



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA: EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE
FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE CÉLULAS
INMOVILIZADAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE UNA
FRUCTOSILTRANSFERASA.

AUTOR: GUERRA PIEDRA, LUIS SANTIAGO

DIRECTOR: Dr. TRUJILLO TOLEDO, LUIS ENRRIQUE PhD.

SANGOLQUI

2017



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE UNA FRUCTOSILTRANSFERASA.**” realizado por el señor **LUIS SANTIAGO GUERRA PIEDRA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **LUIS SANTIAGO GUERRA PIEDRA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de marzo del 2017

Trujillo Toledo Luis Enrique PhD

DIRECTOR





DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **LUIS SANTIAGO GUERRA PIEDRA**, con cédula de identidad N° 1724789019, declaro que este trabajo de titulación “**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE UNA FRUCTOSILTRANSFERASA.**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 27 de marzo del 2017

Guerra Piedra Luis Santiago

C.C 1724789019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **LUIS SANTIAGO GUERRA PIEDRA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE CÉLULAS INMOVILIZADAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE UNA FRUCTOSILTRANSFERASA.”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 27 de marzo del 2017

Guerra Piedra Luis Santiago
C.C 1724789019

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres Luis y Elizabeth, quienes con su cariño y comprensión han sido guía para ser cada vez mejor ser humano y ser capaz de afrontar cada reto que se me presente en la vida.

También a mis hermanos Edison y Bryan que sirvieron de inspiración de superación cada momento y especialmente durante mi estancia en la universidad.

Además a mis abuelitos Andalicio, Clara, Fernando y Digna; que aunque no estén presentes estoy seguro que cuidan de mí en cada momento y fueron pilar fundamental para implantar en mí el gusto por la curiosidad y la ciencia.

A mis amigos y amigas que estuvieron presentes en cada momento con palabras de aliento en este periodo final y además de ser todos los momentos inolvidables, y de los cuales aprendí mucho como persona.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme la fuerza para aprender de mis errores y poder culminar cada escalón de la vida con salud, sabiduría, humildad y alegría.

Agradezco a mis padres y hermanos quienes supieron guiarme y comprenderme durante la etapa universitaria.

A los familiares y amigos presentes en cada momento y siempre aportando un granito de arena.

Al Dr. Luis E. Trujillo, quien supo darme la confianza y apoyo para realizar esta investigación y de quien me ha brindado su amistad.

Al profesor Rodrigo Avalos, que me brindo su amistad y al cual le tengo mucho agradecimiento por sus enseñanzas y consejos.

A Silvana Granda, quien siempre estuvo abierta a cualquier inquietud y me supo comprender en mi estancia en el laboratorio, siendo como maestra y amiga.

Al Grupo de biotecnología Industrial: Érica, Cristina y Francisco que compartimos muchos momentos en el laboratorio y cada momento aprendimos en conjunto de los errores y experiencias.

A todos los que forman parte del CENCINAT, especialmente al Dr. Luis Cumbal y la Ing. Carina Stael para abrirme las puertas de sus instalaciones.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	CAPÍTULO I.....	1
	INTRODUCCIÓN	1
1.1	ANTECEDENTES.....	1
1.2	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER	2
1.3	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	4
2	CAPITULO II	5
	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1	PREBIÓTICO	5
2.1.1	Fructanos como prebióticos	6
2.2	FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS.....	6
2.2.1	Generalidades.....	6
2.2.2	Fructosiltransferasas	8
2.3	<i>PICHIA PASTORIS</i>	9
2.3.1	Características	9
2.3.2	<i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión	10
2.3.3	Crecimiento Celular.....	10
2.4	INMOVILIZACIÓN.....	13
2.4.1	Características generales	13
2.4.2	Alginato de calcio	16
3	CAPÍTULO III.....	17
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1	PARTICIPANTES.....	17
3.2	ZONA DE ESTUDIO	17
3.3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
3.4	MATERIALES Y REACTIVOS	17
3.5	Potenciación del cultivo de levadura <i>Pichia pastoris</i> en medio YPG	19
3.6	Determinación de la Densidad Óptica	21
3.7	Obtención de Biomasa y enzima.....	21
3.8	Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).....	22
3.9	Medición de la actividad enzimática.....	22

