudios de muestran un aumento de *Firmicutes* como indicador de personas obesas, pues aquí se presentan dos participantes con un IMC normal y un participante con sobrepeso. En todos los casos (muestras de materia fecal y muestras con fibras), hay una mayor proporción de *Firmicutes* sobre *Bacteroidetes*. No se observa un comportamiento en común en las muestras con fibra en comparación con las muestras de materia fecal sin tratamiento entre los tres participantes.

*Proteobacteria* es un *phylum* que sí presenta una tendencia en todas las muestras. A diferencia de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, existe un menor número de investigaciones hasta el momento en relación con el impacto que tiene la alimentación sobre este *phylum*. En un estudio realizado en ratas que fueron alimentadas durante 14 días con inulina, divididas en dos grupos de acuerdo con el momento de alimentación, se observó que las ratas alimentadas en el día (en comparación con las alimentadas en la tarde-noche) presentaron un aumento en el *phylum* de *Proteobacteria*, además de otros taxones más específicos a nivel de género como *Bifidobacterium* y *Allobaculum*, mientras que otros disminuyeron como *Rumminococcus*, *Oscillospira* y *Streptococcus* en ese mismo grupo. Se concluyó que la inulina puede tener un mayor efecto sobre la microbiota cuando se consume como

primer alimento del día después de un ayuno prolongado (Sasaki et al., 2019). Posiblemente, el efecto observado de la inulina hacia los microorganismos sea influenciado por el tiempo de fermentación (24 h), lo cual tenga relación con los resultados del estudio descrito.

En otro experimento realizado en 48 ratas que fueron alimentadas con almidón de maíz alto en amilosa, almidón de maíz alto en amilosa modificado (ambos considerados como almidón resistente) y almidón de maíz (control), se observó que los grupos alimentados con almidón resistente hubo un incremento en el *phylum Proteobacteria* entre otros, en comparación con el grupo control. Se menciona que esto puede deberse a que el cambio de alimentación genera inflamación intestinal que puede ser el sitio perfecto para el desarrollo de este *phylum* bacteriano (Lyte et al., 2016). Hasta el momento no se han encontrado estudios *in vitro* que revelen un incremento del *phylum Proteobacteria* después del consumo de fibra (Giuberti & Gallo, 2020; Hughes et al., 2008; Zhou et al., 2020).

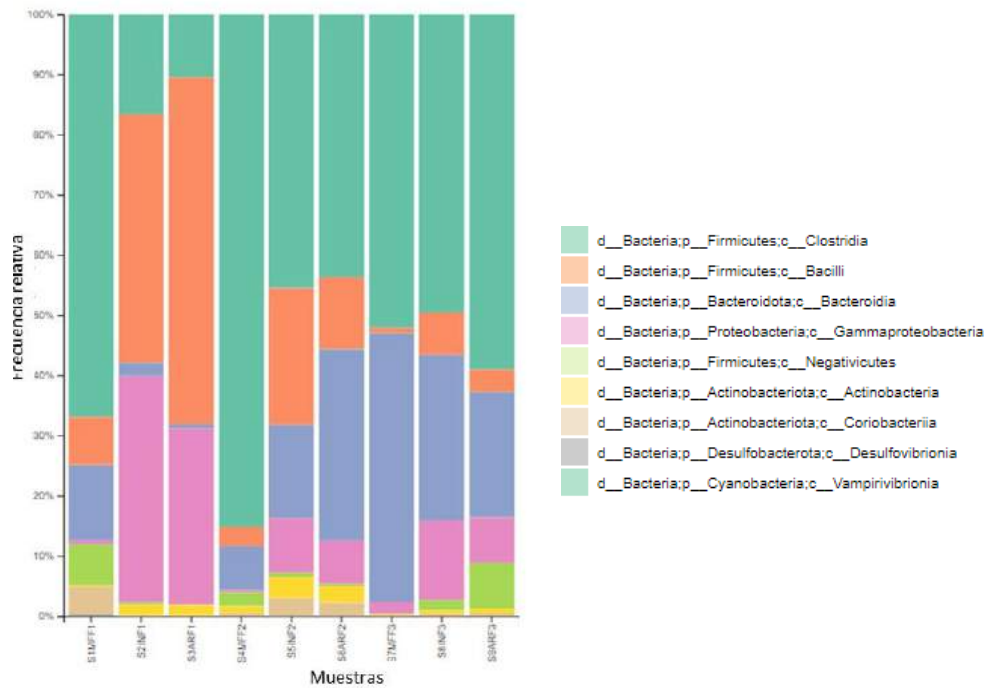


Figura 15. Taxonomía a nivel de clase.

A nivel de clase, *Bacilli*, *Gammaproteobacteria* y *Actinobacteria* aumentaron después de la fermentación con inulina y AR3 (Figura 15), aunque la proporción fue diferente en cada participante. De estas tres clases, tanto *Actinobacteria* como *Gammaproteobacteria* presentaron taxones a nivel de género de importancia en los resultados de este proyecto. Se observó un aumento en las muestras de inulina y AR3 en los tres participantes y disminuciones de otros géneros.

La clasificación a menor nivel taxonómico que permite el gen 16S es a nivel de género (nivel 6), y en este proyecto se utilizaron las regiones hipervariables V3-V4, las cuales no logran identificar taxones a nivel de especie, como se describe en el proyecto de Jeong et al. (2021), donde comparó la taxonomía encontrada entre la secuenciación de regiones V3-V4 en contraste con la taxonomía de todas las regiones, mostrando una mayor precisión en la identificación con la secuenciación del gen completo (Jeong et al., 2021). Sin embargo, identificar la mayoría de los taxones a nivel de género nos aporta información suficiente para resaltar en este proyecto.

La Figura 16 presenta en diferentes colores cada taxón y su respectiva variación dependiendo de dónde proviene: tratamiento con AR3, tratamiento con inulina, materia fecal, así como el donador al que pertenece.

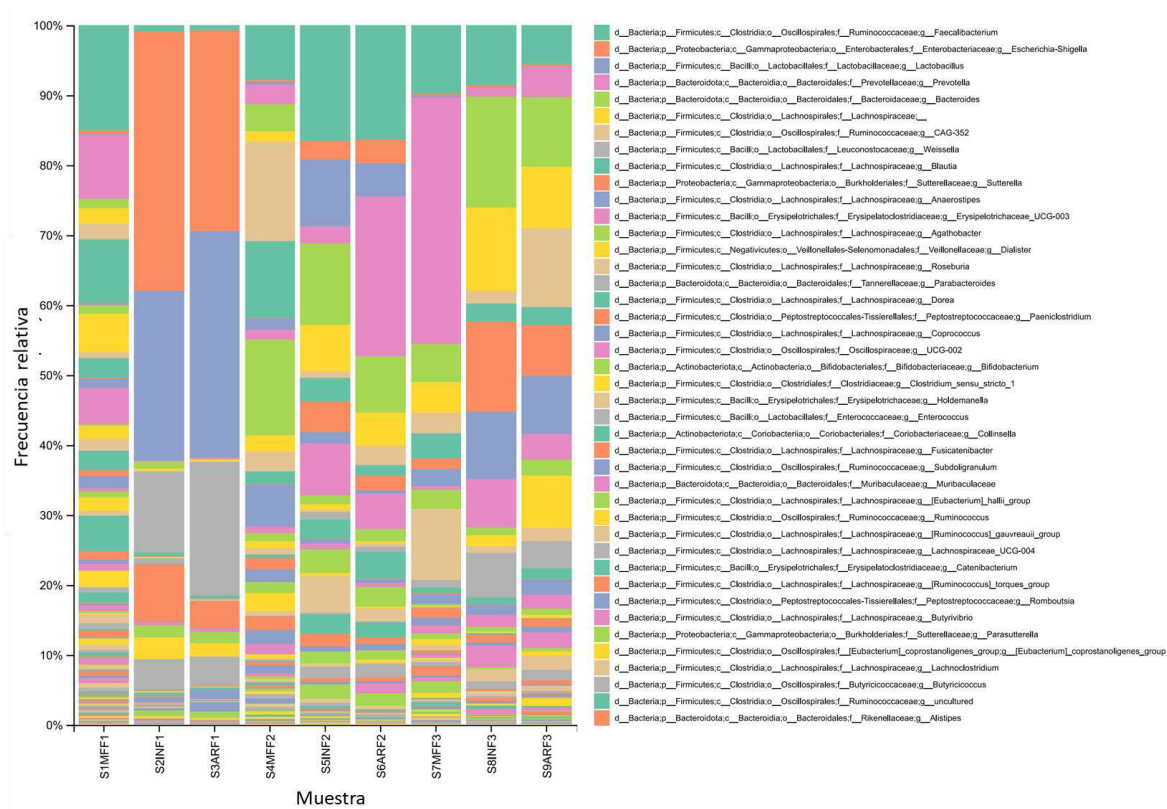


Figura 16. Taxonomía a nivel de género en cada muestra. Cada microorganismo se identifica con un color en particular.

Se observa que en las muestras sin tratamiento se mantiene una mayor riqueza de taxones en comparación con las que llevan un tratamiento. Por otro lado, se identificaron cuáles géneros siguieron la misma tendencia en las muestras de los tres participantes, tanto de materia fecal como en las muestras de inulina y AR3.

En el *phylum Actinobacteria*, el género *Bifidobacterium* (anaerobio estricto, aunque hay algunas especies microaerófilas) es considerado como probiótico de importancia para la salud intestinal humana. Estudios muestran que hay una mayor abundancia de ellos tanto en personas sanas en etapa de juventud como en adultos mayores, en gran parte relacionado con la dieta, ya que *Bifidobacterium* se ha asociado con la degradación de polisacáridos vegetales resistentes y posterior generación de metabolitos, entre ellos, AGCC en pH de 5.8 a 7 (Li et al., 2021).

En la Figura 16, se observa un incremento de este género desde las muestras de materia fecal a las de Inulina y AR3, siendo muy similar en ambas fuentes de fibra. Hay evidencias que demuestran el efecto prebiótico de la inulina sobre el incremento de este género (Van de Wiele et al., 2004). Para el almidón resistente, se sabe que existen dos especies de este género en el colon que pueden degradarlo: *B. adolescentis* y *B. pseudocatenulatum* y entre ellas, se conocen varias cepas que participan de forma sinérgica con otros microorganismos para la producción de AGCC, principalmente lactato y acetato, generando un efecto cruzado con otros géneros como *Eubacterium* y *Roseburia*, que son productores de butirato (Alfa et al., 2018; Belenguer et al., 2006; Jung et al., 2019). En un estudio *in vitro*, se fermentaron 6 fibras provenientes de almidón alto en amilosa, entre las que se estudió el AR3. Una vez finalizadas las fermentaciones, se aislaron varias especies y cepas de *Bifidobacterium*, resaltando que *B. adolescentis* P2P3 puede degradar este tipo de almidón resistente (Jung et al., 2019). En un estudio posterior, se identificaron los posibles genes responsables de la degradación del almidón resistente, mostrando que hay tres enzimas capaces de tal función, pero principalmente se resalta una de ellas con mayor actividad, conocida como enzima amilolítica RSD2 (Jung et al., 2020).

También se observó un incremento de *Escherichia-Shigella* en los tres donadores (anaerobia facultativa); proviene de la clase *Gammaproteobacteria*, considerada como patógeno entérico. Se ha observado una relación de su abundancia con el grado de polimerización (GP) de las fibras con las que entra en contacto. En un estudio *in vitro*, se probaron las fibras carboximetilcelulosa (GP 100-2000),  $\beta$ -glucanos (GP 17-22) y Galactooligosacáridos (GP ~3) y se observó un aumento de *Escherichia-Shigella* en relación a la carboximetilcelulosa, que tiene un mayor grado de polimerización en comparación con las otras dos fibras, por lo que los autores sugieren evaluar el grado de polimerización sobre el efecto prebiótico que se le ha atribuido a las fibras de variada complejidad estructural (Chen et al., 2020). En este caso, tanto la inulina como el almidón retrogradado tienen un grado de polimerización comparable a la carboximetilcelulosa, por lo que puede ser un

factor importante en el incremento de *Escherichia-Shigella* después de la fermentación con tratamientos.

Por otro lado, en este trabajo se observó una disminución en varios géneros de la familia *Lachnospiraceae* (*phylum Firmicutes*) en las muestras con inulina y AR3 de todos los participantes, como lo es *Blautia*, *Roseburia*, *Agathobacter*, *Eubacterium ruminantium* y *Lachnospiraceae\_NK4A136\_grou*. *Blautia* se encuentra entre los microorganismos anaerobios estrictos y se sabe que participa en la síntesis de propionato y acetato, además se le conoce por su actividad antiinflamatoria en casos de enfermedades y su incremento cuando hay consumo de fibra, como se mostró en un estudio realizado en ratas, donde uno de los grupos de estudio fue alimentado con oligo y polisacáridos feruloilados no digeribles a partir del maíz y en el microbioma se detectó un incremento en *Blautia* y *Akkermansia* en comparación con los grupos que llevaban una dieta baja y alta en grasas (J. Yang et al., 2016). Sin embargo, los materiales de estudio difieren de lo que se ha empleado en este proyecto, posible factor por el que no se obtuvieron resultados similares, ya que en este caso se observó una disminución en lugar de un incremento. El género *Roseburia* se conoce como un anaerobio estricto y, aunque hay investigaciones que demuestran que el consumo de fructooligosacáridos puede elevar los niveles de *Faecalibacterium* y *Roseburia* (Benus et al., 2021), en este caso se observó lo contrario en la fermentación *in vitro* con inulina y AR3, posiblemente por los cambios de pH.

