Caracterización de homopolisacáridos y evaluación de su fermentación *in vitro*

Denisse Lorena Rosales Velasco

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Caracterización de homopolisacáridos y evaluación de su fermentación *in vitro*

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Denisse Lorena Rosales Velasco

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Caracterización de homopolisacáridos y evaluación de su fermentación *in vitro*

Denisse Lorena Rosales Velasco

Resumen. Las fibras dietéticas son investigadas debido a que incrementan sustancialmente la diversidad microbiana reduciendo la aparición de enfermedades. La diversidad de enlaces dentro de los homopolisacáridos permite la especialización entorno a la coexistencia no competitiva de organismos. Los objetivos de este estudio fueron: determinar propiedades estructurales de dextrinas y glucanos, evaluar tasa de fermentación *in vitro* e identificar los principales microorganismos responsables del proceso fermentativo. Los homopolisacáridos se incubaron con heces fecales en iguales concentraciones. Se midió pH y producción de gas a 4, 8, 12, 24, 36 y 48 horas. Estas muestras fueron preparadas para el análisis de ácidos grasos de cadena corta, utilizando un estándar interno. El ADN extraído de las muestras fue procesado para la identificación de microorganismos presentes en cada tratamiento. Se identificaron 13 enlaces en los homopolisacáridos evaluados con mayor diversidad en muestras elaboradas a partir de maíz. Se evidenció un crecimiento microbiológico por la reducción de pH y la producción de gas. Se promovió el crecimiento de *Prevotella copri*, *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, y *Lactobacillus*. En conclusión, los homopolisacáridos provenientes de maíz presentaron comportamiento similar entre sí en todas las evaluaciones a diferencia de los homopolisacáridos provenientes de tapioca y avena. Estos resultados indicaron el importante papel que desempeñan las fibras dietéticas en la modulación de la microbiota intestinal y la nutrición humana.

Palabras clave: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, polisacáridos, secuenciación del ADN.

Abstract. Dietary fibers are investigated because they substantially increase the microbial diversity reducing the appearance of diseases. Linkage diversity within homopolysaccharides allows specialization around the non-competitive coexistence of organisms. The objectives of this study were to determine the structural properties of dextrins and glucans, evaluate the *in vitro* fermentation rate and identify the main microorganisms responsible for the fermentation process. Homopolysaccharides were incubated with feces in equal concentrations. Measurements of pH and gas production were conducted at 4, 8, 12, 24, 36 and 48 hours. Samples were prepared for short chain fatty acids analysis using an internal standard. DNA extracted from samples was processed for microorganism identification present in each treatment. Thirteen links were identified in the homopolysaccharides evaluated with greater diversity in samples prepared from corn. Microbial growth was evidenced by the reduction of pH and gas production. The growth of *Prevotella copri*, *Lachnospiraceae*, *Roseburia Ruminococcus*, and *Lactobacillus* was promoted. In conclusion, homopolysaccharides from corn presented similar behavior between them in all evaluations, unlike homopolysaccharides from tapioca and oats. These results indicated the important role played by dietary fibers in the modulation of intestinal microbiome and human nutrition.

Key words: *Bacteroidetes*, DNA sequencing, *Firmicutes*, polysaccharides.

CONTENIDO

Portadilla..... i
Página de firmas ii
Resumen iii
Contenido iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos..... v

1. INTRODUCCIÓN..... 1

2. MATERIALES Y MÉTODOS..... 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 7

4. CONCLUSIONES 17

5. RECOMENDACIONES 18

6. LITERATURA CITADA..... 19

7. ANEXOS 23

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Contenido de humedad de dextrinas y glucanos. 7
2. Medición de pH a través del tiempo de dextrinas y glucanos. 10
3. Medición de producción de gas (ml) de dextrinas y glucanos. 11
4. Porcentaje de filos de microorganismos encontrados en dextrinas y glucanos. 15

Figuras Página

1. Distribución de enlaces en porcentajes. 8
2. Producción de acetato. 12
3. Producción de propionato. 13
4. Producción de butirato. 14
5. Microorganismos identificados en las muestras. 16

Anexos Página

1. Composición de la solución para el análisis del primer PCR. 23
2. Condiciones para el termociclador. 23
3. Composición de la solución para el análisis del segundo PCR. 24

1. INTRODUCCIÓN

La escasez de la fibra dietética en la alimentación del ser humano, es un factor causal de enfermedades como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes entre otras (Matos y Chambilla 2010). Actualmente, la forma que el ser humano vive, indica su salud en un futuro. La actividad física y el consumo apropiado de alimentos son ejemplos de rutinas diarias, que influencian una mejor condición del organismo (Slizewska *et al.* 2012). Ahora se dispone de diversas fuentes de fibra dietética, como los granos cereales, vegetales y legumbres, los cuales pueden ser transformados en productos altos en fibra.

Las dextrinas son una mezcla de varios productos de despolimerización y recombinación de almidones. La complejidad de estos genera varios problemas en cualquier clasificación de dextrinas basado en su carácter químico (Tomasik *et al.* 1989; Cruz 2012). Las dextrinas resistentes están definidas como polímeros de glucosa de cadena corta derivados de almidones degradados por calor, ácidos u otras catálisis, sin sabor dulce y muestran una fuerte resistencia a la acción hidrolítica de las enzimas digestivas humanas (Slizewska *et al.* 2012). Los cambios químicos durante el proceso de dextrinización son bastante complejos y desconocidos; las tres principales reacciones llevadas a cabo son: hidrólisis, transglucosidación y despolimerización (Wang *et al.* 2001).

Las dextrinas están compuestas mayormente de monómeros de glucosa; sin embargo, porque los procesos de producción industrial son específicos para cada dextrina, sus estructuras varían grandemente entre productos. La uniformidad en la composición y la diversidad en la estructura, permite separar cuidadosamente las propiedades estructurales de estos sustratos complejos de polisacáridos.

Los β glucanos son homopolisacáridos lineales de glucosa unidos principalmente a través de enlaces β (1-3) y β (1-4) y pueden presentar ramificaciones. Estos compuestos no pueden ser digeridos por el intestino delgado del ser humano debido a la carencia de enzimas pancreáticas capaces de degradarlas, por eso se encuentran clasificados como fibra dietética soluble (Pizarro *et al.* 2014). La fuente principal de β glucanos son cereales como trigo, centeno, avena y cebada; aunque también se pueden encontrar en otros organismos como levaduras, bacterias y hongos (Rivera 2016). La industria de alimentos está utilizando cada vez más los β glucanos para el desarrollo de alimentos funcionales, debido a sus efectos potenciales en la salud humana.

El análisis estructural de polisacáridos requiere técnicas especiales, las cuales difieren significativamente de los métodos usados para pequeñas moléculas y biopolímeros (Cui 2005). El primer paso para realizar una caracterización es determinar la pureza de los

materiales, que se ve reflejada en la composición química, incluyendo proteínas, cenizas, humedad y contenido de azucares. El segundo paso es determinar la composición de monosacáridos. Este proceso se lleva acabo utilizando cromatografía gaseosa.

El tracto gastrointestinal humano contiene una compleja y dinámica población de microorganismos. Múltiples factores apuntan a que el establecimiento de la microbiota intestinal humana se forma durante la infancia. Las bacterias intestinales toman un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis metabólica e inmune como también en la protección contra patógenos (Thursby y Juge 2017).

Entender la relación entre la microbiota intestinal y la salud humana es uno de los desafíos más grandes para los científicos en esta década, por que el 90% de las células son bacterias, el genoma microbiano contiene 200 veces más genes que el genoma humano. El estudio de la microbiota humana tiene un impacto potencial en muchas áreas de la salud (dos Santos *et al.* 2013). La utilización de la secuenciación de gen del ARNr 16S para la detección de patógenos bacterianos y ecología microbiana ha proporcionado una plataforma robusta para la evaluación de la composición de la microbiota humana (Devaraj *et al.* 2012).

Estudios recientes indican que principalmente los alimentos compuestos a base de fibras dietéticas pueden ser digeridas por especies determinadas de *Bacteriodetes*. Otras fibras no digeribles como oligosacáridos, pueden ser utilizadas por microorganismos benéficos, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Wang *et al.* 2017). En vista de la importancia de consumir fibras dietéticas como las dextrinas y los glucanos en la salud humana, es importante evaluar la relación entre ambos; por lo tanto, el presente trabajo incluye los siguientes objetivos:

- Determinar las propiedades estructurales de dextrinas y glucanos.
- Evaluar la tasa de fermentación *in vitro* de dextrinas y glucanos.
- Identificar los principales microorganismos responsables del proceso fermentativo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio.
El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Interacciones de la dieta-microbiota del departamento de Ciencia de los alimentos de la Universidad de Purdue, localizada en la ciudad West Lafayette, estado de Indiana, Estados Unidos de América.