3.10	Caracterización de la enzima producida por <i>P. pastoris</i>	24
3.11	Determinación de pureza de las cepas por Microscopía	27
3.12	Inmovilización celular	28
3.13	Evaluación de la actividad de productos de las células inmovilizadas.	28
3.14	Detección del perfil de productos como resultados de la incubación de perlas de alginato con sacarosa por Cromatografía Líquida de alta Resolución HPLC	29
3.15	Preparación de estándar de kestosa	29
3.15.1	Protocolo de concentración de kestosa de las muestras recolectadas.	30
3.15.2	Solución estándar de kestosa.	31
3.16	Análisis cualitativo de fructanos con cromatografía de capa fina (TLC).	31
3.17	Análisis estadístico	31
3.17.1	Fase uno: obtención de la curva de crecimiento de <i>Pichia pastoris</i>	31
3.17.2	Fase dos: preparación de los biocatalizadores en base a la encapsulación de <i>Pichia pastoris</i>	33
3.18	HIPÓTESIS	37
3.19	OPERATIVIDAD DE LAS VARIABLES	37
4	CAPITULO IV	38
	RESULTADOS	38
4.1	Control de contaminación en medio de cultivo YPG	38
4.2	Curva de crecimiento de la levadura <i>P. pastoris</i>	39
4.3	Identificación y Actividad enzimática de la FTF producida durante el crecimiento.	42
4.3.1	Cuantificación de glucosa liberada como resultado de la reacción de transfructosilación	42
4.3.2	Identificación de la producción y pureza de la enzima secretada al medio de cultivo durante la fase de crecimiento, utilizando SDS-PAGE	44
4.3.3	Actividad Enzimática	45
4.4	Inmovilización de la levadura <i>P. pastoris</i>	46
4.4.1	Observación de la morfología y tamaño del biocatalizador	46
4.4.2	Cuantificación de los tratamientos de inmovilización	47
4.4.3	Análisis cualitativo de fructanos con cromatografía de capa fina (TLC) ...	51
4.4.4	Comparación de la actividad de la biomasa libre recuperada y biocatalizador con espectrofotómetro utilizando el reactivo de DNS.	52

5	CAPITULO V	55
	DISCUSIÓN	55
6	CAPITULO VI.....	59
	CONCLUSIONES	59
7	CAPITULO VII	60
	RECOMENDACIONES	60
8	BIBLIOGRAFÍA	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Distribución de fructooligosacáridos (n<9) en plantas.	7
Tabla 2 Inmovilización características generales para su aplicación.	14
Tabla 3 Aporte de laboratorio planteado (materiales, equipos y reactivos).	18
Tabla 4 Reactivos necesarios para la preparación del gel de electroforesis.	25
Tabla 5 Reactivos necesarios para la preparación de la solución de carga de la muestra a 4X.	25
Tabla 6 Reactivos necesarios para preparar el buffer de corrida.	26
Tabla 7 Reactivos necesarios para la preparación de la solución de tinción.	26
Tabla 8 Reactivos necesarios para la preparación de la solución de destinción.	27
Tabla 9 Parámetros para la realización de la cromatografía HPLC para el análisis de azúcares.	29
Tabla 10 Modelo para realización de la curva de crecimiento	32
Tabla 11 Cantidad de biomasa húmeda	34
Tabla 12 Concentraciones del biopolímero	34
Tabla 13 Tratamientos en la preparación de los biocatalizadores	35
Tabla 14 Variables y factores a determinar	37
Tabla 15 Medidas de resumen de la curva de crecimiento P. pastoris.....	39
Tabla 16 Análisis de Varianza para el crecimiento de levadura P. pastoris	40
Tabla 17 Identificación de las fases de crecimiento Test:Tukey.....	41
Tabla 18 Datos obtenidos para la curva de calibración para glucosa a diferentes concentraciones.....	43
Tabla 19 Actividad enzimática extracelular durante el crecimiento de la levadura P. pastoris.	45
Tabla 20 Cuantificación de productos obtenidos uHPLC	48
Tabla 21 Análisis de varianza para los tratamientos en la producción de kestosa.	48
Tabla 22 Comparación de los tratamientos con el Test Duncan, alfa 0.05.....	49
Tabla 23 Actividad de biomasa y biocatalizador	53
Tabla 24 Cuantificación de la producción de 1-kestosa	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura de los fructooligosacáridos de cadena corta: 1-kestosa, 1-nistosa y fructosilnistosa.	8
Figura 2 Curva de crecimiento microbiano.	12
Figura 3 Métodos de inmovilización de enzimas.	15
Figura 4 Modelo caja de huevo del alginato de calcio.	16
Figura 5 Preparación de medio YPG para el cultivo de levadura <i>P. pastoris</i>	20
Figura 6 Cultivos de levadura a 180 rpm a los	21
Figura 7 Instalación, preparación y aplicación de muestras en la cámara de electroforesis.	27
Figura 8 Preparación de las condiciones en la desecación de sirope en rotavapor. ..	30
Figura 9 Tinción Gram realizada a 100x de los frascos de cultivo a diferentes fases de crecimiento, realizados cada día durante el crecimiento respectivo.	38
Figura 10 Curva de crecimiento de la levadura hospedera con diagrama de cajas tomando maximos y minimos en software Infostat.	40
Figura 11 Muestras colorimétricas a diferentes concentraciones de glucosa con reactivo de DNS.	42
Figura 12 Curva de calibración a diferentes concentraciones de glucosa tomando un $r^2 > 0,96$	43
Figura 13 Gel de electroforesis SDS PAGE 12.5%.	44
Figura 14 Curva de crecimiento de <i>Pichia pastoris</i> y actividad durante el crecimiento en medio YPG.	46
Figura 15 Biocatalizador de células inmovilizadas productoras de FTF.	47
Figura 16 Grafica de Q-Q plot para la normalidad de los datos en los diferentes tratamientos en la producción de FOS.	49
Figura 17 Los efectos principales para la producción de FOS.	50
Figura 18 Cromatograma del sirope obtenido de la reacción con el tratamiento L3A1.	51
Figura 19 Placa de corrida de azucares en cromatografía en capa fina	52
Figura 20 Actividad de la biomasa inmovilizada	53