En cuanto a *Agathobacter*, que es otro de los géneros provenientes de *Lachnospiraceae*, es un anaerobio estricto que forma parte de la comunidad microbiana intestinal. Hay evidencia de que *Agathobacter* disminuye en presencia de almidón resistente de papa, específicamente de AR3, en estudios *in vitro* utilizando muestras de materia fecal de donantes (Liang et al., 2021). En otro estudio, se observó que *Agathobacter* (así como *Ruminococcus bromii*) aumentaba después de alimentar a 14 hombres con sobrepeso durante 10 semanas con AR3 (no se menciona fuente botánica de procedencia del AR3) (Walker et al., 2011). *Eubacterium ruminantium*, microorganismo anaeróbico que fue

aislado por primera vez del rumen de vacas y posteriormente encontrado en el colon, se ha asociado con la síntesis de butirato, ya que se han encontrado enzimas que participan en su producción, así como de ácido fórmico (Louis et al., 2004); sin embargo, en este caso no se observó su incremento

También disminuyeron géneros de la familia de los *Ruminococcaceae*, como *Subdoligranulum* y *Ruminococcus*, además de *Eubacterium coprostanoligenes* e *Intestinibacter*. Los *Ruminococcus*, que también son considerados como un género de importancia en el aprovechamiento del consumo de fibras, se vieron disminuidos en las muestras con tratamiento. Este género también es un anaerobio estricto que sintetiza un complejo enzimático capaz de degradar los carbohidratos de difícil acceso, como lo es el almidón resistente, sin embargo en este estudio no se observó su incremento en la fermentación con AR3. Si bien no generan AGCC en gran proporción durante la fermentación, sí forman parte del grupo de microorganismos clave para que otros que realmente son productores en potencia de butirato, acetato y propionato, cumplan con esta función, como el caso del género *Faecalibacterium* (Ze et al., 2012). En un estudio realizado en doce ratas alimentadas con salchichas adicionadas con inulina durante cuatro semanas, se observó un incremento de *Ruminococcus*, así como de *Bifidobacterium*, entre otros, en comparación con el grupo control (Thøgersen et al., 2018), mientras que en otro estudio realizado en 44 personas que consumieron una bebida con inulina durante el desayuno, se observó que el género *Ruminococcus* había disminuido (Healey et al., 2018). *Subdoligranulum* también está estrechamente relacionado con el aprovechamiento de fibras y producción de butirato. En un estudio llevado a cabo en 25 personas jóvenes que fueron alimentadas con barras suplementadas con fibra, se observó un incremento de este género después de 21 días. En otro estudio *in vitro* se observó que en muestras de heces de siete personas, las fermentaciones con fructooligosacáridos y AR3 favorecieron el incremento del género *Bifidobacterium* y la familia *Ruminococcaceae*, en comparación con el AR2 y AR4 también utilizados como tratamiento (Li et al., 2020). Con respecto a este



estudio, sí se observó un incremento del género *Bifidobacterium* en las fermentaciones con AR3 al igual que el estudio descrito.

El género *Intestinibacter* también se vio disminuido con los tratamientos de fibra. Pertenece a la familia *Peptostreptococcaceae* y es considerado como una bacteria anaerobia. Entre la información que se conoce sobre su función en el colon es la formación de acetato y formiato a partir de fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa, ribosa, entre otros (Gerritsen et al., 2014). En un estudio realizado en 12 personas tratadas con varias fibras dietéticas, entre ellas, inulina, se observó una disminución de este género, así como de *Ruminococcus* y otros géneros después de cuatro días de consumo (Tian et al., 2021).

*Monglobus* es un género del *phylum Firmicutes*, familia *Monoglobaceae*. Existe una especie conocida como *M. pectinilyticus* que se destaca por su función como degradador primario de fibras, particularmente la pectina ( Kim et al., 2019), pero en el tratamiento con inulina y AR3 en el sistema *in vitro*, se mostró una disminución de este género.

De forma resumida, se observó un incremento del género *Bifidobacterium*, que son productoras de acetato y lactato. El acetato fue potenciado con la inulina y sobre todo con el AR3. También, *Escherichia-Shigella* fue potenciado por los tratamientos, lo cual se ha relacionado con el grado de polimerización y con la activación de genes de virulencia a partir del butirato incluso en concentraciones bajas, aunque no se observó lo mismo en los resultados del control negativo (Nakanishi et al., 2009). Los géneros de la familia *Lachnospiraceae*, *Rumicocaceae* que se vieron disminuidos, están relacionados a su vez con la producción de butirato, lo cual también se refleja en un nulo incremento de este ácido graso en la cuantificación final promedio. Al parecer se mantiene estable bajo las tres condiciones de estudio. La producción de propionato fue mayor en la fermentación en el tratamiento con AR3 en comparación con inulina, posiblemente derivado y aprovechado de la síntesis de lactato. Este efecto sobre la composición de la microbiota intestinal puede ser generada por los cambios de pH y metabolitos producidos, así como la interacción cruzada entre microorganismos. La producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el

cuerpo humano se basa en una serie de interacciones entre los microorganismos que poseen la capacidad de degradar las fibras, conocidos como degradadores primarios, y los que aprovechan los fragmentos (mono, di u oligo-sacáridos), degradadores secundarios. Por esta razón, genera un gran impacto la composición de microbiota intestinal individual sobre la síntesis de AGCC.

Otro punto importante fue la identificación taxonómica. Como se observó en los gráficos, los resultados entre donadores fueron muy diferentes entre sí, comenzando por las muestras sin tratamiento y posteriormente las muestras con inulina y AR3, lo que marca una microbiota individualizada. Los taxones resultantes en cuanto a tratamientos parecen ser muy diferentes entre individuos, aunque la metodología y materiales de experimentación fueron iguales. Es por esto que se optó por el análisis de los taxones donde su tendencia fuera la misma en los tres donadores después de la fermentación con tratamientos y así evitar la individualización de resultados, ya que cada participante, a su vez, tiene características físicas propias, estilo de vida, genética y alimentación particular, como se mencionó en su dieta registrada. Cada factor tendrá un impacto en la comunidad microbiana, lo que nos lleva a comprender esta inmensa variabilidad en los resultados finales.

Por ejemplo, en el participante 1 se observó un mayor incremento de *Proteobacterias*, principalmente *Escherichia-Shigella*, después de las fermentaciones. Este donador reportó una alimentación rica en productos naturales, como vegetales, fruta y agua simple; sin embargo, parece ser que después la fermentación con inulina y AR3 puede potenciarse el patógeno mencionado, a diferencia de los donadores 2 y 3, donde la abundancia de este taxón no es la misma. Curiosamente, el donador 3 que presenta sobrepeso y en su registro describe alto consumo de botanas, grasas y bebidas procesada, el incremento de *Escherichia-Shigella* es casi imperceptible.

Es por ello que se requieren mayores investigaciones para visualizar los efectos del AR3 en grupos más definidos de donadores.

## Resultados del MOCK

Dentro de los taxones a nivel de género también se encontraron los dos microorganismos del MOCK ZymoBIOMICS™ Spike-in Control I (High Microbial Load) control estándar para la validación en la extracción de ADN y secuenciación masiva de las muestras. Si bien, la frecuencia relativa de cada género es variable entre cada muestra (Tabla 7), se observa que *I. halotolerans* es ligeramente mayor que *A. halotolerans*, ya que éste último es un Gram positivo, lo cual hace más compleja la extracción, en comparación con *I. halotolerans*.

Una relación 1:3.5 concluye un sesgo en la extracción de ADN, pero aquí no se observa. Todas las relaciones se encuentran por debajo de ese límite.

Tabla 7. Frecuencia relativa de taxones del MOCK Spike-in Control I

Muestra	% Frecuencia relativa		Relación
	<i>I. halotolerans</i>	<i>A. halotolerans</i>	
S1MFF1	0.071	0.045	1:1.58
S2INF1	0.24	0.111	1:2.16
S3ARF1	0.261	0.093	1:2.81
S4MFF2	0.03	0.03	1:1.00
S5INF2	0.036	0.032	1:1.13
S6ARF2	0.03	0.039	1:0.77
S7MFF3	0.133	0.069	1:1.93
S8INF3	0.104	0.046	1:2.26
S9ARF3	0.034	0.039	1:0.87

## Análisis de diversidad $\alpha$

Para conocer la diversidad  $\alpha$  de las muestras, se obtuvo la curva de rarefacción y, a su vez, el índice de Shannon a partir del complemento q2 diversity alpha-rarefaction (Shannon, 1948). La curva de rarefacción se utiliza para determinar si las muestras fueron secuenciadas a una profundidad suficiente. De forma aleatoria se toman submuestras de

los datos a diferentes profundidades de secuenciación (relación entre el número total de bases obtenidas en la secuenciación y el tamaño del genoma).

En la Figura 17 se observa el índice de Shannon alcanzado en cada una de las muestras, donde el objetivo es visualizar si, con la profundidad de secuenciación determinada, se han identificado todos los taxones (características) presentes en las muestras. Esto se puede observar cuando la curva ha alcanzado una meseta. El valor clave del índice de Shannon va de 2 a 3. Por debajo de este intervalo, se considera que una comunidad es baja en riqueza de especies, mientras que, por encima de 3, se consideran comunidades muy diversas. En este caso, se aprecia que la mayoría de las muestras presentaron riqueza en sus taxones, principalmente la muestra S1MFF1 que corresponde a la materia fecal del donador 1 antes de la fermentación con fibras, lo cual se relaciona con la diversidad de alimentos consumidos por este donador, así como las fuentes de las que provienen, pues tiene un alto consumo de productos vegetales, cereales y proteínas, mientras que hay un bajo consumo de grasas, botanas y bebidas procesadas. Por el contrario, las muestras S2INF1 y S3ARF1 (Fermentaciones con inulina y almidón resistente, respectivamente, con inóculo fecal de donador 1) se vieron disminuidas en su riqueza, posiblemente derivado de la restricción en la variedad de alimentos. Con las muestras del donador 2, ocurrió algo muy similar. La muestra de materia fecal presentó una mayor diversidad, en contraste con las provenientes de fermentaciones, aunque este comportamiento no fue tan drástico como en las muestras del participante 1. Por otro lado, aunque todas las muestras del donador 3 fueron muy diversas, hubo un aumento en su riqueza en la comunidad que corresponde a la muestra de fermentación de AR3 (S9ARF3), mientras que la de materia fecal e inulina fueron muy parecidas.

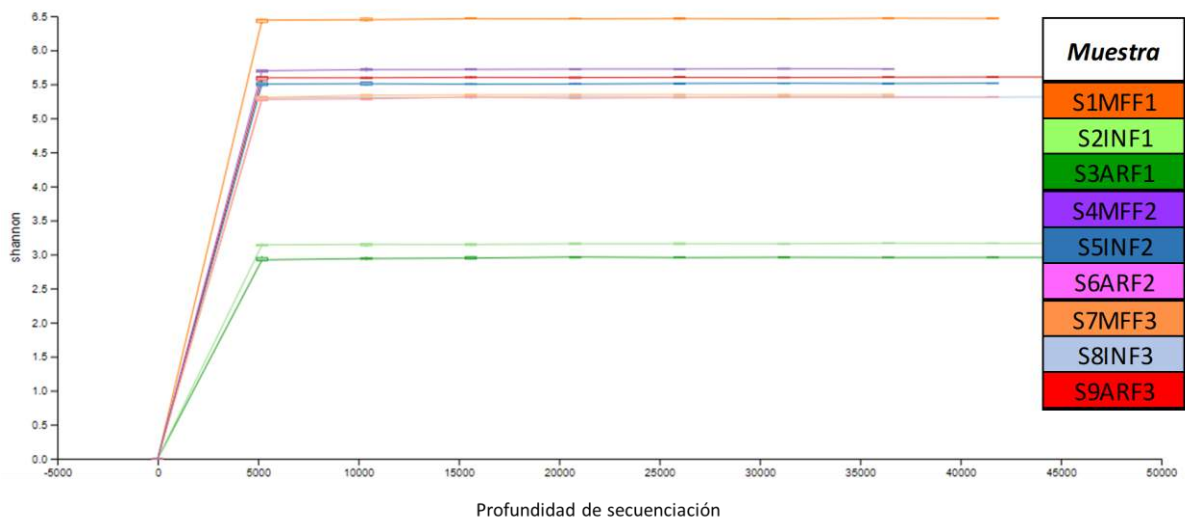


Figura 17. Curva de rarefacción con índice de Shannon.

Estos comportamientos son visibles también en el gráfico de barras de taxonomía de las muestras (Figura 17). Las comunidades microbianas pueden verse afectadas por diferentes razones, entre ellas, el impacto de las fibras como fuente principal de carbono. Los alimentos, en sí, también causan efectos inmediatos sobre comunidades microbianas, incluso si estos no son consumidos de forma permanente. En este caso, tanto la inulina como el AR3 generaron una alteración sobre el aumento y disminución de ciertos taxones (David et al., 2014).

En la Figura 18 se observa un gráfico de significancia de acuerdo con el índice de Shannon por tratamiento en las muestras. No se aprecia una diferencia significativa dentro de las comunidades microbianas por AR3, inulina o incluso en muestras sin tratamiento ( $p=0.193$ ).