Materia prima.
Las dextrinas que se utilizaron fueron: Dextrina de Tapioca, Maltodextrina Indigerible, y Fibra Soluble de Maíz; Los glucanos fueron Polidextrosa (STA-LITE III ®) y Glucano de Avena; estos se obtuvieron de tres diferentes empresas. Los materiales se mantuvieron a temperatura ambiente y sellados hasta su uso.

Fase I. Caracterización estructural de las dextrinas y glucanos.

Contenido de humedad. El contenido de humedad de las cinco muestras se cuantificó mediante el analizador de humedad (HE53). Las muestras se prepararon en triplicado con un peso entre 2.5-3 gramos de cada compuesto. Este análisis se desarrolló de la siguiente manera: en un recipiente de aluminio se colocó la muestra pesada, luego se ubicó dentro del analizador de humedad. Cada muestra se dejó reposar entre 5-7 minutos. Finalmente, se obtuvo el contenido de humedad en porcentaje.

Análisis de enlaces. El análisis de enlaces se hizo mediante Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). El protocolo llevado a cabo para preparar las muestras se llama Alditol Acetatos Parcialmente Metilados (AAPM), este proceso se lleva a cabo en cuatro pasos principales: metilación, hidrólisis, reducción y acetilación.

Metilación. Las muestras fueron pesadas en triplicados en tubos de 9 ml, aproximadamente entre 0.2-0.8 miligramos en cada uno, teniendo un total de 15 muestras. Se agregó 20 µl de metanol y fueron secados con aire utilizando un módulo de calefacción Pierce-Therm. Luego, se añadió 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y se sonicó por 30 minutos. Se preparó una solución de hidróxido de sodio (NaOH) (120mg) con dimetilsulfóxido (1 ml). Se agregó 75 µl de una solución (NaOH/DMSO) preparada anteriormente y se sonicó por 50 minutos. Después, se añadió 20 µl de yoduro de metilo (CH_3I) y se sonicó por 10 minutos, se repitió este mismo paso una vez más. Luego se agregó 30 µl CH_3I y se sónico por 20 minutos. Se añadió 1 ml de agua y 500 µl de diclorometano (DCM) y se mezcló bien. Se centrifugo a 2000 rpm por 2 minutos y se descartó la capa de agua. Se lavó la fase de DCM con 1 ml de agua. Finalmente se colocó a secar la fase de DCM con aire.

Hidrólisis. Al producto que se obtuvo de la metilación se le agrego 100 µl de ácido trifluroacético al 2M (TFA) en cada muestra y se hidrolizo por 90 minutos a 121 °C utilizando bloques de calor. Luego se extrajeron las muestras de los bloques y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después se añadió 20 µl de myo-inositol como estándar interno y se secó con aire. Finalmente se agregó 150 µl de metanol y se secó con aire. Se repitió el paso anterior.

Reducción. El residuo obtenido en el paso anterior se disolvió con 50 µl de hidróxido de amonio (NH_4OH). Luego se agregó 50 µl de una solución recién preparada de 1 M borohidruro de sodio ($NaDB_4$) en 2 M NH_4OH. Se sonicó por 1 min e incubó a temperatura ambiente por 2.5 horas. Después se agregó 23 µl de ácido acético glacial y se secó con aire. Finalmente se evaporó dos veces con 250 µl de ácido acético (5%) y dos veces con 250 µl de metanol.

Acetilación. Al producto que se obtuvo de la reducción se le añadió 250 µl de anhídrido acético, se sonicó por 5 minutos y se incubo a 100 °C por 2.5 horas. Se agregó 2 ml de agua, se mezcló bien y esperar 10 minutos. Luego se añadió 1 ml DCM, se mezcló bien y se centrifugo a 2000 rpm por 2 minutos y se descartó la capa de agua. Se lavó la fase de DCM dos veces con 2 ml de agua y se secó con aire la fase de DCM. Para correr las muestras en el cromatógrafo de gases se agregó 500 µl de acetona y se trasladó cada muestra a un vial.

Fase II. Evaluación de la tasa de fermentación de dextrinas y glucanos.

Fermentación. Para evaluar la tasa de fermentación de cada compuesto las muestras fueron sometidas a las mismas condiciones de incubación las cuales fueron: 150 rpm a una temperatura de 37 °C. Como también se utilizó un control positivo de glucosa para este experimento teniendo un total de seis compuestos. Para cada muestra se tomaron medidas de pH y gas. En cada tubo de ensayo se colocó 4 ml de buffer fosfato y se agregó el compuesto al (1%). El material fecal se obtuvo de un donador sano. Se preparó un compuesto acuoso utilizando nueve partes de agua y una de material fecal para obtener una solución final de 1:10 % P/V. Luego este compuesto acuoso se filtró utilizando cuatro capas de gasa. En cada tubo de ensayo con buffer y sustrato se colocó 1 ml del compuesto fecal acuoso. Finalmente se colocaron en una incubadora en las condiciones antes descritas. Los tiempos de muestreo fueron: 4, 8, 12, 24, 36, y 48 horas cada uno en triplicados obteniendo un total de 102 muestras, exceptuando las muestras de PromOat beta glucan que solo se tomó datos de 12, 24, 36 y 48 horas debido a su alta viscosidad. Luego se obtuvo las medidas de pH y gas, se almacenó 1 ml de muestra para realizar la extracción de ADN a una temperatura de -80 °C. También se almacenó 1 ml de muestra y se añadió 250 µl de estándar interno para el análisis de ácidos grasos de cadena corta a una temperatura de -80 °C.

Determinación de los ácidos grasos de cadena corta de dextrinas y glucanos. Se utilizaron estándares externos para ácidos grasos de cadena corta. Los estándares externos que se utilizaron fueron: ácido acético (0.6 M), ácido propiónico (0.15 M), ácido butírico (0.15 M), ácido isobutírico (0.15 M) y ácido isovalérico (0.15 M). De los estándares que se prepararon anteriormente se extrajo 500 µl de acetato, 500 µl de propionato, 500 de butirato, 250 µl de isobutírico y 250 µl de isovalérico, obteniendo 2 ml de solución estándar 1. De la

solución estándar 1 se colocó 400 µl en un vial, de esta se tomó la mitad y se transfirió a la solución estándar 2 y se agregó 200 µl de agua, de esta solución se transfirió la mitad a la solución estándar 3 y se agregó 200 µl de agua. Después se agregó 100 µl de estándar interno a cada solución estándar preparada. Las muestras almacenadas a – 80 °C se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron en la centrifugadora a 13,000 rpm durante 10 minutos. Las muestras se realizaron en triplicado y fueron transferidas a viales para ser corridas en el cromatógrafo de gases junto con los estándares externos teniendo un total de 105 muestras.

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con medidas repetidas en el tiempo, seis tratamientos fueron evaluados con tres repeticiones y seis tiempos (4, 6, 8, 12, 24, 36 y 24 horas) para un total de 102 unidades experimentales. Para el análisis de las muestras se hizo un Análisis de Varianza y una separación de medias Duncan para comparar los tratamientos. El nivel de significancia utilizado fue de $\alpha < 0.05$. Los resultados se analizaron con el "Stadistical Analysis System" (SAS® Versión 9.4).

Fase III. Identificación de microorganismos presentes en dextrinas y glucanos.