ABREVIATURAS

1-SST: sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa

DO: densidad óptica

FOS: Fructooligosacáridos

h: horas

IR: Índice de refracción

uHPLC: Cromatografía líquida de alta presión

M: molar (mol/L)

rpm: revoluciones por minuto

U: unidad

RESUMEN

El interés por la producción de alimentos funcionales de alto nivel nutricional beneficiosos para la salud se ha ido incrementando en la actualidad, de esta forma la industria alimentaria ha puesto la mira en los prebióticos especialmente en los fructooligosacáridos (FOS). En el Ecuador la industria biotecnológica está comenzando y no cuenta con metodologías que permitan la optimización de los procesos de obtención de este tipo de productos a nivel industrial. Este trabajo describe la evaluación, por primera vez, de la producción de FOS a partir de células inmovilizadas de *Pichia pastoris* productoras de una fructosiltransferasa, a partir de sacarosa como fuente de carbono. Se obtuvo la cinética de crecimiento y en la producción en base a la inmovilización se realizó un diseño factorial (3*3), teniendo 3 concentraciones de alginato de calcio: 2, 3 y 4% y 3 masas de levadura: 0.5, 1 y 1.5g. Partiendo de condiciones temperatura ambiente y agitación de 180 rpm se llegó a la fase estacionaria de crecimiento a los 4 días de cultivo con una actividad enzimática específica extracelular $79,12 \pm 0,321$ U/ml. El mejor resultado en la producción discontinua con sacarosa 0.876 M a un pH 6.5, se obtuvo en alginato 2 % y 1.5 gr de levadura a las 24 horas, con un rendimiento teórico a los 15 minutos de $0.019 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ para la formación de azúcares reductores.

PALABRAS CLAVE

- **FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS,**
- **INMOVILIZACIÓN,**
- **CINETICA DE CRECIMIENTO**
- **ALGINATO DE CALCIO,**
- **RENDIMIENTO**

ABSTRACT

The interest in the production of functional nutritional foods of high nutritional and health benefit has been increasing at the present time, in this way the food industry has focused on the prebiotics especially on fructooligosaccharides (FOS). In Ecuador, the biotechnology industry is beginning and does not have methodologies that allow the optimization of the processes in order to produce this kind of products at the industrial scale.