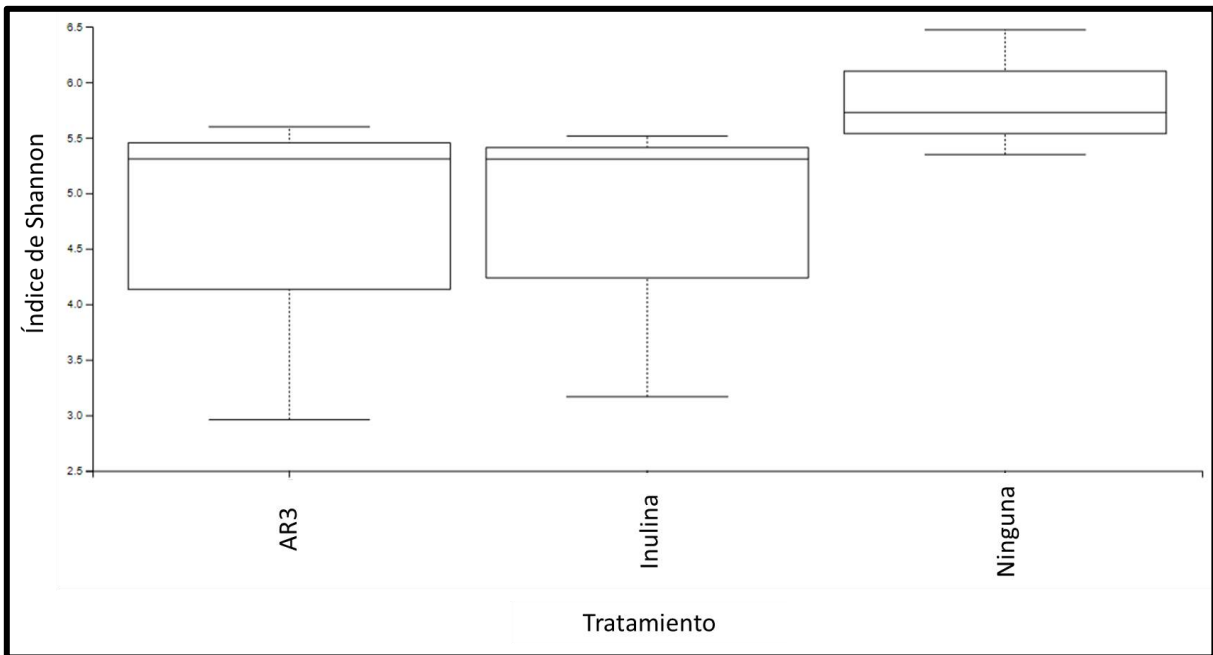


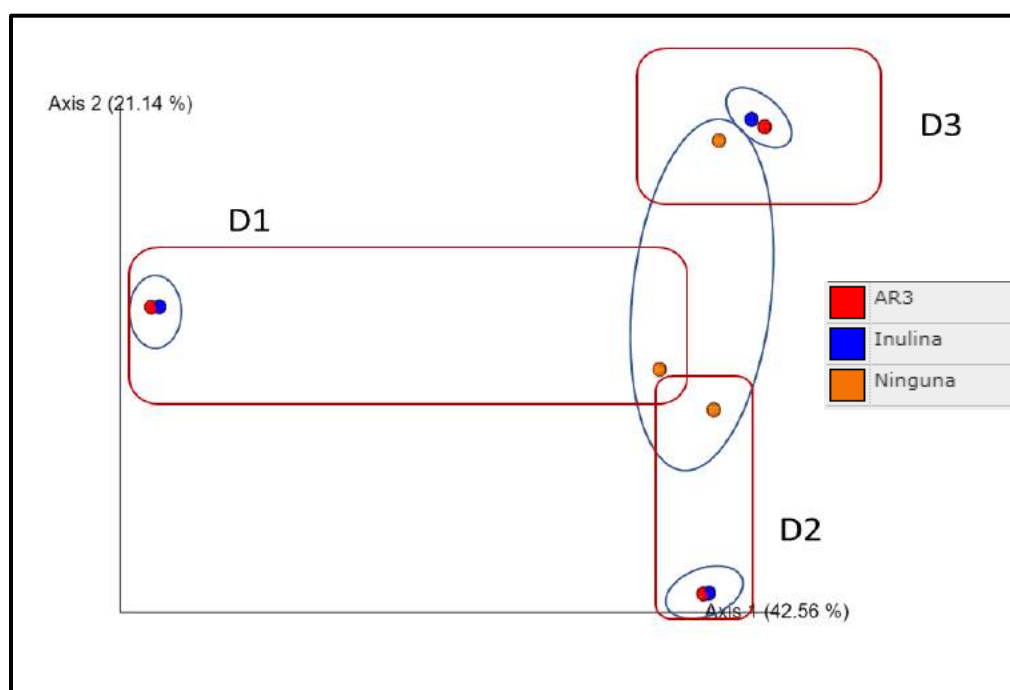
Figura 18. Significancia en índice de Shannon por tratamiento en las muestras.

De acuerdo con otros estudios reportados, la fermentación de fibras favorece la riqueza de taxones dentro de la microbiota (Menni et al., 2017; Sonnenburg et al., 2016). Sin embargo, bajo las condiciones de experimentación trabajadas no llevó al mismo resultado que en otros estudios, por el contrario, hubo un descenso en la riqueza de microorganismos en las muestras de materia fecal del participante 1 y 2 después de fermentar tanto la inulina como el AR3, lo cual pudo deberse al cambio de sustrato para estas microbiotas o a las condiciones trabajadas en el sistema *in vitro*.

### ***Análisis de diversidad $\beta$***

Para analizar la diversidad  $\beta$  se realizaron comparativos entre las muestras a partir de métodos estadísticos. Para este caso, se utilizó el estadístico de Bray-Curtis para el análisis de la abundancia de microorganismos entre las muestras, donde en el resultado global presentando el efecto de las fibras, no se observó diferencia significativa con respecto a los

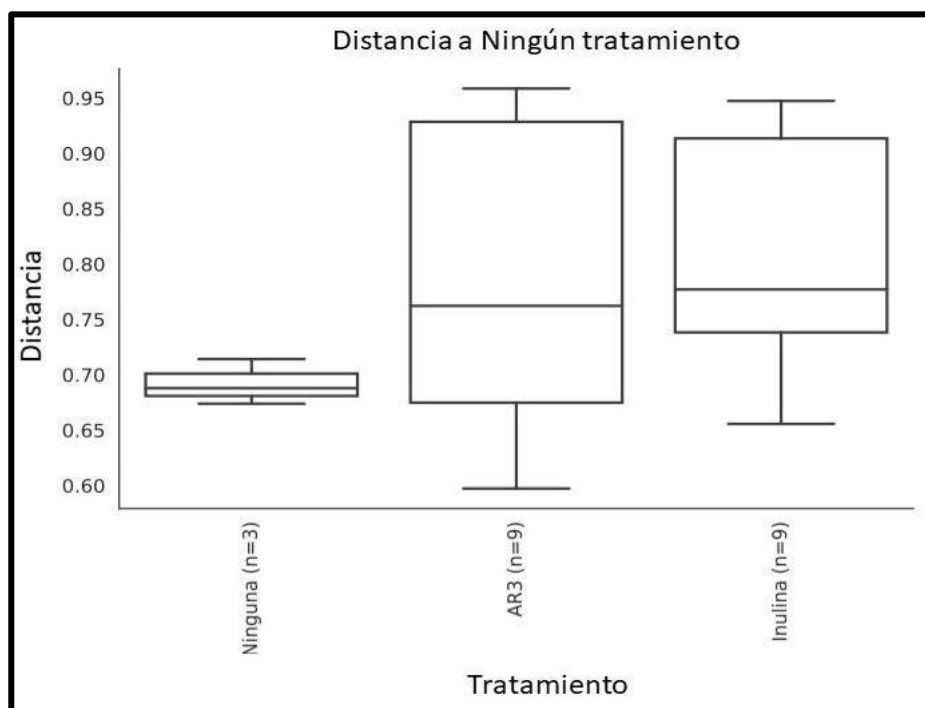
tratamientos ni en las muestras sin tratamiento. En el gráfico de componentes principales (Figura 19) se aprecia un agrupamiento de las muestras relacionadas a los tratamientos con inulina y AR3, aunque este comportamiento depende de la comunidad microbiana inicial y no de la fibra utilizada en sí. Esta información también se observa en la taxonomía a nivel de género que se presentó en la Figura 14, pues es muy similar el impacto entre la inulina y AR3 como fuente de fibra principal sobre cada taxón. El valor de significancia  $p=0.651$  indica que no hay diferencia significativa entre los taxones de las muestras.



*Figura 19. Componentes Principales. Las muestras con fibra presentan un agrupamiento, alejándose de la microbiota inicial en materia fecal.*

En la Figura 19 se presentan las nueve muestras de estudio, tres por cada participante. Las muestras de materia fecal de cada participante se ubicaron en puntos distintos pero cercanas entre ellas, mientras que las muestras fermentadas, se agruparon entre inulina-AR3 para cada participante. De acuerdo con los resultados obtenidos, la composición microbiana inicial definió su comportamiento después del aprovechamiento de las fibras.

También se apreció un mayor cambio en los taxones de la muestra de materia fecal del donador 1 en comparación con la comunidad resultantes después de las fermentaciones. Tal efecto no se observó en la misma magnitud para los donadores 2 y 3. Se realizó un PERMANOVA para evaluar si había diferencia significativa entre los microbiomas de acuerdo con los tratamientos y el control; sin embargo, el resultado fue negativo ya que no hay diferencia significativa ( $p=0.663$ ), como se observa en la Figura 20.



*Figura 20. Significancia estadística de Bray-Curtis con las muestras sin tratamiento con respecto a las muestras de AR3 e Inulina.*

Para comparar el efecto de las fibras sobre las comunidades microbianas, se utilizó el estadístico de Bray-Curtis basado en cada donador. A diferencia de los anteriores, aquí se observó una diferencia estadística significativa entre los tres, resaltando una mayor distancia entre el 1 con respecto al 2 y 3. El valor global  $p=0.0004$ . La Figura 21 presenta el análisis de componentes principales por donador, mientras que la Figura 22 muestra el



gráfico del PERMANOVA, donde se observa la diferencia estadística entre las comunidades microbianas entre donadores.

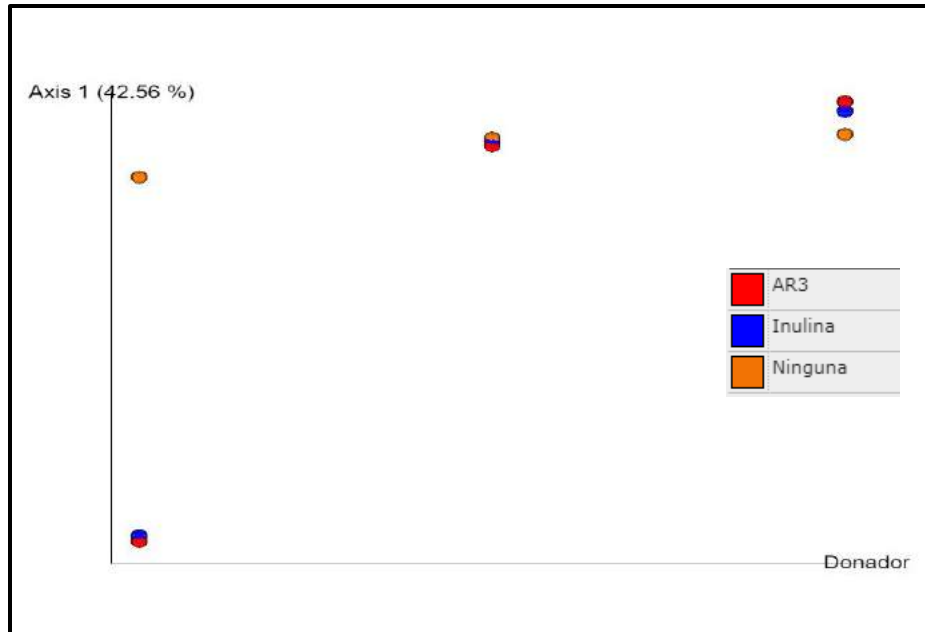


Figura 21. PCo Bray-Curtis por Donador.

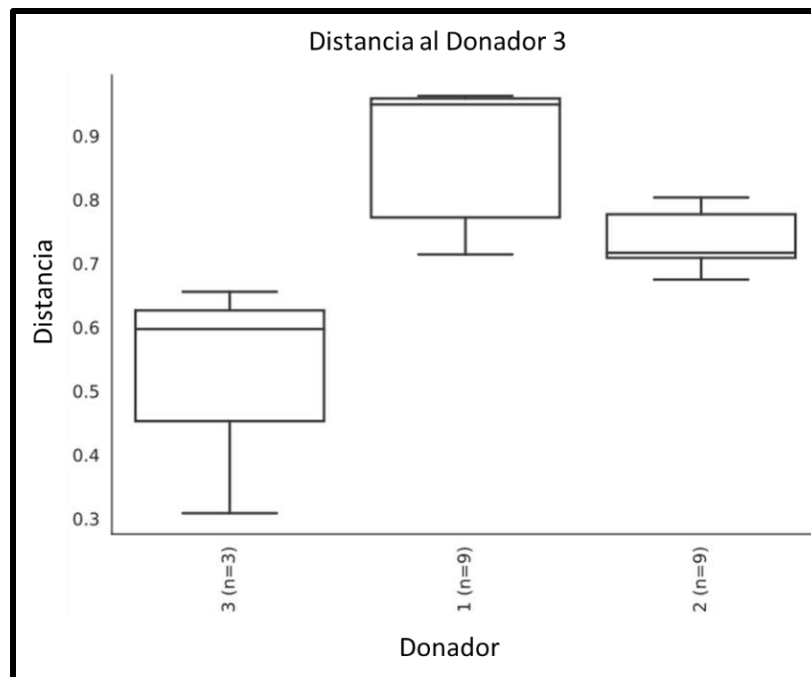
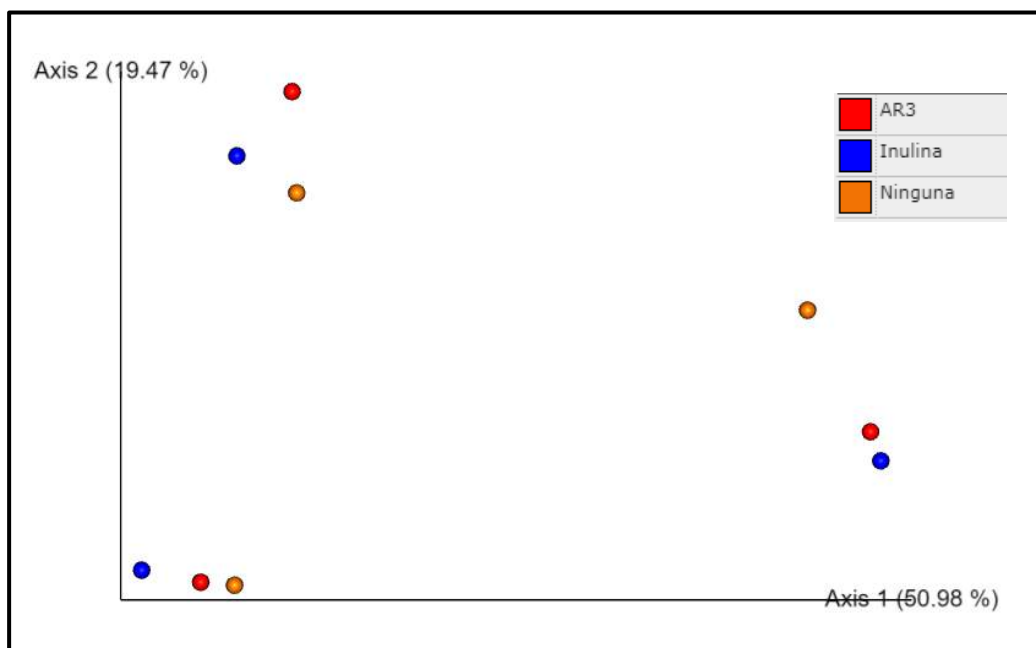


Figura 22. Significancia estadística de Bray-Curtis entre los Donadores. Se muestra el gráfico de distancia del Donador 3 respecto al 1 y 2.