Extracción y cuantificación de ADN de las dextrinas y glucanos. Para la extracción de ADN se calentaron las muestras de 24 y 48 horas siendo un total de 36 muestras a 85 °C por 5 minutos para inactivar las nucleasas y proteasas. Se enfrió lentamente a temperatura ambiente y se colocaron en una gradilla. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm por 10 minutos y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Luego se agregó 500 µl de solución de lisosoma (2 mg/ml en PBS), se resuspenden las células con ayuda de una pipeta y se incubo a 37 °C por 45 minutos. Se añadió 100 µl de una solución de proteinasa K (2mg/ml, en PBS) y se incubo a 56 °C por 1 hora. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de lisis que contiene 0.3 gramos de biospec silica zirconia beads. Se agregó 500 µl de fenol: cloroformo: solución de alcohol (PCI) y se batieron en FastPrep 24 bead beater por 10 segundos. Luego las muestras se colocaron inmediatamente en hielo a 4 °C. Se añadió 500 µl de solución PCI y se mezcló bien por 15 segundos. Se dejó reposar las muestras por 3 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se extrajo cuidadosamente la parte de arriba evitando tocar la fase orgánica o el material en la interfase. Se transfirió la parte de arriba a un nuevo tubo de 2 ml. Se agregó 1 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló hasta volverse homogéneo (15 segundos). Se añadió 100 µl de acetato de sodio (3M). Se agregó 1 ml isopropanol y se precipito por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se colocaron en la centrifugadora a 13,000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se decantó el sobre nadante de cada muestra y se lavó con 500 µl etanol (70%). Se centrifugo a 13,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, los tubos se colocaron boca abajo sobre toallitas y se esperó 20 minutos para que el pellet se secara. Finalmente se añadió 60 µl de TE buffer y se suspendió el pellet. Para la cuantificación de ADN extraído, se utilizó un Epoch en donde se colocó 1 µl de cada muestra. El Epoch cuantificó la cantidad de ADN en cada tubo.

Preparación de ADN para ser analizado en el centro de secuenciación (16S). Luego de que se obtuvo la cuantificación de ADN para 24 y 48 horas, se normalizaron todas las muestras a 100 ng de ADN. Luego las muestras se centrifugaron para tener una mezcla homogénea. Para el iniciador PCR se utilizó un 96-well plate para colocar las muestras.

Después de haber sido analizadas las muestras en el termo ciclador, se realizó un gel de agarosa al 2% para asegurarse que el producto del PCR tenga la banda deseada. El siguiente paso fue la limpieza. Para este paso se tomaron 25 µl del primer PCR y se agregó 30 µl de Axygen Mag PCR clean-up beads en un plato nuevo. Se mezcló utilizando la pipeta para succionar el líquido cinco veces para homogeneizar y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se colocó el plato con las muestras sobre 96 well Magnet plate (IMAG) por aproximadamente 3 minutos hasta que la solución se volvió clara. Se extrajo todo el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Se añadió 200 µl de etanol al 70% en cada muestra y se incubó por 30 segundos a temperatura ambiente y luego se aspiró el etanol. Se repitió el paso anterior una vez más. Una vez el pellet se encontró seco se removió el plato del IMAG y se agregó 20 µl de buffer (Tris-HCl). Se mezcló 5 veces con ayuda de la pipeta. Luego se colocó el plato en el IMAG y se esperó 1 minuto hasta que la solución se volviera clara. Luego se extrajo el sobrenadante y se colocó en un plato nuevo. Después de este paso se corrió un gel de agarosa al 2% para revisar que la banda se encontrará en el lugar deseado y comprobar la eliminación de los dímeros.

Se obtuvo un producto final de 20 µl. Finalmente se midió la concentración de cada producto final usando el Qubit. Luego las muestras se encontraron listas para ser llevadas al centro de secuenciación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Caracterización estructural de las dextrinas y glucanos.

Contenido de humedad de dextrinas y glucanos. El contenido de humedad en el almidón de tapioca se encontró entre 10 y 13% (Trujillo 2014); comparando este contenido con la dextrina de tapioca se observó que mediante modificaciones químicas se disminuyó la humedad a 7.98% (cuadro 1) La disminución en la humedad se debió al cambio estructural del almidón mediante la utilización de ácidos y altas temperaturas para ser transformados en dextrinas (Sicheritz y Ali 2008).

Cuadro 1. Contenido de humedad de homopolisacáridos (%).

	Polisacáridos	**Código**	**Media ± D.E**
1	Dextrina de Tapioca	DT	7.98 ± 0.32
2	Maltodextrina Indigerible	MI	4.12 ± 0.06
3	Polidextrosa (STA-LITE III ®)	PD	3.42 ± 0.06
4	Fibra Soluble de Maíz	FS	3.64 ± 0.10
5	Glucano de Avena	GA	4.20 ± 0.03

D.E: Desviación estándar.

El contenido de humedad de un almidón de maíz es 9.9% (Hernández *et al.* 2008). Comparando este contenido con las muestras 2, 3 y 4 elaboradas a partir de este grano, se observó una disminución entre 5-6%, esto pudo deberse a los diferentes procesos de recombinación de enlaces mediante la incorporación de ácidos, provocando el aumento de amilosa y disminuyendo la cantidad de amilopectina (Granados *et al*. 2014). Con respecto a la avena, el contenido de humedad de este almidón oscila entre 8.8-9.4% (Zamudio *et al.* 2015). Al igual que con los otros polisacáridos evaluados, existió una reducción de 4.20% debido a modificaciones enzimáticas realizadas al almidón de avena (BeMiller 2009). Esta reducción de humedad generó productos más concentrados y con mayor vida anaquel debido a su actividad de agua.

Análisis de enlaces. Las muestras fueron sometidas al protocolo de Alditol Acetatos Parcialmente Metilados (AAPM). Se analizaron las dextrinas y glucanos en el cromatógrafo de gases (GC/MS) y se identificaron trece enlaces entre glucosas (Figura 1) que incluyen: glucosa terminal (*1,5-Di-O-acetil-1-deuterio-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol*), 1,2-glucosa (*1,2,5-Tri-O-acetil-1-deuterio-3,4,6-tri-O-metil-D-glucitol*), 1,3 glucosa (*1,3,5-Tri-O-acetil-1-deuterio-2,4,6-tri-O-metil-D-glucitol*), 1,6-glucosa (*1,5,6 Tri-O-acetil-1-deuterio-2,3,4-tri-O-*

metil-D-glucitol), 1,4-glucosa (*1,4,5-Tri-O-acetil-1-deuterio-2,3,6-tri-O-metil-D-glucitol*), 2,3 glucosa (*1,2,3,5-Tetra-O-acetil-1-deuterio-4,6-di-O-metil-D-glucitol*), 2,4 glucosa (*1,2,4,5-Tetra-O-acetil-1-deuterio-3,6-di-O-metil-D-glucitol*) 3,4-glucosa (*1,3,4,5-tetra-O-acetil-1-deuterio-2,6-di-O-metil-D-glucitol*), 3,6-glucosa (*1,3,5,6-Tetra-O-acetil-1-deuterio-2,4-di-O-metil-D-glucitol*), 4,6-glucosa (*1,4,5,6-Tetra-O-acetil 1-deuterio-2,3-di-O-metil-D-glucitol*) 2,3,6 glucosa (*1,2,3,5,6-Penta-O-acetil-1-deuterio-4-O-metil-D-glucitol*), 2,4,6 glucosa (*1,2,4,5,6-Penta-O-acetil-1-deuterio-3-O-metil-D-glucitol*) y 3,4,6-glucosa *(1,3,4,5,6-Penta-O-acetil-1-deuterio-2-O-metil-D-glucitol*).