This work describes the evaluation in the production of fructooligosaccharides from immobilized *Pichia pastoris* cells producing a fructosyltransferase, from sucrose as a carbon source. The kinetics of growth were obtained and in the production based on the immobilization a factorial design (3 * 3) was made, having 3 concentrations of calcium alginate: 2, 3 and 4% and 3 yeast masses: 0.5, 1 and 1.5g. Starting from ambient temperature conditions and agitation of 180 rpm, the stationary phase of growth was reached at 4 days of culture with a specific enzymatic activity extracellular 79.12 ± 0.321 U / ml. The best result in the discontinuous production with sucrose 0.876 M at pH 6.5 was obtained in alginate 2% and 1.5 gr yeast at 24 hours, with a theoretical yield at 15 minutes of $0.019 \text{ g} * \text{g}^{-1}$ for the formation of reducing sugars.

KEYWORDS:

- **FRUCTOOLIGOSACCHARIDES**
- **IMMOBILIZATION**
- **KINETICS OF GROWTH**
- **CALCIUM ALGINATE**
- **THEORETICAL YIEL**

1 CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

La producción de alimentos y compuestos de interés nutricional es un tema de investigación desde décadas anteriores. En el año 1980 investigadores japoneses demostraron la funcionalidad de los oligosacáridos y su capacidad de ser un sustrato selectivo para bifidobacterias. A partir de estos ensayos se introduce el primero concepto de prebiótico. Siendo una ingredientes no digeribles por el tracto gastrointestinal que benefician al organismo con el crecimiento selectivo de microorganismos en el colon. La siguiente década (1990) las investigaciones y estudios realizados con respecto a prebióticos se destacaron en el desarrollo y validación de métodos basados en biología molecular para identificar y cuantificar microorganismos de la microbiota intestinal, a continuación se realizó ensayos *in vitro* e *in vivo* en la relación de prebióticos, probióticos y su selectividad para evitar complicaciones específicamente en el colon (Roberfroid M., 2010).

Varias investigaciones se han realizado con respecto a oligosacáridos como: nomenclatura, metabolismo, organismos productores y primordial relaciones y beneficios para la salud. Producto de los resultados obtenidos las industrial a nivel mundial plantearon un gran interés en la producción de los prebióticos.

Dentro de los prebióticos de gran interés están las fructooligosacáridos (FOS) que tienen una larga historia de uso en Japón y Europa, en el que están aprobados para su uso en más de 500 productos de alimentos procesados que van desde fórmulas infantiles hasta productos de confitería. La demanda de estos productos ha ido incrementándose teniendo una prospectiva de crecimiento del 10% anual. Diferentes grupos de investigación de todo el mundo en las últimas dos décadas se centran en: la producción, propiedades, aspectos analíticos y los beneficios nutricionales de los FOS. Se han

presentado artículos que describen la ocurrencia, la preparación, propiedades y aplicaciones de FOS, además de la composición y la fuente de FOS, sus efectos fisiológicos sobre el consumo, la capacidad de aumentar la vida útil de productos que contienen probióticos y su relación con el concepto de fibra dietética (Sangeetha et al., 2005; Mohammadi & Mortazavian, 2011).

En los últimos años investigaciones realizadas en la industria de alimentos, tiene el desafío técnico de producir un alto rendimiento de oligosacáridos de tamaño específico a partir de materias primas simples (Mutanda, Mokoena, Olaniran, Wilhelmi, & Whiteley, 2014).

1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER

Los prebióticos son conocidos como polisacáridos no digeribles, que conducen al aumento de bacterias beneficiosas para la salud conocidas como probióticos que se encuentran en el colon y ejercen antagonismo con *Salmonella sp* o *Escherichia coli*. Los prebióticos presentan característica de no ser absorbidos, ni digeridos por enzimas en el transcurso por el intestino delgado, pero posteriormente fermentados por la microflora beneficiosa (Patel & Goyal, 2012), de ahí su carácter prebiótico.

Dentro de la clasificación de los prebióticos se encuentran los FOS que son sustratos de muchos probióticos, la utilización de FOS según estudios demuestran el aumento de 20 a un 70 % los niveles de bifidobacterias y su consumo propicia beneficios en la salud, tales como: La resistencia a infecciones, síntesis del complejo B y una mayor absorción de calcio en el tracto gastrointestinal, además de contener niveles bajos de calorías, no ser carcinogénicos y no implican caries dentales. Se estima que los FOS están presentes en 36000 plantas entre las familias *Compositae* y *Asteraceae*, que almacenan estas sustancias como reservas de energía (Mutanda, Mokoena, Olaniran, Wilhelmi, & Whiteley, 2014).