Como datos puntuales, el participante 3 difería en algunas características con los otros participantes, las cuales pueden ser factores que se reflejen a nivel de microbioma, pues este participante se encontraba ligeramente por encima del peso normal (sobrepeso), además de que su registro de alimentos era más rico en botanas y aguas azucaradas en comparación con los otros donadores, por lo que su microbiota puede verse influenciada por estas y otras condicionantes. Es posible que el efecto del AR3 tenga un mayor impacto benéfico sobre personas con sobrepeso, se sugiere investigación al respecto.

A nivel de distancias filogenéticas, existe el análisis UniFrac. En este trabajo se muestra el UniFrac no ponderado en el gráfico de componentes principales (Figura 23) que describe la ausencia o presencia de taxones comunes entre las muestras de interés, en este caso de los tratamientos, y de igual manera no se observó una diferencia significativa ( $p=0.893$ ) en la Figura 24, es decir, los taxones que participan de las fermentaciones en inulina y AR3 son muy similares, que a su vez provienen de un inóculo fecal inicial.



*Figura 23. PCo de UNIFRAC no ponderado entre los tratamientos aplicados.*

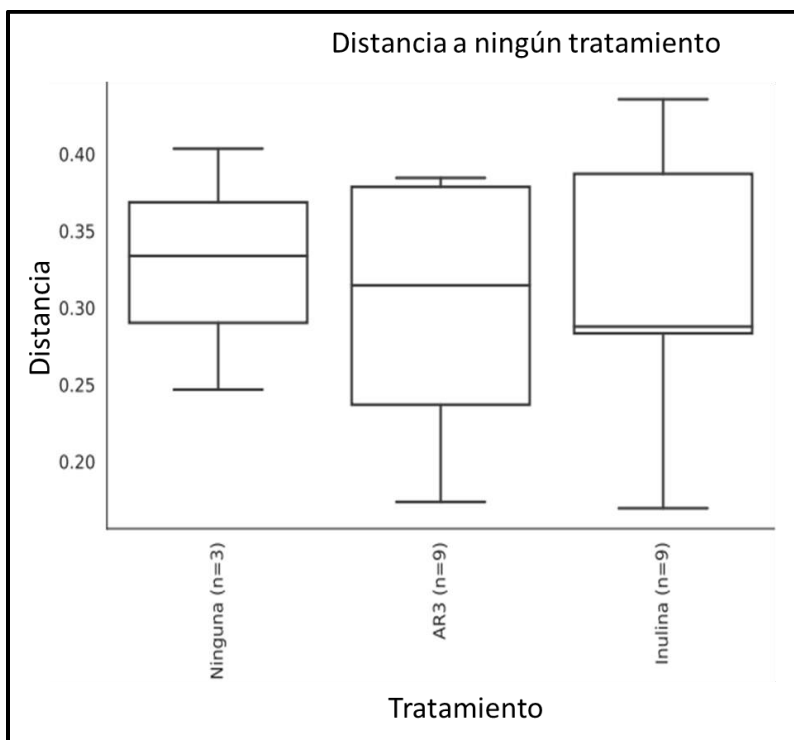


Figura 24. Significancia estadística de UNIFRAC no ponderado por tipo de tratamiento.

Los resultados finales muestran tendencias poco comunes relacionadas con otros proyectos similares en cuanto a los taxones potenciados a partir de la inulina y AR3. Por otro lado, trabajar en un sistema *in vitro* puede tener algunas limitaciones, aunque los resultados obtenidos son un buen acercamiento de lo que ocurre en un colon proximal humano. Si bien, en personas sanas los alimentos pueden llevar de 30 a 40 h en el intestino grueso (Tomita et al., 2011), existen estudios en sistemas *in vitro* para simular condiciones intestinales y se ha observado que la comunidad microbiana se mantiene en crecimiento y abundancia de taxones durante 24 h, pero después de este tiempo se observa un decremento, por lo que se considera que utilizar ese tiempo de trabajo es razonable cuando se trata de evaluaciones intestinales *in vitro* (Li et al., 2019).

## IV. Conclusiones

---

- El tratamiento hidrotérmico empleado sobre el almidón nativo alto en amilosa generó un 29% de almidón resistente. Una vez que se simuló su paso por el tracto gastrointestinal con condiciones corporales, se cuantificó un 56.8% total de almidón resistente.
- El sistema colónico *in vitro* fue apropiado para permitir la fermentación de las fibras, con las condiciones de temperatura 37° C, pH 5.8-6.0, ausencia de oxígeno y salida de gas hacia la trampa con carbón activado.
- En la clasificación taxonómica general de las muestras, se observó el incremento del género *Bifidobacterium* y *Escherichia-Shigella*, mientras que los géneros *Blautia*, *Roseburia*, *Agathobacter*, *Eubacterium*, *Lachnospiraceae\_NK4A136*, *Subdoligranulum*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Intestinibacter* y *Monoglobus* se vieron disminuidas en las muestras con fermentaciones de Inulina y AR3. La abundancia aumentada de *Escherichia-Shigella* después del consumo de AR3 o inulina, podría tener efectos negativos sobre la salud en sistemas *in vivo* al ser este un patógeno de importancia clínica. Será necesario realizar evaluaciones al respecto.
- En la cuantificación de AGCC se observó una mayor concentración de acetato en las muestras con fermentación de AR3, aunque también fue en esta fibra donde se cuantificó menor concentración de butirato, lo cual se relaciona con la abundancia final de microorganismos. A nivel de sistemas *in vivo*, esta proporción de acetato (82%) tan incrementada sobre el butirato (1%) y propionato (17%), puede ser contraproducente sobre la salud al potenciar la síntesis de colesterol o participar en la proliferación de células cancerígenas, por ejemplo.
- De acuerdo con la diversidad  $\alpha$  evaluada a través del índice de Shannon no hay una diferencia significativa entre los taxones dentro de las muestras. La diversidad  $\beta$ , sí presentó una diferencia estadística ( $p=0.004$ ) entre los taxones de los donadores, de acuerdo con el método Bray-Curtis.

## V. Referencias

---

- Agama-Acevedo, E., Pacheco-Vargas, G., Bello-Pérez, L. A., & Alvarez-Ramirez, J. (2018). Effect of drying method and hydrothermal treatment of pregelatinized Hylon VII starch on resistant starch content. *Food Hydrocolloids*, *77*, 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.025>
- Ai, Y., Hasjim, J., & Jane, J. L. (2013). Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, *92*(1), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.092>
- Alfa, M. J., Strang, D., Tappia, P. S., Graham, M., Van Domselaar, G., Forbes, J. D., Laminman, V., Olson, N., DeGagne, P., Bray, D., Murray, B. L., Dufault, B., & Lix, L. M. (2018). A randomized trial to determine the impact of a digestion resistant starch composition on the gut microbiome in older and mid-age adults. *Clinical Nutrition*, *37*(3), 797–807. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.025>
- Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Xu, Z. Z., Kightley, E. P., Thompson, L. R., Hyde, E. R., Gonzalez, A., & Knight, R. (2017). Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *MSystems*, *2*(2), e00191--16.
- Arcia, P. L., Costell, E., & Tárrega, A. (2011). Inulin blend as prebiotic and fat replacer in dairy desserts: Optimization by response surface methodology. *Journal of Dairy Science*, *94*(5), 2192–2200. <https://doi.org/10.3168/JDS.2010-3873>
- Barroso, E., Cueva, C., Pelá ez, C., Martínez-Cuesta, M. C., & Requena, T. (2015). The computer-controlled multicompartamental dynamic model of the gastrointestinal system SIMGI. En *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 319–327). Springer International Publishing.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_28](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_28)

Belenguer, A., Duncan, S. H., Calder, A. G., Holtrop, G., Louis, P., Lobley, G. E., & Flint, H. J. (2006). Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3593. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3593-3599.2006>

Berrill, J., Gallacher, J., & Campbell, A. K. (2013). An observational study of cognitive function in patients with irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Article in Neurogastroenterology and Motility*, 25(11), 918-e704. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nmo.12219>

Bervoets, L., Hoorenbeeck, K. Van, Kortleven, I., Noten, C. Van, Hens, N., Vael, C., Goossens, H., Desager, K. N., & Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut Pathogens*, 5(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-10>

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S40168-018-0470-Z>

Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., Mills, D. A., & Caporaso, J. G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods*, 10(1), 57–59. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M.,

- Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857.  
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, *6*(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Caleffi, E. R., Krausová, G., Hyršlová, I., Paredes, L. L. R., dos Santos, M. M., Sasaki, G. L., Gonçalves, R. A. C., & de Oliveira, A. J. B. (2015). Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. *International Journal of Biological Macromolecules*, *80*, 392–399.  
<https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2015.06.053>
- Camara, A., Konate, S., Alou, M. T., Kodio, A., Togo, A. H., Cortaredona, S., Henrissat, B., Thera, M. A., Doumbo, O. K., Raoult, D., & Million, M. (2021). Clinical evidence of the role of *Methanobrevibacter smithii* in severe acute malnutrition. *Nature*, *11*(1), 5426.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84641-8>
- Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., De Backer, F., Neyrinck, A. M., & Delzenne, N. M. (2009). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(5), 1236–1243.  
<https://doi.org/10.3945/AJCN.2009.28095>
- Chassard, C., & Bernalier-Donadille, A. (2005). H<sub>2</sub> and acetate transfers during xylan fermentation between a butyrate-producing xylanolytic species and hydrogenotrophic microorganisms from the human gut. *FEMS Microbiology Letters*,

254(1), 116–122. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00016.x>

Cheetham, N. W. H., & Tao, L. (1998). Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*, 36(4), 277–284. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00007-1)

Chen, M., Fan, B., Liu, S., Imam, K. M. S. U., Xie, Y., Wen, B., & Xin, F. (2020). The in vitro Effect of Fibers With Different Degrees of Polymerization on Human Gut Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00819>

Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, H. W. J., Naylor, C. P. E., & MacFarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221–1227. <https://doi.org/10.1136/GUT.28.10.1221>

David, L. A., Materna, A. C., Friedman, J., Campos-Baptista, M. I., Blackburn, M. C., Perrotta, A., Erdman, S. E., & Alm, E. J. (2014). Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biology*, 15(7). <https://doi.org/10.1186/GB-2014-15-7-R89>

De Angelis, M., Ferrocino, I., Calabrese, F. M., De Filippis, F., Cavallo, N., Siragusa, S., Rampelli, S., Di Cagno, R., Rantsiou, K., Vannini, L., Pellegrini, N., Lazzi, C., Turrone, S., Lorusso, N., Ventura, M., Chieppa, M., Neviani, E., Brigidi, P., O'Toole, P. W., ... Cocolin, L. (2020). Diet influences the functions of the human intestinal microbiome. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61192-y>

De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2013). Development of a HPLC–UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 80, 107–115. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2013.02.032>



- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, *54*(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, *167*(5), 1339-1353.e21. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.10.043>
- Dridi, B., Henry, M., El Khé chine, A., Raoult, D., & Drancourt, M. (2009). High Prevalence of *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* Detected in the Human Gut Using an Improved DNA Detection Protocol. *PLoS ONE*, *4*(9), e7063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007063>
- Ellegård, L., Andersson, H., & Bosaeus, I. (1997). Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *European journal of clinical nutrition*, *51*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/SJ.EJCN.1600320>
- Englyst, K. N., Englyst, H. N., Hudson, G. J., Cole, T. J., & Cummings, J. H. (1999). Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycem

response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(3), 448–454.

<https://doi.org/10.1093/AJCN/69.3.448>

Erickson, J. M., Carlson, J. L., Stewart, M. L., & Slavin, J. L. (2018). Fermentability of novel type-4 resistant starches in in vitro system. *Foods*, 7(2), 18.

<https://doi.org/10.3390/foods7020018>

Falsafi, S. R., Maghsoudlou, Y., Aalami, M., Jafari, S. M., & Raeisi, M. (2019).