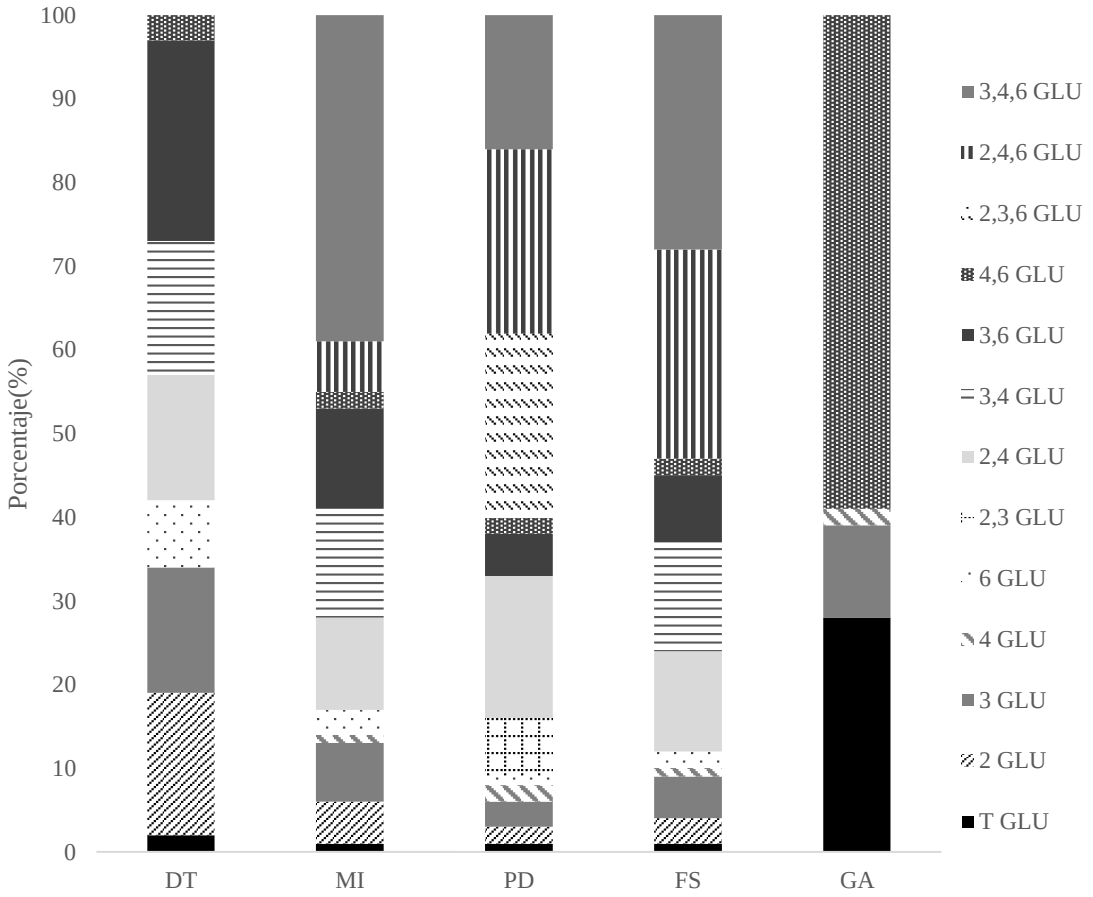

Figura 1. Distribución de enlaces en porcentajes. GLU: glucosa. T: terminal. DT: dextrina de tapioca. MI: maltodextrina indigerible. PD: polidextrosa (STA-LITE III ®). FS: fibra soluble de maíz. GA: Glucano de avena.

La derivatización de un polisacárido para el análisis de metilación incluye la conversión de todos los grupos hidroxilos libres en metoxilos seguido de una hidrólisis ácida. Los monómeros hidrolizados se reducen y acetilan para dar productos volátiles, es decir Alditol Acetatos Parcialmente Metilados, que pueden ser identificados y cuantificados mediante la cromatografía de gases y espectrometría de masas (Cui 2005).

Se observó las diferencias entre cantidades y tipos de enlaces de cada muestra. La diversidad de composición de enlaces se debió a las variedades de los granos utilizadas, la variabilidad genética y a procesos patentados por las empresas productoras. En la dextrina de tapioca se observaron ocho diferentes enlaces entre glucosas en cantidades homogéneas. La cantidad de enlaces se debió a la variedad de yuca utilizada ya que la conversión de almidón a dextrina se favorece para variedades de alto contenido de amilopectina debido al alto número de cadenas ramificadas (Velasco *et al.* 2008).

Con respecto a las muestras provenientes de maíz se obtuvo un total de 11 enlaces entre glucosas en una similitud de abundancia y tipos de enlaces, debido a que todas las muestras estaban conformadas de la misma matriz. Los enlaces encontrados en el almidón de maíz son α 1-4 y α 1-6 ya que está compuesto de amilosa y amilopectina (Agama *et al*. 2012). El cambio en los enlaces originales se debió a la adicción de ácidos y altas temperaturas permitiendo la degradación de estos enlaces logrando una nueva composición estructural. El enlace en mayor proporción oscila entre 39-16% es 3,4,6 glucosa.

En el caso del Glucano de avena se observó un total de cuatro enlaces con una mayor proporción de 4,6 glucosa con un 59% y glucosa terminal con un 28%, siendo esta la muestra con menor número de enlaces; este fue el compuesto con menos enlaces comparado con las otras muestras. Los enlaces comúnmente encontrados en beta glucanos son β (1-3) y β (1-4) pero debido a modificaciones estructurales y químicas estos enlaces cambian a los descritos anteriormente (Pizarro *et al*. 2014). Estas modificaciones se crearon mediante la metilación e hidrólisis del almidón de avena, generando la separación de los enlaces originales provocando una nueva restructuración de enlaces como glucosa terminal y 4,6 glucosa (Cui 2005).

Fase II. Evaluación de la tasa de fermentación de dextrinas y glucanos.

El consumo de fibras dietéticas como las dextrinas y glucanos ayudan en la modulación de la microbiota intestinal y la concentración de ácidos grasos de cadena corta. Se ha evidenciado que el alto consumo de fibras dietéticas influencian la microbiota intestinal alterando la fermentación de bacterias, el tamaño de colonización y la composición de especies (Sawicki *et al*. 2017). En este estudio se evaluó el efecto de dextrinas y glucanos en la microbiota intestinal de un donante sano.

Se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos y el tiempo de fermentación ($P<0.05$). A medida que trascurrió el proceso de fermentación, se redujo el pH (cuadro 2). Esto confirmó el crecimiento de los microorganismos presentes en las heces. Para medir el crecimiento de los microorganismos fue necesario evaluar el cambio de pH y la generación de gases durante 48 horas. El pH inicial de las muestras fue de 7, ya que se encontraban en un medio buffer de fosfato. En el transcurso de las primeras 4 horas se obtuvo una reducción de pH en un 28% para glucosa y dextrina de tapioca, lo cual indicó

Cuadro 2. Medición de pH a través del tiempo de dextrinas y glucanos.

	Tiempo de incubación (Horas)					
	4	**8**	**12**	**24**	**36**	**48**
Polisacáridos	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**
Glucosa[1]	$5.07 \pm 0.02^{b(U)}$	$4.48 \pm 0.01^{a(V)}$	$4.38 \pm 0.01^{a(W)}$	$4.26 \pm 0.01^{b(X)}$	$3.88 \pm 0.01^{b(Y)}$	$3.62 \pm 0.01^{a\ (Z)}$
Dextrina de Tapioca	$5.01 \pm 0.04^{a(U)}$	$4.51 \pm 0.01^{b(V)}$	$4.42 \pm 0.02^{b(W)}$	$4.23 \pm 0.01^{b(X)}$	$3.83 \pm 0.01^{b(Y)}$	$3.79 \pm 0.03^{c(Y)}$
Maltodextrina Indigerible	$5.69 \pm 0.02^{d(U)}$	$4.99 \pm 0.02^{a(V)}$	$4.87 \pm 0.01^{c(W)}$	$4.72 \pm 0.02^{c(X)}$	$4.65 \pm 0.01^{c(Y)}$	$4.62 \pm 0.03^{d(Y)}$
Polidextrosa (STA-LITE III ®)	$5.88 \pm 0.06^{e(U)}$	$4.99 \pm 0.01^{d(V)}$	$4.88 \pm 0.01^{c(W)}$	$4.74 \pm 0.01^{c(X)}$	$4.74 \pm 0.01^{d(X)}$	$4.72 \pm 0.01^{a(X)}$
Fibra Soluble de Maíz	$5.45 \pm 0.01^{c(U)}$	$4.96 \pm 0.02^{c(V)}$	$4.86 \pm 0.01^{c(W)}$	$4.74 \pm 0.02^{c(X)}$	$4.66 \pm 0.01^{c(X)}$	$4.63 \pm 0.01^{d(X)}$
Glucano de Avena	-	-	$4.37 \pm 0.01^{a(U)}$	$4.12 \pm 0.01^{a(V)}$	$3.77 \pm 0.02^{a(W)}$	$3.71 \pm 0.01^{b(W)}$
C.V (%)	0.56	0.28	0.25	0.33	0.27	0.35

[1]Control positivo.

[a-e] Medias en las mismas columnas con letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0.05$) entre tratamientos.

[(U-Z)] Letras diferentes entre paréntesis en las filas indican diferencias significativas ($P<0.05$) a través del tiempo.

D.E: Desviación estándar. C.V: Coeficiente de variación.

El consumo de azúcares por parte de los microorganismos generando un rápido descenso de pH. La glucosa es una azúcar simple por lo tanto, se encontró más disponible para los microorganismos, obteniendo asi una reducción acelerada de pH (Cabezas *et al.* 2016). El contenido de carbohidratos de la tapioca oscila entre 28-32% lo cual indica un alto contenido de azúcares disponibles para la alimentación microbiana (Breuninger *et al.* 2009). En relación con maltodextrina, polidextrosa y fibra soluble de maíz la reducción osciló entre 16-22%, el porcentaje de reducción en estos compuestos a base de maíz fue menor, esto pudo deberse a la variedad de enlaces presentes en la estructura de las dextrinas, ya que la cantidad de enlaces presentes en la muestras de maíz es mayor comparado con la dextrina de tapioca y el glucano, haciendo más lenta la alimentación de los microorganismos comparado con las demás muestras provenientes de tapioca y avena.