En la actualidad los prebióticos son un atractivo en la composición de alimentos, debido a los resultados obtenidos en experimentos realizados *in vivo*, las características que resaltan son: su propiedad de laxante y fortalecimiento del intestino grueso (Cumming & Macfarlane, 2002). Especialmente están relacionados con los inmunomoduladores que intervienen y previenen el crecimiento de células malignas y formación de tumores (Calselato, Freitas, & Sgarbieri, 2011).

La carencia de nutrientes, los conservantes y aditivos en alimentos procesados, alteran la histología en el organismo especialmente el colon que su deterioro conlleva a consecuencias que finalizan en cáncer (Mutanda, Mokoena, Olaniran, Wilhelmi, & Whiteley, 2014). Estudios realizados en el Ecuador demuestran que la incidencia del cáncer de colon presenta una frecuencia alta en personas desde los 54 años en adelante (Mora, Calderón, & Contreras, 2002). Además las intervenciones quirúrgicas de colon realizadas en SOLCA en los últimos 15 años se han incrementado, mostrando a Quito y Guayaquil las ciudades con más prevalencia (El_Universo, 2015). El interés actual promueve el desarrollo de alimentos funcionales que tienen como objetivo ser: complemento de la dieta y altos en nutrientes, de esta forma la industria alimentaria ha puesto la mira en los prebióticos especialmente los FOS (Al-Sheraji, y otros, 2013). Sin embargo, la obtención de FOS a través de materia vegetal conlleva varios procesos que desde el punto de vista industrial, son limitantes para una alta productividad.

A todo esto, la aplicación de técnicas moleculares de clonación en *Pichia pastoris* mejoran la obtención de enzimas como la 1-SST fucosiltransferasa para elevar la producción de FOS. El uso de *Pichia pastoris* tiene algunas ventajas como sistema de expresión tales como: proteínas heterólogas relativamente puras, requerimientos económicamente bajos y manipulación sencilla para un posible escalamiento (Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005). Además por razones técnicas y económicas los biocatalizadores requieren reutilización por largos periodos de tiempo. Bajo este criterio el interés en el campo biotecnológico por la inmovilización de células y enzimas aumenta, debido a sus grandes ventajas, sencillez y bajos costos (Fajardo, Osuna, Villa Velásquez, Escalante, & Ibarra, 2011). Por tanto, se busca tener alta producción de

FOS por medio de inmovilización de *P. pastoris* recombinante, como un paso preliminar para el desarrollo, por primera vez en el país, de una tecnología de producción de estos compuestos y su posterior uso en la industria de alimentos en el Ecuador. Estos resultados sin dudas, contribuirían al desarrollo de la matriz productiva del país, con la producción de productos biotecnológicos de alto valor agregado.

1.3 OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.3.1.1 Objetivo general del proyecto

Evaluar la producción de fructooligosacáridos a partir de células inmovilizadas de *Pichia pastoris* productoras de una fructosiltransferasa (FTF).

1.3.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la cinética de crecimiento de *Pichia pastoris* así como la producción enzimática.
- Establecer condiciones óptimas para inmovilizar levadura *Pichia pastoris* recombinante en perlas de alginato de calcio y comparar la actividad enzimática de 1-SST fructosiltransferasa de células inmovilizadas y células libres.
- Cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la cantidad de 1-kestosa obtenida a distintos tiempos de reacción.

2 CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 PREBIÓTICO

Son componentes presentes en la dieta que estimulan el crecimiento de ciertos microorganismos que habitan el tracto gastrointestinal, proporcionando beneficios en la salud del huésped (Roberfroid M., 2010). Los prebióticos es un ingrediente alimenticio no digerido por el organismo, pero promueven la flora intestinal y el sistema inmune, debido al crecimiento selectivo en el colon. Son fundamentalmente los fructo y galacto oligosacáridos de cadena corta (De la Cagigas & Blanco, 2002; Ringo et al., 2010).