Physicochemical and morphological properties of resistant starch type 4 prepared under ultrasound and conventional conditions and their in-vitro and in-vivo digestibilities. *Ultrasonics Sonochemistry*, 53, 110–119.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.039>

Fernando, W. M. A. D. B., Flint, S. H., Ranaweera, K. K. D. S., Bamunuarachchi, A., Johnson, S. K., & Brennan, C. S. (2017). The potential synergistic behaviour of inter- and intra-genus probiotic combinations in the pattern and rate of short chain fatty acids formation during fibre fermentation. *International Journal of Food Science & Nutrition*, 69(2), 144–154. <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1340932>

Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Louise Thomas, E., & Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications* 2014 5:1, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>

Gerritsen, J., Fuentes, S., Grievink, W., Niftrik, L. van, Tindall, B. J., Timmerman, H. M., Rijkers, G. T., & Smidt, H. (2014). Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov.

and *Asaccharospora* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt\_5), 1600–1616. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.059543-0>

Giuberti, G., & Gallo, A. (2020). In vitro evaluation of fermentation characteristics of type 3 resistant starch. *Heliyon*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03145>

Glöckner, F. O., Yilmaz, P., Quast, C., Gerken, J., Beccati, A., Ciuprina, A., Bruns, G., Yarza, P., Peplies, J., Westram, R., & Ludwig, W. (2017). 25 years of serving the community with ribosomal RNA gene reference databases and tools. *Journal of Biotechnology*, 261, 169–176. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.06.1198>

Hallen-Adams, H. E., & Suhr, M. J. (2017). Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. *Virulence*, 8(3), 352–358. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1247140>

Hallström, E., Sestili, F., Lafiandra, D., Björck, I., & Östman, E. (2011). A novel wheat variety with elevated content of amylose increases resistant starch formation and may beneficially influence glycaemia in healthy subjects. *Food & Nutrition Research*, 55. <https://doi.org/10.3402/FNR.V55I0.7074>

Harris, Z. N., Dhungel, E., Mosior, M., & Ahn, T. H. (2019). Massive metagenomic data analysis using abundance-based machine learning. *Biology Direct*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13062-019-0242-0>

He, J., Liu, J., & Zhang, G. (2008). Slowly digestible waxy maize starch prepared by octenyl succinic anhydride esterification and heat-moisture treatment: Glycemic response and mechanism. *Biomacromolecules*, 9(1), 175–184. <https://doi.org/10.1021/bm700951s>

Healey, G., Murphy, R., Butts, C., Brough, L., Whelan, K., & Coad, J. (2018). Habitual dietary fibre intake influences gut microbiota response to an inulin-type fructan prebiotic: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over, human intervention study.

*British Journal of Nutrition*, 119(2), 176–189.

<https://doi.org/10.1017/S0007114517003440>

Hoffmann, C., Dollive, S., Grunberg, S., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., & Bushman, F. D. (2013). Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents. *PLoS ONE*, 8(6), e66019.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0066019>

Hoggard, M., Vesty, A., Wong, G., Montgomery, J. M., Fourie, C., Douglas, R. G., Biswas, K., & Taylor, M. W. (2018). Characterizing the human mycobiota: A comparison of small subunit rRNA, ITS1, ITS2, and large subunit rRNA genomic targets. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2208. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02208>

Huang, Z., Zhang, M., Plec, A. A., Estill, S. J., Cai, L., Repa, J. J., McKnight, S. L., & Tu, B. P. (2018). ACS2 promotes systemic fat storage and utilization through selective regulation of genes involved in lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(40), E9499–E9506.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.1806635115>

Hughes, S. A., Shewry, P. R., Gibson, G. R., McCleary, B. V., & Rastall, R. A. (2008). In vitro fermentation of oat and barley derived  $\beta$ -glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(3), 482–493. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2008.00478.X>

Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* (Vol. 486).

<https://doi.org/10.1038/nature11234>

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8836–8847. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>

- Jeong, J., Yun, K., Mun, S., Chung, W.-H., Choi, S.-Y., Nam, Y., Lim, M. Y., Hong, C. P., Park, C., Ahn, Y. J., & Han, K. (2021). The effect of taxonomic classification by full-length 16S rRNA sequencing with a synthetic long-read technology. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80826-9>
- Jiang, H., Campbell, M., Blanco, M., & Jane, J. L. (2010). Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches: Part II. Structures and properties of starch residues remaining after enzymatic hydrolysis at boiling-water temperature. *Carbohydrate Polymers*, *80*(1), 1–12.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Jones, J. M. (2014). CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the “fiber gap”. *Nutrition Journal*, *13*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-34>
- Jung, D. H., Kim, G. Y., Kim, I. Y., Seo, D. H., Nam, Y. Do, Kang, H., Song, Y., & Park, C. S. (2019). Bifidobacterium adolescentis P2P3, a human gut bacterium having strong non-gelatinized resistant starch-degrading activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(12), 1904–1915. <https://doi.org/10.4014/jmb.1909.09010>
- Jung, D. H., Seo, D. H., Kim, Y. J., Chung, W. H., Nam, Y. Do, & Park, C. S. (2020). The presence of resistant starch-degrading amylases in Bifidobacterium adolescentis of the human gut. *International Journal of Biological Macromolecules*, *161*, 389–397. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.05.235>
- Kaimal, A. M., Mujumdar, A. S., & Thorat, B. N. (2021). Resistant starch from millets: Recent developments and applications in food industries: Resistant starch from

millets. *Trends in Food Science and Technology*, 111, 563–580.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.074>

Kamphorst, J. J., Chung, M. K., Fan, J., & Rabinowitz, J. D. (2014). Quantitative analysis of acetyl-CoA production in hypoxic cancer cells reveals substantial contribution from acetate. *Cancer & Metabolism* 2014 2:1, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-23>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Kim, C. C., Healey, G. R., Kelly, W. J., Patchett, M. L., Jordens, Z., Tannock, G. W., Sims, I. M., Bell, T. J., Hedderley, D., Henrissat, B., & Rosendale, D. I. (2019). Genomic insights from *Monoglobus pectinilyticus*: a pectin-degrading specialist bacterium in the human colon. *The ISME Journal*, 13(6), 1437. <https://doi.org/10.1038/S41396-019-0363-6>

Kim, H., Kwon, J., Choi, S. Y., & Ahn, Y. G. (2019). Method development for the quantitative determination of short chain fatty acids in microbial samples by solid phase extraction and gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Analytical Science and Technology* 2019 10:1, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S40543-019-0184-2>

Le Leu, R. K., Hu, Y., Brown, I. L., Woodman, R. J., & Young, G. P. (2010). Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*, 31(2), 246–251. <https://academic.oup.com/carcin/article/31/2/246/2476894>

Letexier, D., Diraison, F., & Beylot, M. (2003). Addition of inulin to a moderately high-carbohydrate diet reduces hepatic lipogenesis and plasma triacylglycerol

- concentrations in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(3), 559–564.  
<https://doi.org/10.1093/AJCN/77.3.559>
- Li, J., Si, H., Du, H., Guo, H., Dai, H., Xu, S., & Wan, J. (2021). Comparison of gut microbiota structure and Actinobacteria abundances in healthy young adults and elderly subjects: a pilot study. *BMC Microbiology*, 21(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1186/S12866-020-02068-Z>
- Li, L., Abou-Samra, E., Ning, Z., Zhang, X., Mayne, J., Wang, J., Cheng, K., Walker, K., Stintzi, A., & Figeys, D. (2019). An in vitro model maintaining taxon-specific functional activities of the gut microbiome. *Nature Communications*, 10(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12087-8>
- Li, L., Ryan, J., Ning, Z., Zhang, X., Mayne, J., Lavallée-Adam, M., Stintzi, A., & Figeys, D. (2020). A functional ecological network based on metaproteomics responses of individual gut microbiomes to resistant starches. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3833–3842. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.10.042>
- Li, M., Li, G., Zhu, L., Yin, Y., Zhao, X., Xiang, C., Yu, G., & Wang, X. (2014). Isolation and Characterization of an Agaro-Oligosaccharide (AO)-Hydrolyzing Bacterium from the Gut Microflora of Chinese Individuals. *PLoS ONE*, 9(3).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0091106>
- Li, Z. tao, Hu, G. ao, Zhu, L., Zhao, Z. chao, Yun Jiang, Gao, M. jie, & Zhan, X. bei. (2021). In vitro digestion and fecal fermentation of highly resistant starch rice and its effect on the gut microbiota. *Food Chemistry*, 361, 130095.  
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130095>
- Liang, D., Li, N., Dai, X., Zhang, H., & Hu, H. (2021). Effects of different types of potato resistant starches on intestinal microbiota and short-chain fatty acids under in vitro fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(5), 2432–2442.

<https://doi.org/10.1111/IJFS.14873>

Liu, L., Fu, C., & Li, F. (2019). Acetate Affects the Process of Lipid Metabolism in Rabbit Liver, Skeletal Muscle and Adipose Tissue. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, *9*(10). <https://doi.org/10.3390/ANI9100799>

Louis, P., Duncan, S. H., McCrae, S. I., Millar, J., Jackson, M. S., & Flint, H. J. (2004). Restricted Distribution of the Butyrate Kinase Pathway among Butyrate-Producing Bacteria from the Human Colon. *Journal of Bacteriology*, *186*(7), 2099–2106. <https://journals.asm.org/journal/jb>

Louis, P., & Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, *294*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x>

Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>

Lu, Z., Shen, H., & Shen, Z. (2019). Effects of Dietary-SCFA on Microbial Protein Synthesis and Urinal Urea-N Excretion Are Related to Microbiota Diversity in Rumen. *Frontiers in Physiology*, *0*, 1079. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.01079>

Luo, Y., Zhang, L., Li, H., Smidt, H., Wright, A.-D. G., Zhang, K., Ding, X., Zeng, Q., Bai, S., Wang, J., Li, J., Zheng, P., Tian, G., Cai, J., & Chen, D. (2017). Different Types of Dietary Fibers Trigger Specific Alterations in Composition and Predicted Functions of Colonic Bacterial Communities in BALB/c Mice. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 966. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00966>

Lyte, M., Chapel, A., Lyte, J. M., Ai, Y., Proctor, A., Jane, J.-L., & Phillips, G. J. (2016). Resistant Starch Alters the Microbiota-Gut Brain Axis: Implications for Dietary



Modulation of Behavior. *PLoS ONE*, 11(1), e0146406.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0146406>

Magallanes-Cruz, P. A., Flores-Silva, P. C., & Bello-Perez, L. A. (2017). Starch Structure Influences Its Digestibility: A Review. *Journal of Food Science*, 82(9), 2016–2023.

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13809>

Martínez, I., Kim, J., Duffy, P. R., Schlegel, V. L., & Walter, J. (2010). Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects. *PLoS ONE*, 5(11), e15046.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015046>

McDonald, D., Clemente, J. C., Kuczynski, J., Rideout, J. R., Stombaugh, J., Wendel, D., Wilke, A., Huse, S., Hufnagle, J., Meyer, F., Knight, R., & Caporaso, J. G. (2012). The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience*, 1(1), 2047-217X-1–7. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-7>

McKinney, W. (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. En S. van der Walt & J. Millman (Eds.), *Proceedings of the 9th Python in Science Conference* (pp. 51–56).

Meenu, M., & Xu, B. (2019). A critical review on anti-diabetic and anti-obesity effects of dietary resistant starch. En *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 59, Número 18, pp. 3019–3031). Taylor & Francis.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1481360>

Ménard, O., Picque, D., & Dupont, D. (2015). The DIDGI System. En *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 73–81). Springer, Cham.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_8)

- Menni, C., Jackson, M. A., Pallister, T., Steves, C. J., Spector, T. D., & Valdes, A. M. (2017). Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. *International Journal of Obesity*, *41*(7), 1099–1105. <https://doi.org/10.1038/IJO.2017.66>
- Naguleswaran, S., Li, J., Vasanthan, T., & Bressler, D. (2011). Distribution of Granule Channels, Protein, and Phospholipid in Triticale and Corn Starches as Revealed by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Cereal Chemistry*, *88*(1), 87–94. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-04-10-0062>
- Nakanishi, N., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Sugimoto, N., & Tobe, T. (2009). Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, *155*(2), 521–530. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.023499-0>
- Nasrin, T. A. A., & Anal, A. K. (2014). Enhanced oxidative stability of fish oil by encapsulating in culled banana resistant starch-soy protein isolate based microcapsules in functional bakery products. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(8), 5120–5128. <https://doi.org/10.1007/S13197-014-1606-1>
- Panek, M., Čipčić Paljetak, H., Barešić, A., Perić, M., Matijašić, M., Lojkić, I., Bender, D. V., Krznarić, Ž., & Verbanac, D. (2018). Methodology challenges in studying human gut microbiota-Effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23296-4>
- Park, E. Y., Baik, B. K., & Lim, S. T. (2009). Influences of temperature-cycled storage on retrogradation and in vitro digestibility of waxy maize starch gel. *Journal of Cereal Science*, *50*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.JCS.2009.02.004>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D.,

- Brucher, M., Perrot, M., & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of machine learning research*, 12(Oct), 2825–2830.
- Pineda Cruz, D. N. (2019). *Efecto de la temperatura y humedad sobre la estructura del almidón retrogradado*. CICATA IPN Querétaro.
- Poeker, S. A., Geirnaert, A., Berchtold, L., Greppi, A., Krych, L., Steinert, R. E., de Wouters, T., & Lacroix, C. (2018). Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS). *Scientific Reports*, 8(1), 4318. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22438-y>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 5(3), e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glockner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*, 35(21), 7188–7196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1219>
- Robeson, M. S., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2020). RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.05.326504>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open

source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

- Romano, A., Mackie, A., Farina, F., Aponte, M., Sarghini, F., & Masi, P. (2016). Characterization, in vitro digestibility and expected glycemic index of commercial starches as uncooked ingredients. *Journal of Food Science and Technology*, 53(12), 4126–4134. <https://doi.org/10.1007/S13197-016-2375-9>
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2006). Resistant Starch-A Review. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x>
- Sam, Q. H., Chang, M. W., & Chai, L. Y. A. (2017). The fungal mycobiome and its interaction with gut bacteria in the host. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 330. <https://doi.org/10.3390/ijms18020330>
- Sankhon, A., Amadou, I., & Yao, W.-R. (2013). Application of resistant starch in bread: processing, proximate composition and sensory quality of functional bread products from wheat flour and African locust bean (*Parkia biglobosa*) flour. *Agricultural Sciences*, 04(05), 122–129. <https://doi.org/10.4236/AS.2013.45B023>
- Sasaki, H., Miyakawa, H., Watanabe, A., Nakayama, Y., Lyu, Y., Hama, K., & Shibata, S. (2019). Mice Microbiota Composition Changes by Inulin Feeding with a Long Fasting Period under a Two-Meals-Per-Day Schedule. *Nutrients*, 11(11), 2802. <https://doi.org/10.3390/NU11112802>
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*, 18(1), 190–195. <https://doi.org/10.1038/OBY.2009.167>
- Sen, T., Cawthon, C. R., Ihde, B. T., Hajnal, A., DiLorenzo, P. M., de La Serre, C. B., & Czaja, K. (2017). Diet-driven microbiota dysbiosis is associated with vagal remodeling and

obesity. *Physiology & Behavior*, 173(1), 305–317.