La glucosa y dextrina de tapioca continuó reduciendo el pH a una tasa menor mediante pasan las horas hasta llegar a su finalización; caso contrario para las muestras procedentes de maíz las cuales a partir de las 24 horas de fermentación no hubo cambios significativos en la reducción de pH. El glucano de avena mostró características similares a la glucosa (control) debido a la extracción de beta glucanos y almidón de avena, haciendo disponible fibras dietéticas para el consumo por parte de los microorganismos logrando una alta disminución de pH (BeMiller 2009), como también a la poca diversidad de enlaces entre glucosas presentes en este compuesto.

El segundo parámetro que se evaluó fue la producción de gas (cuadro 3). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni a través del proceso de fermentación (P>0.05).

Cuadro 3. Medición de producción de gas (ml) de dextrinas y glucanos a través del tiempo.

	Tiempo de incubación (horas)					
P	**4**	**8**	**12**	**24**	**36**	**48**
	MEDIA ±D.E	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**	**MEDIA ±D.E**
GL[1]	3.0 ± 0.15	4.7 ± 0.20	5.0 ± 0.21	4.7 ± 2.00	5.4 ± 0.38	5.6 ± 0.12
DT[2]	2.7 ± 0.21	4.2 ± 0.26	4.9 ± 0.15	6.0 ± 0.06	5.1 ± 0.10	4.8 ± 0.46
MI[3]	2.1 ± 0.25	3.0 ± 0.21	3.1 ± 0.53	3.8 ± 0.26	3.4 ± 1.01	3.5 ± 0.71
PD[4]	2.0 ± 0.00	3.1 ± 0.14	3.3 ± 0.28	3.8 ± 0.00	3.7 ± 0.21	3.7 ± 0.21
FS[5]	2.2 ± 0.15	3.0 ± 0.00	3.8 ± 0.10	4.0 ± 0.06	4.2 ± 0.10	4.1 ± 0.30
GA[6]	-	-	4.4 ± 0.52	5.1 ± 0.67	4.2 ± 0.31	3.9 ± 0.26
C.V (%)	6.3	4.4	7.9	10.8	9.0	8.6

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni a través del tiempo (P<0.05). [1]Glucosa: control positivo. [2] Dextrina de tapioca. [3] Maltodextrina indigerible. [4] Polidextrosa (STA-LITE III ®). [5] Fibra soluble de maíz. [6] Glucano de avena. P: polisacáridos. D.E: Desviación estándar. C.V: Coeficiente de variación.

Se observó un cambio en la producción de gas entre las 4 y 48 horas casi duplicando la cantidad inicial producida para las muestras de glucosa y fibra soluble de maíz, lo cual pudo por el consumo de nutrientes de medio por parte de los microorganismos presentes. Los principales productos de la fermentación bacteriana de carbohidratos no digeribles por el intestino fueron los ácidos grasos de cadena corta (Byrne *et al.* 2015).

Determinación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) de dextrinas y glucanos. El suministro de sustratos a la microbiota tiene un gran impacto en la población microbiana y los metabolitos que producen, particularmente los ácidos grasos de cadena corta. Estos se producen cuando existe presencia de carbohidratos no digeribles, como lo son las fibras dietéticas y almidones resistentes, al someterse a la fermentación por la microbiota (Byrne *et al.* 2015). Los AGCC son una importante fuente de energía para el intestino humano y se pueden transportar a otros tejidos y órganos del cuerpo humano (Kedia *et al.* 2009).

En la figura 2, se observa que la muestra mayor productora de acetato fue la glucosa con un rango de 40-95 mM a través del tiempo. Esto se debe a que la glucosa es una azúcar simple dando asi mayor disponibilidad de energía a los microorganismos generando asi mayor producción de gas. La segunda muestra mayor productora fue el glucano de avena con un rango de 60-90 mM. Como tercera muestra productora se encontró la dextrina de tapioca con un rango de 30-75 mM. La alta producción de acetato por parte de estos tres polisacáridos se debe a la prevalencia de *Prevotella copri*, y *Roseburia* las cuales son productoras de este ácido graso (Scher *et al*. 2013).

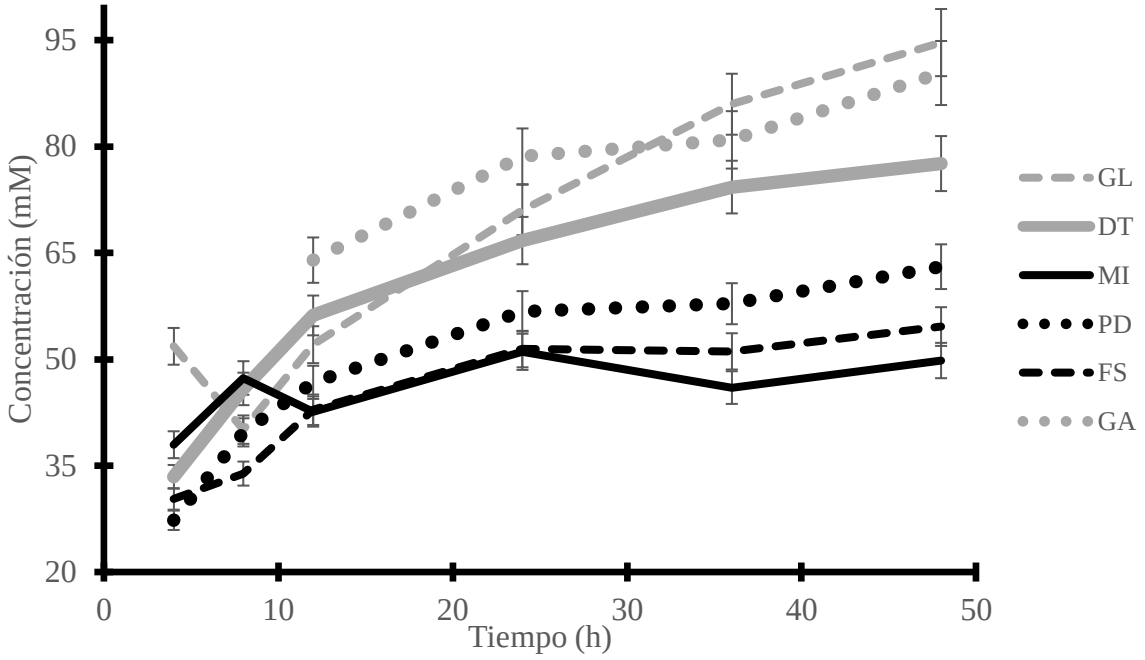

Figura 2. Producción de acetato. GL: glucosa. DT: dextrina de tapioca. MI: maltodextrina indigerible. PD: polidextrosa (STA-LITE III ®). FS: fibra soluble de maíz. GA: Glucano de avena. mM: micromolar.

La producción de ácidos grasos de cadena corta es un proceso dinámico y complejo que requiere de vías enzimáticas activadas por un gran número de especies de bacterias. La relación molar en la producción de acetato, propionato y butirato se estima en 60:25:15 en una persona sana (Agudelo *et al*. 2017). Dependiendo de la dieta, la concentración total de AGCC disminuye de 7-140 mM colon proximal a 20-70 mM en el colon distal. En el ciego y el intestino grueso, el 95% de AGCC producidos son rápidamente absorbidos por los colonocitos mientras que el resto 5% se excretan en las heces (den Besten *et al*. 2013).

La producción de propionato se encuentra distribuida a través de una serie de filos está dominado relativamente por pocos géneros, por tal razón, se encuentra en menor proporción en comparación al acetato (figura 3).