Dentro de las características principales de los prebióticos es el aumento del sistema inmunológico previniendo la formación de células malignas en el colon, que pueden comenzar con enfermedades de intestino irritable, estreñimiento y otros trastornos intestinales. En la actualidad es parte principal de la composición de alimentos debido que ha mostrado mayores beneficios formando simbióticos ayudando en enfermedades cardiovasculares (Ford et al., 2014; Ooi & Liong, 2010).

Características de los prebióticos en la salud

- Promueve el crecimiento de microbiota intestinal.
- Ayuda en las funciones intestinales.
- Aumento de la absorción de minerales, especialmente calcio en la densidad ósea.
- Regula la producción de péptidos gastro intestinales relacionado con la saciedad.
- Modulación de las funciones inmunes.
- Reducción de infecciones intestinales.
- Reducción de diabetes tipo 2.
- Reducción de la inflamación intestinal (Roberfroid M., 2010).

2.1.1 Fructanos como prebióticos

Los fructanos son los prebióticos con mayor información, especialmente del tipo inulina que debido a su configuración β del C 2 anomérico en los monómeros de fructosa, que otorgan la propiedad de ser resistente a la digestión en el tracto gastrointestinal. No obstante estos prebióticos pueden ser fermentados por bacterias lácticas y bifidobacterias que aumentan paulatinamente su población (Butel et al., 2002a; Suzuki et al., 2006; Roberfroid, 2000).

Dentro del proceso fermentativo de los fructanos favorecen el desarrollo de la mucosa presente en el epitelio intestinal, dando resistencia a las enfermedades debido a la inhibición de lesiones intestinales ulcerativas (Butel et al., 2002b; Cherbut, 2002).

Una característica importante, ayudan a prevenir enfermedades cardiovasculares e hipertrigliceridemia, relacionadas con dietas altas en calorías (Roberfroid, 2001). Además de reducir problemas de obesidad, que pueden relacionarse a futuro con diabetes tipo II (Marquina & Santos, 2003).

2.2 FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

2.2.1 Generalidades

Los FOS son carbohidratos de gran importancia en la industria farmacéutica, en dosis recomendadas presentan beneficios para la salud (Mutanda, Mokoena, Olaniran, Wilhelmi, & Whiteley, 2014). Los FOS son mencionados como prebióticos, siendo preponderantes en la nutrición actual, al ser reconocidos como fibra soluble que estimulan el crecimiento de bifidobacterias en el tracto gastrointestinal (Olivera , Castillo , & López, 2005). Se encuentran en plantas como: cebolla, plátano, achicoria de jerusalén, espárragos, ajo entre otras.

La biofuncionalidad de los FOS han sido documentadas como tener bajo dulzor, teniendo valores pequeños de calorías y pocas veces son hidrolizados por enzimas

digestivas, además poseer propiedades no carcinogénicas (Mutanda, Mokoena, Olaniran, Wilhelmi, & Whiteley, 2014).

Los FOS se reconocen como oligómeros de fructosa, estos conforman una serie de oligosacáridos que provienen de la sacarosa, la fórmula representativa GF_n siendo la molécula más pequeña 1-kestosa conformada por Glucosa-fructosa-fructosa (GF2) seguida de la nistosa con tres fructosas (GF3), todas las moléculas se encuentran en la posición β -2,1 de la glucosa (Dominguez, Rodrigues, Lima, & Texeira, 2013). La predominancia en plantas se encuentra n<GF5 como se menciona en la tabla 1.