<https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2017.02.027>

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1002533>

Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(3), 379-423,623-656. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>

Shen, Q., Zhao, L., & Tuohy, K. M. (2012). High-level dietary fibre up-regulates colonic fermentation and relative abundance of saccharolytic bacteria within the human faecal microbiota in vitro. *European Journal of Nutrition*, 51(6), 693–705.

<https://doi.org/10.1007/s00394-011-0248-6>

Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), 69–75.

<https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000139>

Si, X., Zhou, Z., Strappe, P., & Blanchard, C. (2017). A comparison of RS4-type resistant starch to RS2-type resistant starch in suppressing oxidative stress in high-fat-diet-induced obese rats. *Food and Function*, 8(1), 232–240.

<https://doi.org/10.1039/c6fo01225f>

Sonnenburg, E. D., Smits, S. A., Tikhonov, M., Higginbottom, S. K., Wingreen, N. S., & Sonnenburg, J. L. (2016). Diet-induced extinction in the gut microbiota compounds over generations. *Nature*, 529(7585), 212–215.

<https://doi.org/10.1038/NATURE16504>

Sze, M. A., & Schloss, P. D. (2016). Looking for a signal in the noise: Revisiting obesity and

the microbiome. *mBio*, 7(4), e01018-16. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01018-16>

Takagi, R., Sasaki, K., Sasaki, D., Fukuda, I., Tanaka, K., Yoshida, K., Kondo, A., & Osawa, R. (2016). A single-batch fermentation system to simulate human colonic microbiota for high-throughput evaluation of prebiotics. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160533>

Teichmann, J., & Cockburn, D. W. (2021). In vitro Fermentation Reveals Changes in Butyrate Production Dependent on Resistant Starch Source and Microbiome Composition. *Frontiers in Microbiology*, 0, 976. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.640253>

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch - Composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>

Thøgersen, R., Castro-Mejía, J. L., Sundekilde, U. K., Hansen, L. H., Hansen, A. K., Nielsen, D. S., & Bertram, H. C. (2018). Ingestion of an Inulin-Enriched Pork Sausage Product Positively Modulates the Gut Microbiome and Metabolome of Healthy Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(19), 1800608. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201800608>

Tian, T., Zhang, X., Luo, T., Wang, D., Sun, Y., & Dai, J. (2021). Effects of Short-Term Dietary Fiber Intervention on Gut Microbiota in Young Healthy People. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 14, 3507–3516. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S313385>

Tomita, R., Igarashi, S., Ikeda, T., Sugito, K., Sakurai, K., Fujisaki, S., Koshinaga, T., & Shibata, M. (2011). Study of segmental colonic transit time in healthy men. *Hepato-Gastroenterology*, 58(110–111), 1519–1522. <https://doi.org/10.5754/HGE10849>

- Tsitko, I., Wiik-Miettinen, F., Mattila, O., Rosa-Sibakov, N., Seppänen-Laakso, T., Maukonen, J., Nordlund, E., & Saarela, M. (2019). A small in vitro fermentation model for screening the gut microbiota effects of different fiber preparations. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8), 1925. <https://doi.org/10.3390/ijms20081925>
- Usta-Gorgun, B., & Yilmaz-Ersan, L. (2020). Short-chain fatty acids production by Bifidobacterium species in the presence of salep. *Electronic Journal of Biotechnology*, *47*, 29–35. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2020.06.004>
- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., & Verstraete, W. (2004). Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, *51*(1), 143–153. <https://doi.org/10.1016/J.FEMSEC.2004.07.014>
- van de Wiele, T., van den Abbeele, P., Ossieur, W., Possemiers, S., & Marzorati, M. (2015). The simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME®). En *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 305–317). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_27)
- Venegas, D. P., De La Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H. J. M., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short chain fatty acids (SCFAs) mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*, 277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>
- Vital, M., White, R. A., Naito, Y., Neoh, H.-M., Osman, M.-A., Mutalib, N.-S. A., Chin, S.-F., & Jamal, R. (2018). 16S rRNA Gene Sequencing for Deciphering the Colorectal Cancer Gut Microbiome: Current Protocols and Workflows. *Frontiers in Microbiology*, *1*, 767. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00767>
- Walker, A. W., Duncan, S. H., Leitch, E. C. M., Child, M. W., & Flint, H. J. (2005). pH and

Peptide Supply Can Radically Alter Bacterial Populations and Short-Chain Fatty Acid Ratios within Microbial Communities from the Human Colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3692–3700.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3692-3700.2005>

Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., & Flint, H. J. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota: microbe-microbe and microbe-host interactions. *The ISME Journal*, 5, 220–230. <https://doi.org/10.1038/ISMEJ.2010.118>

Wang, H.-B., Wang, P.-Y., Wang, X., Wan, Y.-L., & Liu, Y.-C. (2012). Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction Protein Claudin-1 Transcription. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(12), 3126–3135. <https://doi.org/10.1007/S10620-012-2259-4>

Wang, J., Hu, P., Chen, Z., Liu, Q., & Wei, C. (2017). Progress in high-amylose cereal crops through inactivation of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 8, 469. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00469>

Wang, L., Jacobs, J. P., Lagishetty, V., Yuan, P.-Q., Wu, S. V., Million, M., Jr., J. R. R., Pisegna, J. R., & Taché, Y. (2017). High-protein diet improves sensitivity to cholecystokinin and shifts the cecal microbiome without altering brain inflammation in diet-induced obesity in rats. *American Journal of Physiology*, 313(4), R473–R486. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00105.2017>

Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., & Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568–585. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12143>

Wang, W., Fang, D., Zhang, H., Xue, J., Wangchuk, D., Du, J., & Jiang, L. (2020). Sodium



Butyrate Selectively Kills Cancer Cells and Inhibits Migration in Colorectal Cancer by Targeting Thioredoxin-1. *OncoTargets and therapy*, 13, 4691.

<https://doi.org/10.2147/OTT.S235575>

Weickert, M. O., Roden, M., Isken, F., Hoffmann, D., Nowotny, P., Osterhoff, M., Blaut, M., Alpert, C., Gögebakan, Ö., Bumke-Vogt, C., Mueller, F., Machann, J., Barber, T. M., Petzke, K. J., Hierholzer, J., Hornemann, S., Kruse, M., Illner, A.-K., Kohl, A., ... Pfeiffer, A. F. (2011). Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 94(2), 459–471. <https://doi.org/10.3945/AJCN.110.004374>

Xie, F., Yu, L., Su, B., Liu, P., Wang, J., Liu, H., & Chen, L. (2009). Rheological properties of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Journal of Cereal Science*, 49(3), 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.01.002>

Xu, P., Li, M., Zhang, J., & Zhang, T. (2012). Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children. *BMC Microbiology*, 12, 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-283>

Xu, Q., Bai, F., Chen, N., & Bai, G. (2017). Gene modification of the acetate biosynthesis pathway in *Escherichia coli* and implementation of the cell recycling technology to increase L-tryptophan production. *PLoS ONE*, 12(6), e0179240. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0179240>

Yadav, B. S., Sharma, A., & Yadav, R. B. (2009). Studies on effect of multiple heating/cooling cycles on the resistant starch formation in cereals, legumes and tubers. <http://dx.doi.org/10.1080/09637480902970975>, 60(SUPPL.4), 258–272. <https://doi.org/10.1080/09637480902970975>

Yang, J., Bindels, L. B., Munoz, R. R. S., Martínez, I., Walter, J., Ramer-Tait, A. E., & Rose, D. J. (2016). Disparate Metabolic Responses in Mice Fed a High-Fat Diet Supplemented

with Maize-Derived Non-Digestible Feruloylated Oligo- and Polysaccharides Are Linked to Changes in the Gut Microbiota. *PLoS ONE*, *11*(1), e0146144.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0146144>

Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P., & Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE*, *13*(10), e0206428.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206428>

Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D643–D648.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>

Zamora-Gasga, V. M., Loarca-Piña, G., Vázquez-Landaverde, P. A., Ortiz-Basurto, R. I., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). In vitro colonic fermentation of food ingredients isolated from Agave tequilana Weber var. azul applied on granola bars. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(2), 766–772.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.032>

Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2012). *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME Journal*, *6*(8), 1535–1543. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.4>

Zhang, H., Sun, J., Liu, X., Hong, C., Zhu, Y., Liu, A., Li, S., Guo, H., & Ren, F. (2013). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC01 positively modulates intestinal microflora in healthy young adults. *Journal of Microbiology*, *51*(6), 777–782.

<https://doi.org/10.1007/S12275-013-3279-2>

Zhao, R., Chu, L., Wang, Y., Song, Y., Liu, P., Li, C., Huang, J., & Kang, X. (2017). Application of packed-fiber solid-phase extraction coupled with GC–MS for the determination of

short-chain fatty acids in children's urine. *Clinica Chimica Acta*, 468, 120–125.

<https://doi.org/10.1016/J.CCA.2017.02.016>

Zhou, X., Zhang, Z., Huang, F., Yang, C., & Huang, Q. (2020). In vitro digestion and fermentation by human fecal microbiota of polysaccharides from flaxseed.

*Molecules*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194354>

Ziętek, M., Celewicz, Z., & Szczuko, M. (2021). Short-chain fatty acids, maternal microbiota and metabolism in pregnancy. *Nutrients*, 13(4), 1–20.

<https://doi.org/10.3390/nu13041244>

Zihler Berner, A., Fuentes, S., Dostal, A., Payne, A. N., Vazquez Gutierrez, P., Chassard, C., Grattepanche, F., De Vos, W. M., Lacroix, C., & Sanz, Y. (2013). Novel Polyfermentor Intestinal Model (PolyFermS) for Controlled Ecological Studies: Validation and Effect of pH. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077772>

## VI. Anexos

---

### Anexo 1. Formato de consentimiento informado

Querétaro, Qro., diciembre de 2020.

#### Formato de consentimiento informado

##### Fermentabilidad de almidón resistente tipo 3 en sistema colónico *in vitro* y análisis de la comunidad microbiana implicada

Este formulario de consentimiento informado se dirige a los pacientes de consulta de nutrición, a quienes se les invita a participar en el proyecto de investigación que forma parte de una tesis de maestría.

**Nombre del investigador:** Ing. Viridiana Obregón Flores

**Nombre de la organización:** Instituto Politécnico Nacional, CICATA unidad Querétaro

**Directores de tesis:** Dra. Regina Hernández Gama, Dr. Gonzalo Velázquez de la Cruz

Este documento de consentimiento informado tiene dos partes:

- Información sobre el estudio
- Formulario de consentimiento para firmar si está de acuerdo en participar

#### PARTE I: Información

##### Introducción

En el Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA unidad Querétaro) estamos investigando acerca de los almidones resistentes, que son un tipo de

carbohidratos que se encuentran en múltiples alimentos, por ejemplo, maíz o papa. Los almidones resistentes son ingredientes de muchos productos alimentarios, por ejemplos de panes o yogures. Al consumirlos pueden funcionar como fibra dietética y se han demostrado algunos beneficios a la salud de un consumo apropiado de fibra diariamente.

### **Propósito**

El consumo de fibra es importante para el cuerpo humano, ya que en el cuerpo se modifica en compuestos que son benéficos para la salud. Existen diferentes tipos de fibra, uno de ellos son los almidones resistentes, que por su estructura no se digieren en la boca, estómago o intestino delgado, sino que llegan al intestino grueso, donde hay microorganismos (como bacterias y hongos) que aprovechan estos almidones. Si hay un buen consumo de fibra, habrá un efecto sobre la composición de microorganismos del intestino grueso. Particularmente, se quieren estudiar dos almidones resistentes, conocidos como tipo 2 y tipo 3, ambos son comestibles, y se determinará en qué proporción brindan beneficio como fibra por su efecto sobre la composición de microorganismos del intestino grueso.

Para realizar este estudio, se ha propuesto un sistema que simule las condiciones del intestino grueso en el laboratorio.

Le invito a participar de esta investigación, recuerde que usted puede informarse y consultar conmigo cualquier duda referente a este estudio antes de tomar la decisión.

### **Tipo de intervención de investigación**

Esta investigación incluirá una única toma de muestra de materia fecal después de registrar su dieta durante 21 días.

### **Selección de participantes**

La invitación es dirigida a adultos jóvenes de entre 20 y 40 años.

No es posible participar si usted: es fumador, consume alcohol en una cantidad mayor a 5 copas o cervezas a la semana, tiene problemas gastrointestinales, está embarazada o tiene sospecha de estarlo (en el caso de que sea mujer) y ha consumido antibióticos (penicilina,

amoxicilina, ampicilina, oxacilina, cefalexina, ácido clavulánico, neomicina, eritromicina, etc.) en los últimos 3 meses.

### **Participación voluntaria**

Su participación es totalmente voluntaria. Puede elegir participar o no, e incluso desistir en cualquier momento.

La atención que le brinda la nutrióloga seguirá siendo la misma, no se verán afectados sus derechos.

### **Descripción del proceso**

1. Se utilizará el almidón resistente tipo 2 y tipo 3, almidones que se pueden encontrar comercialmente, y que se utilizan en la industria de alimentos.
2. De estos almidones se tomará la parte que es resistente para ser analizada.
3. Se creará un sistema de fermentación simulando las condiciones del intestino grueso, que consiste en un frasco de vidrio bien cubierto (sin entrada de aire), y contendrá medio de cultivo líquido al cual se añadirá la muestra de materia fecal y el almidón a evaluar. El sistema se incubará a temperatura corporal y a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas se tomarán muestras.
4. Se analizarán estas muestras para identificar los productos de fermentación (ácidos grasos de cadena corta) a través de la técnica analítica CG-EM.
5. También se analizarán las muestras para evaluar cuáles son los microorganismos que se vean enriquecidos después de estar en contacto con cada almidón.