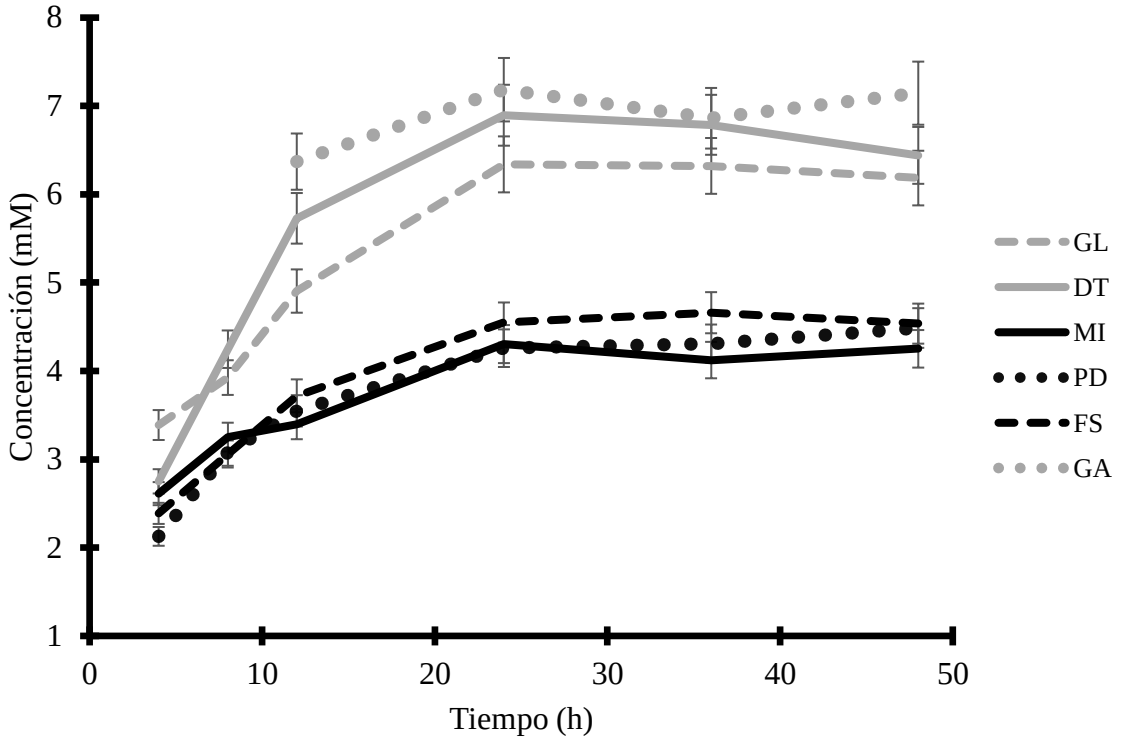

Figura 3. Producción de propionato. GL: glucosa. DT: dextrina de tapioca. MI: maltodextrina indigerible. PD: polidextrosa (STA-LITE III ®). FS: fibra soluble de maíz. GA: Glucano de avena. mM: micromolar.

Estudios recientes han demostrado que el propionato solo es capaz de reducir grasa visceral y hepática (Morrison y Preston 2016). Según la figura 3, el glucano de avena es la muestra mayor productora de propionato con un rango de 6.37-7.18 mM. La segunda muestra mayor productora de este compuesto es la dextrina de tapioca con un rango de 2.75-6.9 mM. La tercera muestra mayor productora de propionato es la glucosa con un rango de 3.39-6.34 mM. La producción alta de propionato se debe a que los tres polisacáridos contienen una composición de microorganismos similar generando una alta producción de este gas. Los géneros prevalecientes en estas muestras son: *Lachnospiraceae*, y *Roseburia*, los cuales son

pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, los cuales metabolizan rápidamente los carbohidratos obteniendo productos de fermentación como el propionato (Holt 2000).

Según estudios realizados el butirato es la fuente de energía más importante para los colonocitos, el cual debe ser suministrado constantemente para mantener una buena salud (Morrison y Preston 2016). La producción de butirato se encuentra en menor cantidad comparado al acetato (figura 4).

La muestra mayor productora de butirato es la Maltodextrina indigerible con un rango de 3.31-16.89 mM. Seguido por fibra soluble de maíz con un rango de 3.41-16.06 mM. La tercera muestra mayor productora es polidextrosa (STA-LITE III ®) con un rango de 3.48-15.93 mM. La alta producción de butirato se encontró en los polisacáridos a base de maíz, lo cual indicó que la composición química del maíz provoca que los microorganismos como *Prevotella copri* y *Lachnospiraceae* produzca mayor cantidad de butirato comparado con otro grano.

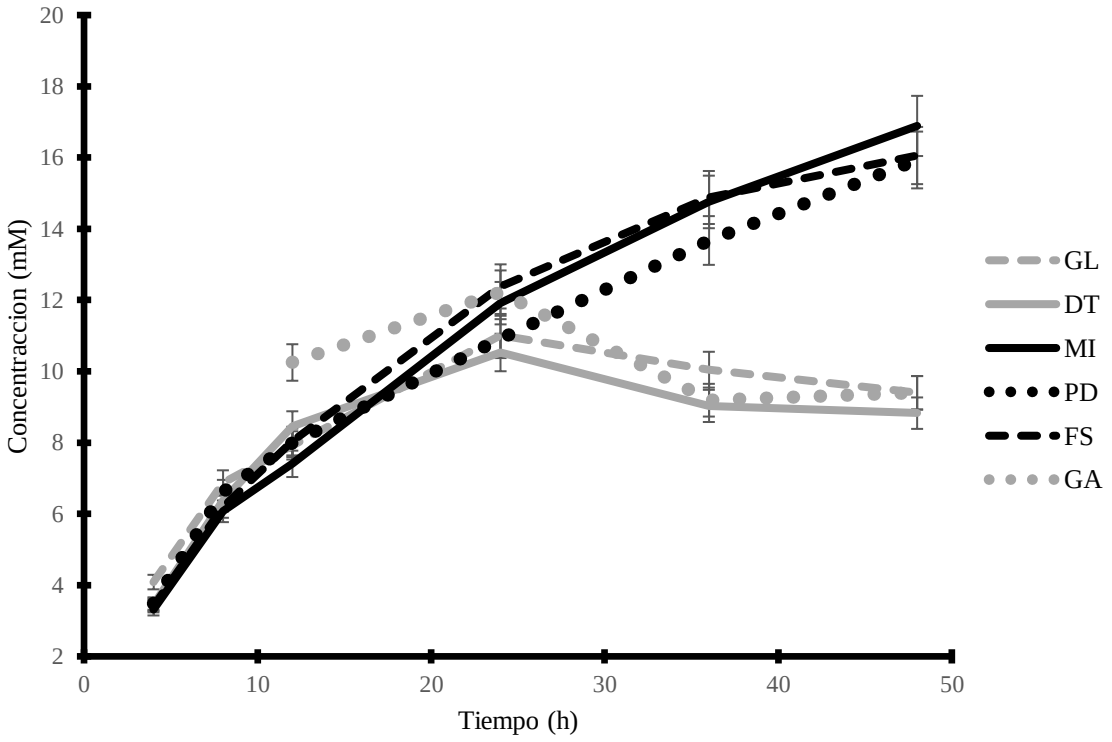

Figura 4. Producción de butirato. GL: glucosa. DT: dextrina de tapioca. MI: maltodextrina indigerible. PD: polidextrosa (STA-LITE III ®). FS: fibra soluble de maíz. GA: Glucano de avena. mM: micromolar.

Fase III. Identificación de microorganismos presentes en dextrinas y glucanos.

En las muestras se identificaron 667 microorganismos dentro de la comunidad microbiana entre todas las muestras. Por lo tanto, se agruparon en tres filos representativos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* (cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de filos de microorganismos encontrados en dextrinas y glucanos.

	Porcentaje (%)			
Tratamientos	***Firmicutes***	***Bacteroidetes***	***Proteobacteria***	**Otros**
Glucosa	44.82	36.53	-	18.65
Dextrina de Tapioca	47.20	34.32	-	18.48
Maltodextrina Indigerible	47.91	36.66	-	15.43
Polidextrosa (STA-LITE III ®)	49.32	34.50	-	16.18
Fibra Soluble de Maíz	48.32	37.70	-	13.98
Glucano de Avena	45.61	35.67	1.09	17.63

Estudios realizados en adultos sanos sugieren que estos comparten la mayoría de las especies de bacterias intestinales. Cada persona alberga un estimado mayor a 1000 filotipos nivel de especie. La mayoría de estos filotipos son bacterias que pertenecen a unos pocos filos. En adultos, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* por lo general dominan en la microbiota (Lozupone *et al.* 2012). A pesar de la consistencia de estos componentes principales, sus proporciones relativas de especies varían grandemente entre individuos debido a su dieta y edad (Morelli y Callegari 2015). Las cantidades promedio de los filos de mayor relevancia encontrados en el intestino son: *Firmicutes* (38.8%), *Bacteroidetes* (27.8%), *Actinobacteria* (8.2%) y *Proteobacteria* (2.1%) siendo esta la composición de la microbiota para adultos sanos (D'Argenio y Salvatore 2015).