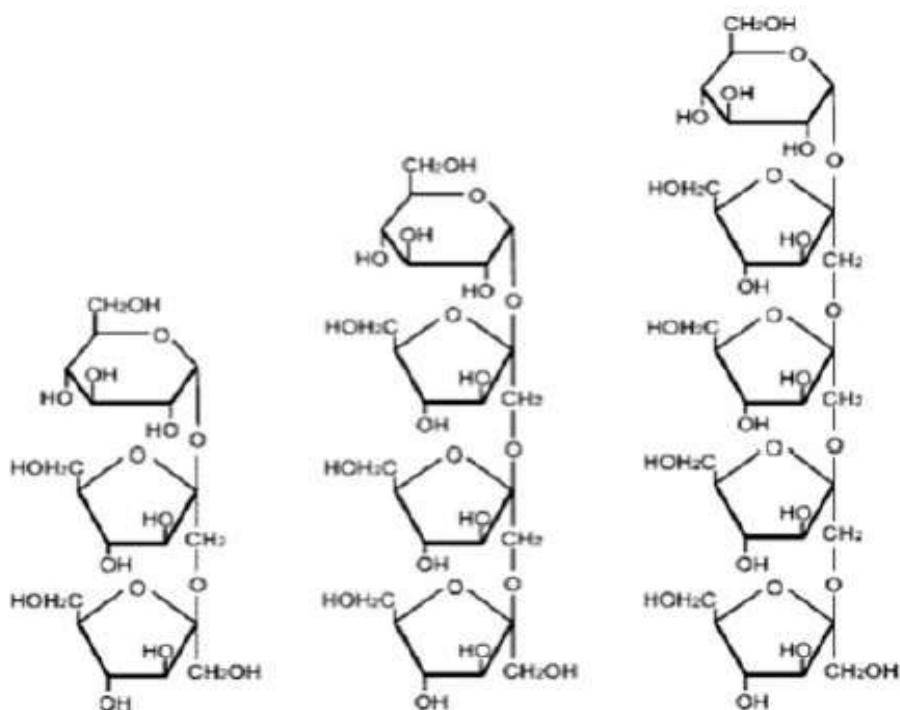
Tabla 1

Distribución de fructooligosacáridos (n<9) en plantas.

Sustancia	% de fructanos DS	GF2	GF3	GF4	GF5-8	Total
Cebolla	25-40		61%	25%	10%	3%
						100%
Trigo	1-4		30%	13%	6%	50%
						100%
Achicoria	15-20		4%	5%	5%	16%
						30%
A. Jerusalén						16 -20
						50%
Ajo	25-35					10-20%

Fuente: (Bornet, Brouns, Tashiro, & Duvillier, 2002)

Los fructanos en las plantas sirven de fuente de almacenamiento de energía, por esta razón se acumulan en la base de las hojas para un rebrote además de órganos especializados como la raíz, se diferencian del almidón por su lugar de almacenamiento y la acción de la enzima fructosiltransferasa (Darwen & John, 1989).



**Figura 1 Estructura de los fructooligosacáridos de cadena corta:
1-kestosa, 1-nistosa y fructosilnistosa.**

Fuente: (Dominguez , Rodrigues, Lima, & Texeira, 2013)

2.2.2 Fructosiltransferasas

Las Fructosiltransferasas (FTFs) se encuentran en diferentes organismo productores de fructooligosacáridos, especialmente en plantas y de hongos filamentosos que son las más aplicadas. Estas enzimas poseen una activad optima en condiciones de pH 4.5 -7.5, temperatura de 50 a 60 °C (Aguilera-Olivera & Maugeri, 2011). La FTF en presencia de sacarosa en la naturaleza es capaz de realizar varias reacciones hasta formar un polímero, siguiendo un mecanismo tipo Ping-Pong (Olivera , Castillo , & López, 2005). De este modo la sacarosa sirve dos veces de donante rompiendo el enlace β -1,2 de la molécula y transfiere un grupo fructosilo a una molécula aceptora como sacarosa, dejando libre una glucosa (Maiorano, Piccoli, Sabino da Silva, & de Andrade , 2008). La

enzima por presentar la capacidad de hidrolizar enlaces fructosilo son denominadas β -fructofuranosidasas que pertenecen a la familia de las glicosidasas 32.

2.3 *PICHIA PASTORIS*

2.3.1 Características

La levadura *Pichia pastoris* es un organismo utilizado como huésped en la producción de proteínas heterólogas eucariotas, debido a la combinación de manipulación genética, esta levadura se ha convertido en el microorganismo más estudiado para la producción de proteínas terapéuticas recombinantes y además por su versatilidad. Esta levadura la expresión proteica es secretada al medio definido con un 80% de pureza (Potvin , Ahmad, & Zhang, 2012).

Factores que atribuyen a la aceptación de *P. pastoris*.

- Promotores derivados del alcohol oxidasa 1 (pAOX1) y de la fosfato gliceraldehído deshidrogenas pGAP, adecuado para la expresión de genes extraños de forma inducida o constitutiva.
- Similitud en las técnicas de manipulación de *Sacharomyces cerevisiae*. En la producción de proteínas.
- Fuerte prevalencia por el crecimiento respiratorio que es un factor importante para altas densidades celulares.
- La expresión de más de 200 proteínas heterólogas (Cregg, Cereghino, Shi, & Higgins, 2000).