Su participación consistirá en la aportación de la materia fecal una sola muestra, que servirá como comunidad de microorganismos que fermentarán los almidones. Usted deberá registrar su dieta durante veintiún días (21 días), los datos obtenidos de su dieta diaria, nos servirá para dar un panorama general de los microorganismos que habitan en su colon. Una vez transcurrido este plazo, en el día 21 usted colocará una pequeña cantidad de materia fecal en un frasco como este, lo cerrará bien e inmediatamente se pondrá en contacto conmigo para recoger la muestra. Una vez en el laboratorio, la muestra será congelada a -20 °C hasta que se realice la selección de muestras que consistirá en una prueba de coproparasitoscópico y evaluación de características físicas previo a la experimentación. Esto implica que algunas muestras pueden ser descartadas durante estas evaluaciones, por

lo que no se puede garantizar que todas las muestras serán analizadas en la composición de microbiota.



### **Duración**

El proyecto tiene duración de dos años, sin embargo, usted sólo participará en la donación de materia fecal, que en conjunto con el registro de su dieta, será de 21 días.

### **Efectos secundarios**

Ningún efecto secundario

### **Riesgos**

Ningún riesgo

### **Molestias**

Ninguna molestia

### **Beneficios/Incentivos**

Se ofrece el beneficio de una consulta gratis de orientación nutricional con un menú adaptado a sus necesidades nutricionales y nivel de actividad física.

## **Confidencialidad**

No se compartirá la identidad de quien participe en la investigación. La información recopilada por este proyecto se mantendrá confidencial, sólo los investigadores tendrán acceso a ella y no podrán usarla para ningún fin adicional al procesamiento de muestra. Cualquier dato acerca de usted tendrá un código y NO SU NOMBRE, lo que mantendrá su muestra en anonimato.

## **Resultados**

Los resultados obtenidos se compartirán con usted si así lo solicita. Los resultados incluyen un perfil de microbiota intestinal, que es el conjunto de microorganismos presentes en su muestra fecal y que pueden ser analizados en conjunto con su médico familiar o médico tratante.

## **A quién contactar**

Si tiene dudas antes, durante o después de la donación de materia fecal, puede comunicarse con:

Ing. Viridiana Obregón Flores

Cel 442 338 35 23

vobregonf1200@alumno.ipn.mx



**PARTE II: Formulario de consentimiento**

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me han contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera a mi salud o cuidado médico.

**Nombre del Participante** \_\_\_\_\_

**Firma del Participante** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_



## Dictamen aprobatorio firmado por el comité de bioética

C.U., 10 de diciembre de 2020

DIP/802-2020

Dra. Regina Hernández Gama  
Investigadora del CICATA-IPN campus  
Querétaro  
**Presente**

En la reunión del Comité de Ética de Investigación efectuada virtualmente, se evaluó el protocolo de investigación titulado **“Fermentabilidad de almidone resistente tipo 3 en un modelo colónico *in vitro* y análisis de la comunidad microbiana”**. Este Comité considera que su protocolo de investigación **está aprobado éticamente**.

Sin alterar el dictamen, este Comité recomienda que, en el protocolo se indique que el beneficio no es la gratuidad de la consulta nutrimental, sino el resultado del estudio de la microbiota intestinal y el conocimiento sobre la dieta adecuada para contar con una microbiota adecuada para la salud. Recomienda también, evaluar la pertinencia de registrar la dieta durante tres bloques de siete días en vez de un registro de 21 días continuos.

Cabe resaltar que **la Ley federal, la política de la UAQ y la obligación** de este Comité de Ética de Investigación Científica es que los proyectos que se realicen respeten los derechos y el bienestar de los participantes humanos, individual y en comunidad, no humanos, bioseguridad y medio ambiente.

Por otra parte, de acuerdo a recomendaciones de la Organización Mundial de Salud respecto a la actuación de los Comités de Ética en Investigación, se le sugiere incluir en las publicaciones o en la difusión de el producto de su investigación que su protocolo fue revisado y aprobado en la fecha del presente oficio.

Los miembros del Comité dictaminaron el día 10 de diciembre de 2020, en reunión virtual, cuyos integrantes fueron: Dr. Bernardo García Camino, Presidente, Dra. Pamela Garbus, representante de la Facultad de Psicología, Dra. Hilda Romero Zepeda, representante de la Facultad de Ingeniería, Dra. Beatriz Garza González, representante de la Facultad de Lenguas y Letras, Dra. Lina García Mier, representante externa y Dra. María de la Luz Reyes Vega, Secretaria.

**“EDUCO EN LA VERDAD Y EN EL HONOR”**

  
Dr. Bernardo García Camino  
Presidente



Consecutivo  
BGC/mlrv/mj

### Anexo 3. Pipeline utilizado para el análisis bioinformático

```
//Activando el ambiente qiime2                                --i-demux demux-joined.qza \  
                                                             --o-filtered-sequences demux-joined-filtered.qza  
                                                             \  
conda activate qiime2-2021.4                                --o-filter-stats demux-joined-filter-stats.qza  
                                                             \  
//Creacion del archivo de manifiesto                          //Calidad, eliminación de ruido  
  
vi manifiesto.tsv  
//Importación de datos  
  
qiime tools import \  
  --type  
'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \  
  --input-path testmicrob/manifiesto2 \  
  --output-path demux-sequences.qza \  
  --input-format  
PairedEndFastqManifestPhred33V2  
  
//Estadísticas del calidad  
  
qiime demux summarize \  
  --i-data demux-sequences.qza \  
  --o-visualization demux-sequences.qzv  
  
// Unión de lecturas (sólo para deblur)  
  
qiime vsearch join-pairs \  
  --i-demultiplexed-seqs demux-sequences.qza \  
  --o-joined-sequences demux-joined.qza  
  
qiime demux summarize \  
  --i-data demux-joined.qza \  
  --o-visualization demux-joined.qzv  
  
qiime deblur visualize-stats \  
  --i-deblur-stats deblur-stats.qza \  
  --o-visualization deblur-stats.qzv  
  
//Filtrado  
  
qiime quality-filter q-score \  
  --i-demux demux-joined.qza \  
  --o-filtered-sequences demux-joined-filtered.qza  
  \  
  --o-filter-stats demux-joined-filter-stats.qza  
  \  
  --p-trim-length 403 \  
  --o-representative-sequences rep-seqs-deblur.qza  
  \  
  --o-table table-deblur.qza \  
  --p-sample-stats \  
  --o-stats deblur-stats.qza  
  
qiime feature-table summarize \  
  --i-table table-deblur.qza \  
  --o-visualization table-deblur.qzv  
  
qiime feature-table tabulate-seqs \  
  --i-data rep-seqs-deblur.qza \  
  --o-visualization rep-seqs-deblur.qzv  
  
qiime metadata tabulate \  
  --m-input-file demux-joined-filter-stats.qza \  
  --o-visualization demux-joined-filter-stats.qzv  
  
qiime deblur visualize-stats \  
  --i-deblur-stats deblur-stats.qza \  
  --o-visualization deblur-stats.qzv  
  
//Estadísticas después de filtrado  
  
qiime feature-table summarize \  
  --i-table deblur-stats.qza \  
  --o-visualization deblur-stats.qzv  
  
//Renombramiento de tablas por practicidad  
  
mv table-deblur.qza table.qza  
mv rep-seqs-deblur.qza rep-seqs.qza
```

//FeatureTable and FeatureData summaries

```
qiime feature-table summarize \  
  --i-table table.qza \  
  --o-visualization table.qzv \  
  --m-sample-metadata-file metadata4.tsv
```

```
qiime feature-table tabulate-seqs \  
  --i-data rep-seqs.qza \  
  --o-visualization rep-seqs.qzv
```

//Árbol filogenético para análisis de diversidad

```
qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree \  
  --i-sequences rep-seqs.qza \  
  --o-alignment aligned-rep-seqs.qza \  
  --o-masked-alignment masked-aligned-rep-seqs.qza \  
  --o-tree unrooted-tree.qza \  
  --o-rooted-tree rooted-tree.qza
```

//Métricas con profundidad de muestreo seleccionada

```
qiime diversity core-metrics-phylogenetic \  
  --i-phylogeny rooted-tree.qza \  
  --i-table table.qza \  
  --p-sampling-depth 40635 \  
  --m-metadata-file metadata4.tsv \  
  --output-dir core-metrics-results
```

//Métricas:

Diversidad Alfa

Shannon's diversity index (a quantitative measure of community richness)

Observed Features (a qualitative measure of community richness)

Faith's Phylogenetic Diversity (a qualitative measure of community richness that incorporates phylogenetic relationships between the features)

Evenness (or Pielou's Evenness; a measure

of community evenness)

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
  --i-alpha-diversity core-metrics-results/faith_pd_vector.qza \  
  --m-metadata-file metadata4.tsv \  
  --o-visualization core-metrics-results/faith-pd-group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
  --i-alpha-diversity core-metrics-results/evenness_vector.qza \  
  --m-metadata-file metadata4.tsv \  
  --o-visualization core-metrics-results/evenness-group-significance.qzv
```

// Curvas de rarefacción

```
qiime diversity alpha-rarefaction \  
  --i-table table.qza \  
  --i-phylogeny rooted-tree.qza \  
  --p-max-depth 46800 \  
  --m-metadata-file metadata4.tsv \  
  --o-visualization alpha-rarefaction.qzv
```

//Significancia del índice de Shannon

```
qiime diversity alpha-group-significance \  
  --i-alpha-diversity core-metrics-results/shannon_vector.qza \  
  --m-metadata-file metadata4.tsv \  
  --o-visualization core-metrics-results/shannon-significance.qzv
```

Diversidad Beta

Bray-Curtis distance (a quantitative measure of community dissimilarity)

Unweighted UniFrac distance (a qualitative measure of community dissimilarity that incorporates phylogenetic relationships between the features)

```
qiime diversity beta-group-significance \  
  --i-distance-matrix core-metrics-results/bray_curtis_distance_matrix.qza \  
  --m-metadata-file metadata4.tsv \  
  --m-metadata-column Fibra \  
  --o-visualization core-metrics-
```

```

results/bray_curtis_type_significance_Fibra.qzv

qiime emperor plot \
  --i-pcoa core-metrics-
results/bray_curtis_pcoa_results.qza \
  --m-metadata-file metadata4.tsv \
  --p-custom-axes Fibra \
  --o-visualization core-metrics-
results/bray_curtis_emperor-Fibra.qzv

qiime diversity beta-group-significance \
  --i-distance-matrix core-metrics-
results/bray_curtis_distance_matrix.qza \
  --m-metadata-file metadata4.tsv \
  --m-metadata-column Donador \
  --o-visualization core-metrics-
results/bray_curtis_type_significance_Donador.qz
v

qiime emperor plot \
  --i-pcoa core-metrics-
results/bray_curtis_pcoa_results.qza \
  --m-metadata-file metadata4.tsv \
  --p-custom-axes Donador \
  --o-visualization core-metrics-
results/bray_curtis_emperor-Donador.qzv

qiime diversity beta-group-significance \
  --i-distance-matrix core-metrics-
results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \
  --m-metadata-file metadata4.tsv \
  --m-metadata-column Fibra \
  --o-visualization core-metrics-
results/unweighted-unifrac-Fibra-significance.qzv
\
  --p-pairwise

qiime diversity beta-group-significance \
  --i-distance-matrix core-metrics-
results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \
  --m-metadata-file sample-metadata.tsv \
  --m-metadata-column transect-name \
  --o-visualization core-metrics-
results/unweighted-unifrac-transect-name-
significance.qzv \
  --p-pairwise

// Análisis taxonómico

wget \
  -O "silva-138-99-nb-classifier.qza" \
  "https://data.qiime2.org/2021.4/common/silva-
138-99-nb-classifier.qza"

qiime feature-classifier classify-sklearn \
  --i-classifier silva-138-99-nb-classifier.qza \
  --i-reads rep-seqs.qza \
  --o-classification taxonomy.qza

qiime metadata tabulate \
  --m-input-file taxonomy.qza \
  --o-visualization taxonomy.qzv

qiime taxa barplot \
  --i-table table.qza \
  --i-taxonomy taxonomy.qza \
  --m-metadata-file metadata4.tsv \
  --o-visualization taxa-bar-plots.qzv

```

## Anexo 4. Pipeline y análisis bioinformático de eucariotes

```
conda activate qiime2-2021.4

cd MiBebe2

// Se descomprimieron las secuencias
gzip -d S9ARF3_1.fq.gz

//Importación de datos
qiime tools import \
  --type
  'SampleData[PairedEndSequencesWithQuality]' \
  --input-path manifiesto21 \
  --output-path demux-sequences.qza \
  --input-format
  PairedEndFastqManifestPhred33V2

//Estadísticas de calidad

qiime demux summarize \
  --i-data demux-sequences.qza \
  --o-visualization demux-sequences.qzv

//Dada2

qiime dada2 denoise-paired \
  --i-demultiplexed-seqs demux-sequences.qza \
  --p-trim-left-f 0 \
  --p-trim-left-r 0 \
  --p-trunc-len-f 148 \
  --p-trunc-len-r 162 \
  --o-table table.qza \
  --o-representative-sequences rep-seqs.qza \
  --o-denoising-stats denoising-stats.qza

qiime feature-table summarize \
  --i-table table.qza \
  --o-visualization table.qzv

qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data rep-seqs.qza \
  --o-visualization rep-seqs.qzv

qiime metadata tabulate \
  --m-input-file denoising-stats.qza \
  --o-visualization denoising-stats.qzv

//FeatureTable and FeatureData summaries

qiime feature-table summarize \
  --i-table table.qza \
  --o-visualization table.qzv \
  --m-sample-metadata-file metadata.tsv

qiime feature-table tabulate-seqs \
  --i-data rep-seqs.qza \
  --o-visualization rep-seqs.qzv

//Generate a tree for phylogenetic diversity
analyses

qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree \
  --i-sequences rep-seqs.qza \
  --o-alignment aligned-rep-seqs.qza \
  --o-masked-alignment masked-aligned-rep-
  seqs.qza \
  --o-tree unrooted-tree.qza \
  --o-rooted-tree rooted-tree.qza