Estudios revelan que la microbiota en personas obesas se relaciona en una elevada proporción de *Firmicutes* y una reducida población de *Bacteroidetes* (Mariat *et al.* 2009). Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la persona se encontraba en estado de obesidad. Se observó una predominancia del filo *Firmicutes* con un 45-49% de abundancia en cada una de las muestras. Se evidenció la presencia del filo *Bacteroidetes* con un 34-37%. El filo *Proteobacteria* solo fue identificado en el glucano de avena, esto se debe a la alta proporción de beta glucanos que permiten el crecimiento de este filo (BeMiller 2009).

Se observó en las muestras provenientes de tapioca, maíz y avena una proporción de filos similares, pero con géneros diferentes. Debido a la abundancia de microorganismos se identificaron 22 géneros representativos. En la microbiota se observó una alta abundancia de bacterias del intestino, incluyendo *Prevotella, Lachnospiraceae, Roseburia, Ruminococcaceae, Lactobacillus* entre otros grupos de bacterias no clasificados (figura 5).

La especie más abundante encontrada en las muestras fue *Prevotella copri*. Encontrada en una mayor proporción en fibra soluble de maíz, Glucano de avena y maltrodextrina indigerible. La alta presencia de este microorganismos es debido a que su desarrollo aumenta en presencia de fibras dietéticas como lo son las dextrinas y glucanos (Warren *et al.* 2018). La segunda especie en mayor proporción fue *Lachnospiraceae* no clasificada, estudios realizados en análisis de la composición de la microbiota fecal infieren que esta especie es común en el 95% de los individuos (San-Juan-Vergara *et al*. 2018). Por lo tanto, es normal encontrar tal abundancia en este estudio.

Estudios relacionan que las dietas altas en proteínas y bajas en carbohidratos reducen la abundancia de *Roseburia* en la microbiota intestinal reduciendo la proporción de butirato en las heces (Singh *et al*. 2017). Se encontró una alta abundancia de esta especie en las muestras de glucosa, dextrina de tapioca y glucano de avena. Las muestras de maltodextrina indigerible, polidextrosa y fibra soluble de maíz no se encontró presencia de *Roseburia*. Esto puede ser debido a que estos compuestos son elaborados a partir de maíz, como también a los cambios estructurales realizados a estos compuestos evitando el desarrollo de este género.

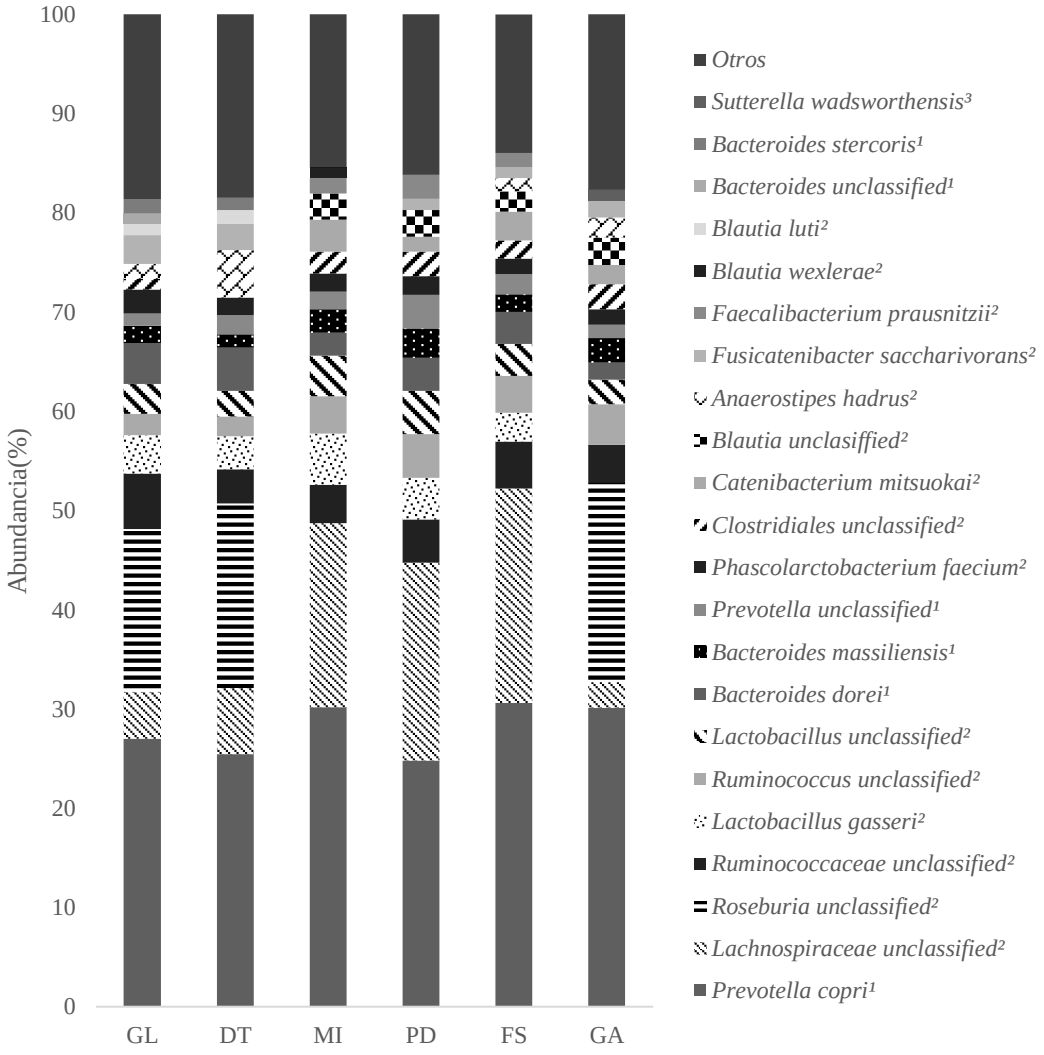

Figura 5. Microorganismos identificados en las muestras.
[1] *Bacteroidetes*. [2] *Firmicutes*. [3] *Proteobacteria*. Otros: son todos los microorganismos inferiores al 1 % de abundancia. GL: glucosa. DT: dextrina de tapioca. MI: maltodextrina indigerible. PD: polidextrosa (STA-LITE III ®). FS: fibra soluble de maíz. GA: Glucano de avena.

4. CONCLUSIONES

- Se determinaron diferentes composiciones estructurales para cada homopolisacárido proveniente de maíz, tapioca y avena.

- Los homopolisacáridos de maíz presentaron características similares en todas las evaluaciones.

- Se evidenció la reducción de pH y la producción de gas en cada dextrina y glucano en el tiempo, lo cual indicó el crecimiento de microorganismos.

- Las dextrinas y glucanos ayudaron a modular la composición de la microbiota humana, ejerciendo efectos positivos en el crecimiento de *Prevotella copri*, *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, y *Lactobacillus*.

5. RECOMENDACIONES

- Medir otros parámetros estructurales de los homopolisacáridos como el grado de sustitución, grado de polimerización, composición de monosacáridos y peso molecular.

- Evaluar el efecto de las dextrinas y glucanos en más muestras fecales de individuos sanos de diferentes edades.

- Realizar un estudio *in vivo* en el cual se evalúe el efecto de la ingesta de dextrinas y glucanos (provenientes de maíz, avena y tapioca) en la microbiota humana.

6. LITERATURA CITADA

Agama E, Juárez E, Evangelista S, Rosales O, Bello L. 2012. Características almidón de maíz y relación con las enzimas de su biosíntesis [Tesis]. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del IPN-México. 12 p.

Agudelo G, Giraldo N, Barrera C, Valdés B. 2017. Microbiota intestinal y ácidos grasos de cadena corta en pacientes críticos. Perspectivas en Nutrición Humana. 18(2):205–222. doi: 10.17533/udea.penh.v18n2a06.

BeMiller J. 2009. Starch modification. In: BeMiller J, Whistler R, editors. Starch: Chemistry and technology. Burlington, Mass: Academic press. p. 529-541.

Breuninger W, Piyachomkwan K, Sriroth K. 2009. Tapioca/cassava starch: production and use. Estados Unidos: Elsevier. 28 p. (Food science and technology). ISBN: 978-0-12-746275-2.

Byrne C, Chambers E, Morrison D, Frost G. 2015. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. Int J Obes (Lond). 39(9):1331–1338. eng. doi:10.1038/ijo.2015.84.

Cabezas C, Hernández B, Vargas M. 2016. Azúcares adicionados a los alimentos: Efectos en la salud y regulación mundial. Revisión de la literatura. Rev. Fac. Med. 64(2):319. doi:10.15446/revfacmed.v64n2.52143.