//Diversidad alfa

qiime diversity core-metrics-phylogenetic \
  --i-phylogeny rooted-tree.qza \
  --i-table table.qza \
  --p-sampling-depth 1996 \
  --m-metadata-file metadata.tsv \
  --output-dir core-metrics-results

qiime diversity alpha-group-significance \
```

```
--i-alpha-diversity core-metrics-
results/faith_pd_vector.qza \
--m-metadata-file metadata4.tsv \
--o-visualization core-metrics-results/faith-pd-
group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-group-significance \
--i-alpha-diversity core-metrics-
results/evenness_vector.qza \
--m-metadata-file metadata4.tsv \
--o-visualization core-metrics-results/evenness-
group-significance.qzv
```

```
qiime diversity alpha-rarefaction \
--i-table table.qza \
--i-phylogeny rooted-tree.qza \
--p-max-depth 4148 \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--o-visualization alpha-rarefaction.qzv
```

// Diversidad Beta

```
qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core-metrics-
results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file metadata4.tsv \
--m-metadata-column Fibra \
--o-visualization core-metrics-
results/unweighted-unifrac-Fibra-significance.qzv \
--p-pairwise
```

```
qiime diversity beta-group-significance \
--i-distance-matrix core-metrics-
results/unweighted_unifrac_distance_matrix.qza \
--m-metadata-file sample-metadata.tsv \
--m-metadata-column transect-name \
--o-visualization core-metrics-
results/unweighted-unifrac-transect-name-
significance.qzv \
--p-pairwise
```

Taxonomic analysis

```
wget \
-O "sh_qiime_release_all_10.05.2021.tgz" \
```

```
"https://files.plutof.ut.ee/public/orig/48/29/4829D
91F763E20F0F4376A60AA53FC9FBE6029A7D
1BDC1B45347DD64EDE5D560.tgz"
```

```
tar -xzf sh_qiime_release_all_10.05.2021.tgz
```

```
qiime tools import \
--type FeatureData[Sequence] \
--input-path
sh_refs_qiime_ver8_99_all_10.05.2021.fasta \
--output-path unite-ver8-
seqs_99_all_10.05.2021.qza
```

```
qiime tools import \
--type FeatureData[Taxonomy] \
--input-path
sh_taxonomy_qiime_ver8_99_all_10.05.2021.txt \
--output-path unite-ver8-
taxonomy_99_all_10.05.2021.qza \
--input-format HeaderlessTSVTaxonomyFormat
```

```
qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes \
--i-reference-reads unite-ver8-
seqs_99_all_10.05.2021.qza \
--i-reference-taxonomy unite-ver8-
taxonomy_99_all_10.05.2021.qza \
--o-classification unite-ver8-99-all-classifier-
10.05.2021.qza
```

```
qiime feature-classifier classify-sklearn \
--i-classifier unite-ver8-99-all-classifier-
10.05.2021.qza \
--i-reads rep-seqs.qza \
--o-classification taxonomy.qza
```

```
qiime metadata tabulate \
--m-input-file taxonomy.qza \
--o-visualization taxonomy.qzv
```

```
qiime taxa barplot \
--i-table table.qza \
--i-taxonomy taxonomy.qza \
--m-metadata-file metadata.tsv \
--o-visualization taxa-bar-plots.qzv
```

De las muestras de los donadores, sólo las correspondientes al donador 3 pudieron ser secuenciadas para la identificación de hongos, tanto la muestra de materia fecal antes de la fermentación como después de los tratamientos. A diferencia de los otros participantes, este donador es del género femenino con un IMC de 26.4, apenas rebasando el normopeso. En su registro alimenticio de 21 días, reportó un mayor consumo de botanas y bebidas procesadas/azucaradas con respecto a los otros dos participantes, así como un mayor consumo de alimentos procesados. Por otro lado, en la taxonomía bacteriana a nivel de género, fue en las muestras de este donador donde hubo un menor incremento de *Escherichia-Shigella* después del tratamiento con inulina y AR3, pues prácticamente se mantuvo estable después de las fermentaciones. Se recomienda hacer futuros estudios con respecto a donadores con sobrepeso para conocer el impacto del AR3 bajo estas condiciones.

Es probable que los tratamientos hayan favorecido la abundancia de hongos después de las fermentaciones, aunque no es concluyente, ya que no se observó lo mismo con el participante 1 y 2.

Al igual que el análisis bioinformático de las secuencias a partir del marcador ribosomal 16S, se construyó un *pipeline* para evaluar los eucariotes, entre estos, hongos, a través del ITS2 de las muestras del donador 3, las cuales sí fueron amplificadas.

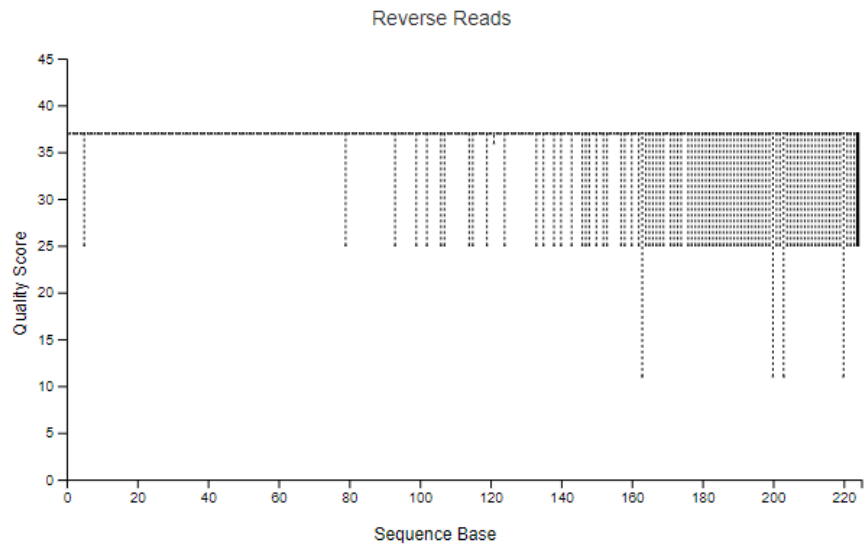
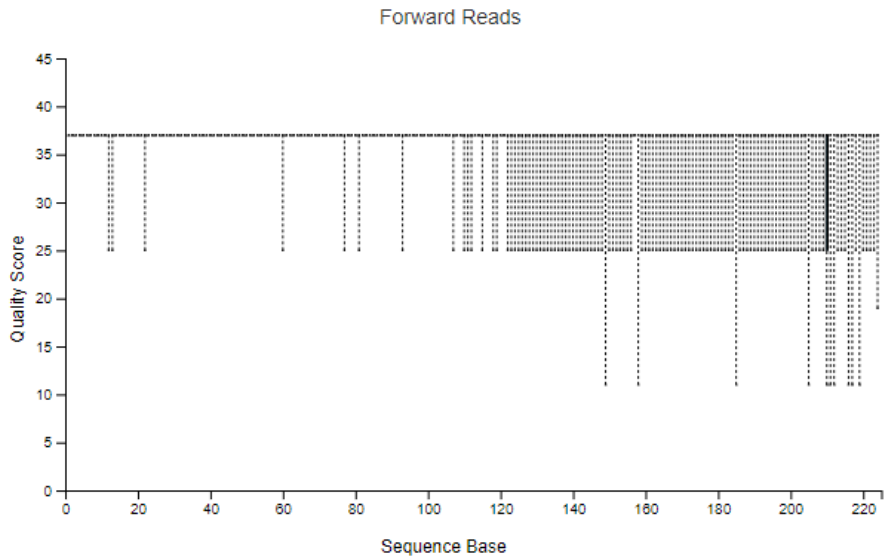
El filtrado de calidad se realizó con DADA2, haciendo recortes al final de las lecturas *forward* y *reverse* para eliminar las bases de menor calidad.

Posteriormente se realizó un análisis de diversidad  $\alpha$ , así como el análisis taxonómico.

La cantidad de características o posibles taxones fue de 323.



**Gráficos de calidad (puntuación phred) en lecturas *forward* y *reverse***

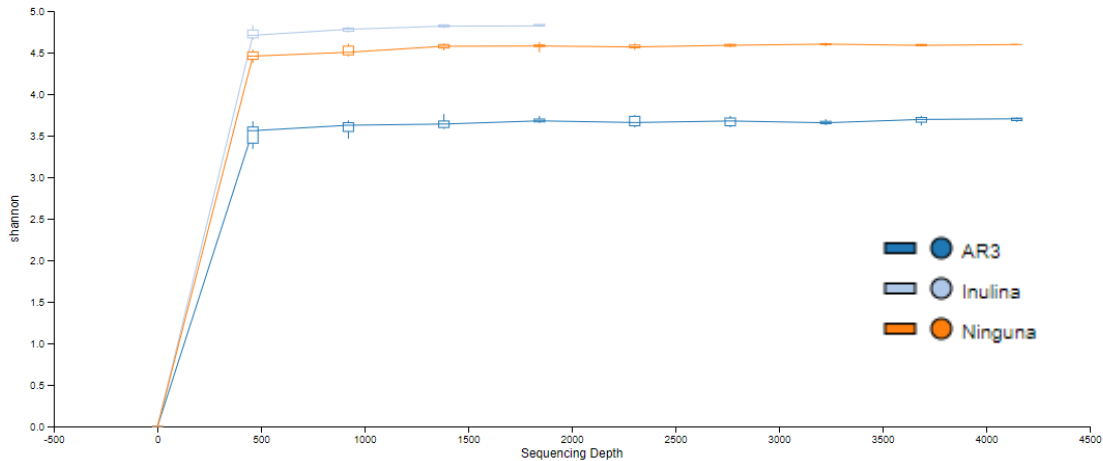


**Características encontradas**

Table summary

Metric	Sample
Number of samples	3
Number of features	323
Total frequency	15,279

### Índice de Shannon, diversidad alfa

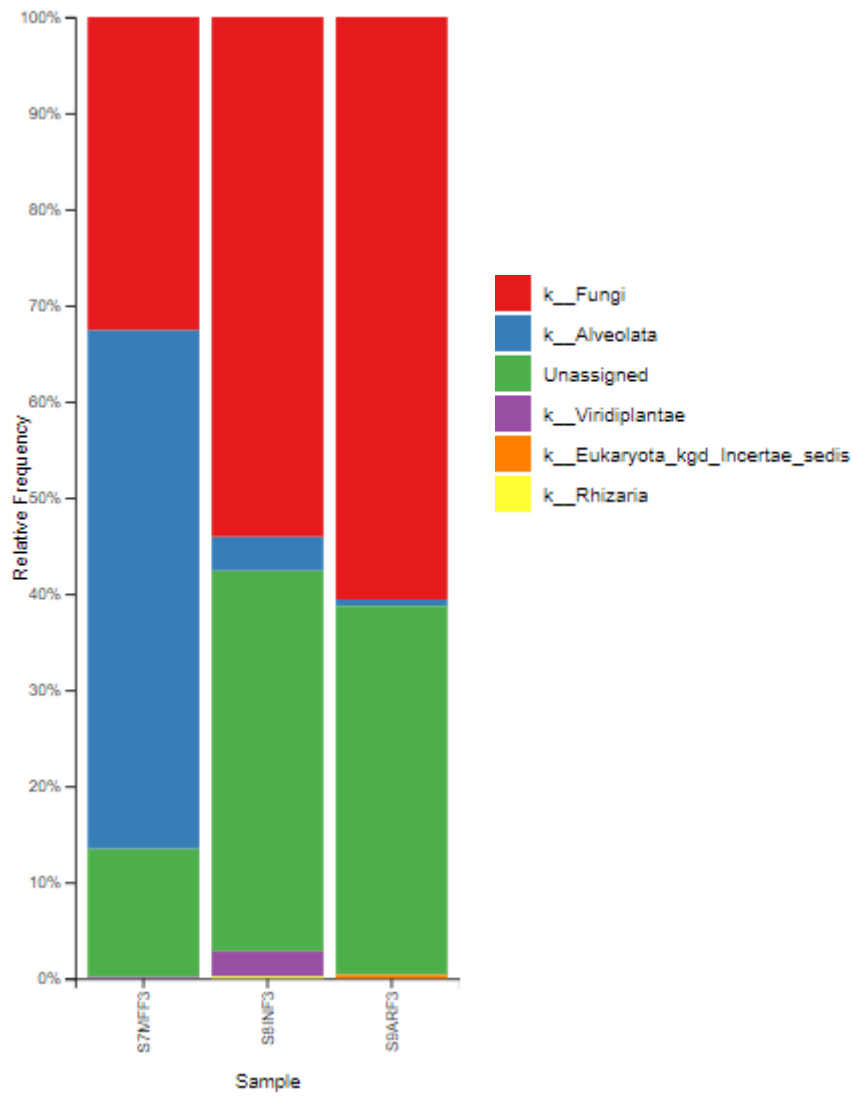


### Taxonomía de eucariotes en la muestra del participante 3 a nivel de reino y género

Entre los microorganismos resultantes a nivel de reino, no sólo se encontraron hongos sino también otros eucariotes, posiblemente derivados de células de alimentos como vegetales, frutos o incluso células del mismo donador. Sin embargo, fue de interés conocer el impacto sobre los hongos.

Los géneros que se vieron incrementados por la fermentación de inulina y AR3 fueron del *phylum Ascomycota*, como *Fusarium*, *Cladosporium*, *Pseudogymnoascus*, *Zopfiella*, *Pyrenochaetopsis* y *Diutina*, en mayor proporción.

Otro taxón del reino *Alveolata*, orden *Oligohymenophorea* considerado como patógeno, se vio disminuido después de las fermentaciones (color rojo), mientras que otro taxón no identificado dentro de los niveles taxonómicos incrementó después de los tratamientos (color azul). El segundo gráfico muestra estos resultados.



## Taxonomía de eucariotes en la muestra del participante 3 a nivel de género