Cruz K. 2012. Modelo del proceso de hidrólisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia. 78 p.

Cui S. 2005. Structural analysis of polysaccharides. In: Cui S, editor. Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications. Boca Raton: CRC Press. p. 105-161.

D'Argenio V, Salvatore F. 2015. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. Clin Chim Acta. 451(Pt A):97–102. eng. doi:10.1016/j.cca.2015.01.003.

Den Besten G, van Eunen K, Groen A, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker B. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J Lipid Res. 54(9):2325–2340. eng. doi:10.1194/jlr.R036012.

Devaraj S, Hemarajata P, Versalovic J. 2012. La microbiota intestinal humana y el metabolismo corporal: implicaciones con la obesidad y la diabetes. http://www.scielo.org.ar /pdf/abcl/v47n2/v47n2a19.pdf.

Dos Santos M, Nielsen H, Sicheritz-Pontén T. 2013. Metagenomic analysis of the human gut microbiome. Lyngby: Technical University of Denmark (DTU). 132 p.

Granados C, Guzman L, Acevedo D, Díaz M, Herrera A. 2014. Propiedades funcionales del almidón de sagu (*Maranta arundinacea*) [Tesis]. Universidad de Cartagena-Colombia. 7 p.

Hernández M, Torruco J, Chel L, Betancur D. 2008. Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México [Tesis]. Universidad Autonoma de Yucatan-México. 9 p.

Holt J. 2000. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Estados Unidos: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 9780683006032.

Kedia G, Vázquez J, Charalampopoulos D, Pandiella S. 2009. In vitro fermentation of oat bran obtained by debranning with a mixed culture of human fecal bacteria. Curr Microbiol. 58(4):338–342. eng. doi:10.1007/s00284-008-9335-1.

Lozupone C, Stombaugh J, Gordon J, Jansson J, Knight R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature. 489(7415):220–230. eng. doi:10.1038/nature11550.

Mariat D, Firmesse, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet J. 2009. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiol. 9:123. eng. doi:10.1186/1471-2180-9-123.

Matos A, Chambilla E. 2010. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. Revista de investigación en ciencia y tecnología de alimentos; [Consultado 2018 jun 15]. Vol. 1, Núm.1. eng. https://revistas.upeu.edu.pe/index.php/ri_alimentos/article/view/813.

Morelli L, Callegari M, editores. 2015. The effect of diet and probiotics on the human gut microbiome. Cham: Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-16852-4.

Morrison D, Preston T. 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. Gut Microbes. 7(3):189–200. eng. doi:10.1080/19490976.2015.1134082.

Pizarro S, Ronco A, Gotteland M. 2014. β-glucanos: ¿qué tipos existen y cuáles son sus beneficios en la salud? [Tesis]. Universidad de Chile. 8 p.

Rivera A. 2016. Cuantificación de beta-glucanos en diferentes especies de hongos: hongo robellón (*Lactarius deliciosus*), hongo blanco (*Boletus edulis*), champiñon (*Agaricus bisporus*) y shiitake (*Lentinus edodes*) y cuantificación de arabinoxilanos en malta y bagazo de cerveza [Tesis]. Universidad de Girona-España. 56 p.

San-Juan-Vergara H, Zurek E, Ajami N, Mogollon C, Peña M, Portnoy I, Vélez J, Cadena C, Díaz Y, Hurtado L. 2018. A *Lachnospiraceae*-dominated bacterial signature in the fecal microbiota of HIV-infected individuals from Colombia, South America. Sci Rep. 8(1):4479. eng. doi:10.1038/s41598-018-22629-7.

Sawicki C, Livingston K, Obin M, Roberts S, Chung M, McKeown N. 2017. Dietary fiber and the human gut microbiota: application of evidence mapping methodology. Nutrients. 9(2). eng. doi:10.3390/nu9020125.

Scher J, Sczesnak A, Longman R, Segata N, Ubeda C, Bielski C, Rostron T, Cerundolo V, Pamer E, Abramson S, et al. 2013. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. Elife. 2:e01202. eng. doi:10.7554/eLife.01202.

Sicheritz T, Ali S. 2008. Properties of starches modified by different acids. International Journal of Food Properties. 11(3):495–507. doi:10.1080/10942910802083774.

Singh R, Chang H-W, Di Yan, Lee K, Ucmak D, Wong K, Abrouk M, Farahnik B, Nakamura M, Zhu TH, et al. 2017. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. J Transl Med. 15(1):73. eng. doi:10.1186/s12967-017-1175-y.

Slizewska K, Kapusniak J, Barczynska R, Jochym K. 2012. Resistant dextrins as prebiotic. In: Slizewska K, Kapusniak J, editors. Carbohydrates: Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. INTECH. p. 261- 288.

Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. Biochem J. 474(11):1823–1836. eng. doi:10.1042/BCJ20160510.

Tomasik P, Wiejak S, Pałasiński M. 1989. The thermal decomposition of carbohydrates. Part II. The decomposition of starch. In: Tomasik P, Wiejak S. editors. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Poland: Academic Press p. 278-343.

Trujillo C. 2014. Obtención de películas biodegradable a partir de almidón de yuca (*Manihot esculenta crantz*) doblemente modificado para uso en empaque de alimentos [Tesis]. Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios-Perú. 147 p.

Velasco R, Luna W, Mera J, Villada H. 2008. Producción de dextrinas a partir de almidón nativo de yuca por ruta seca en una agroindustria rural [Tesis]. Universidad de Cauca-Colombia. 8 p.

Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. 2017. The human microbiota in health and disease. Engineering. 3(1):71–82. doi:10.1016/J.ENG.2017.01.008.

Wang Y-J, Kozlowski R, Delgado GA. 2001. Enzyme resistant dextrins from high amylose corn mutant starches. Starch/Stärke. 53(1):21–26. doi:10.1002/1521-379X(200101)53:1<21:AID-STAR21>3.0.CO;2-K.

Warren F, Fukuma N, Mikkelsen D, Flanagan B, Williams B, Lisle A, Ó Cuív P, Morrison M, Gidley M. 2018. Food starch structure impacts gut microbiome composition. mSphere. 3(3). eng. doi:10.1128/mSphere.00086-18.

Zamudio P, Tirado J, Monter J, Aparicio A, Torruco J, Salgado R, Bello L. 2015. Digestibilidad *in vitro* y propiedades térmicas, morfológicas y funcionales de harinas y almidones de avenas de diferentes variedades. Revista mexicana de ingeniería química; [consultado 2018 jun 5]. 14(1):81-97. eng. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382015000100008&script=sci_abstract.

7. ANEXOS

Anexo 1. Composición de la solución para el análisis del primer PCR.

Componentes	Cantidad
10µM TS-V4-515F (Iniciador delantero)	3µl
10µM TS-V5-926R (Iniciador reverso)	3µl
Solución de BSA	2.4µl
Kappa Hi-fi Hot-start (Roche #KK2602)	30µl
Agua (PCR grado libre de nucleasas)	Ajuste el volumen de acuerdo a la cantidad de ADN para lograr un total de 60 µl.
ADN	Agregar el volumen de acuerdo a la concentración de ADN.
Total	60µl

Anexo 2. Condiciones para el termociclador.

Pasos	*# ciclos*	*Temperatura*	*Tiempo*
1. Iniciación	1	95°C	5 min
2. Desnaturalización	20	98 °C	20 seg
Alineamiento		60 °C	15 seg
Extensión		72 °C	30 seg
3. Extensión final	1	72°C	10 min
4. Mantener	1	4 °C	∞

Anexo 3. Composición de la solución para el análisis del segundo PCR.

Componentes	Cantidad
10μM i5-TS-DI-501(Iniciador delantero)	1.25 μl
10μM (Iniciador reverso)*	1.25 μl
Solución de BSA	1 μl
Kappa Hi-fi Hot-start (Roche #KK2602)	12.5 μl
Agua (PCR grado libre de nucleasas)	Ajuste el volumen de acuerdo a la cantidad de ADN para lograr un total de 25 μl.
El producto del primer PCR	Agregar el volumen de acuerdo a la concentración de ADN.
Total	25μl

* Para el iniciador reverso se utilizó uno específico para cada muestra: GLU (i7-TS-DI-713), TD (i7-TS-DI-714), IM (i7-TS-DI-715), STAP (i7-TS-DI-716), SCF85 (i7-TS-DI-717) y OBG (i7-TS-DI-718).