El uso de *Pichia pastoris* ha crecido debido a la eficacia en la producción, de tal manera que el rendimiento y actividad dependen de los parámetros físicos del cultivo como: pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno y los residuos de metanol. De esta manera ha remplazado a otros microorganismos convencionales (Macauley-Patrick, Fazenda, McNeil, & Harvey, 2005).

2.3.2 *Pichia pastoris* como sistema de expresión

Los organismos más utilizados en investigaciones biotecnológicas son levaduras y bacterias. *Pichia pastoris* representa beneficios para la expresión de genes heterólogos, además de ser considerado por la American Food and Drug Administration (FDA) como umicroorganismo GRAS (General Regarded as Safe) o sea seguro desde el punto de vista bio-ambiental (Dominguez et al., 1998). Por esta razón es el postulante ideal para la expresión de enzimas de interés alimenticio, además de no ser genéticamente susceptible (Darby et al., 2012). Con esta capacidad la expresión del gen codificante para la 1-SST en *P. pastoris*, se conserva las características enzimáticas del organismo natural, sin embargo con una mayor producción de la misma al utilizar una levadura con *P. pastoris* como hospedero (Lüscher & Nelson, 1995).

2.3.3 Crecimiento Celular

Es la secuencia de procesos una población microbiana, siendo desde la formación de un nuevo individuo que presenta un alto grado de adaptabilidad siendo capaz de responder a las variaciones del medio hasta la formación del siguiente individuo, aumentando el número de células (Prescott, Harley, & Klein, 2009; Scragg, 2002). La curva de crecimiento representa el incremento celular en el tiempo, tomando en cuenta la disponibilidad de nutrientes. La curva se presenta en cuatro fases:

2.3.3.1 Fase Latencia

Es la introducción del microorganismo a un medio de cultivo, en esta fase no se encuentra aumento celular, ni tampoco un aumento en masa debido a que los componentes celulares se encuentran adaptándose, congruentemente formando nuevos ribosomas y provisionándose de ATP, además de crear nuevas enzimas de acuerdo al medio de cultivo en el que se encuentran. La fase de latencia dependerá del estado del microorganismo que podría ser larga o incluso corta si procede de un medio fresco o de igual composición.

2.3.3.2 Fase Exponencial

Esta fase los microorganismos se encuentran creciendo y dividiéndose constantemente es por esta razón a esta fase también se la conoce como logarítmica. Durante este periodo la población microbiana es muy uniforme tomando en cuenta que los componentes del medio se encuentran en las mejores condiciones ambientales y de nutrientes, sin embargo a medida que transcurre el tiempo en esta fase también aumentan los desechos.

$$\frac{dN}{dt} = \mu * N$$

μ : velocidad específica de crecimiento.

N: número de células.

2.3.3.3 Fase Estacionaria

El crecimiento y la división disminuye y la curva prácticamente forma una horizontal, el tamaño final de la población microbiana dependerá de la cantidad de nutrientes y factores ambientales. A partir de esta fase el número de microorganismos no tendrá una variación significativa, prácticamente constante. Uno de los factores esenciales es la cantidad de oxígeno, su limitación está dada por la baja solubilidad variando la concentración uniforme en el medio de cultivo.

La escases de nutrientes es otra de las consideraciones, sin embargo puede resultar beneficiosa debido a que el microorganismo forma proteínas mediante diferentes mecanismos para darle resistencia, estas se las conoce como proteínas del hambre y estas consideraciones son importantes en la microbiología industrial y en ensayos médicos (Prescott, Harley, & Klein, 2009).

$$\frac{dN}{dt} = 0$$

2.3.3.4 Fase Senescencia y Muerte

Se describe como la pérdida de viabilidad de las células, cesa el crecimiento y en la mayoría las células se rompen. En este instante la velocidad específica de crecimiento llega a ser 0 o menor a cero y finalmente el cultivo llega a tener más toxinas y moléculas de desecho (Doran, 1998).

$$\frac{dN}{dt} = -k * N$$

k: velocidad específica de muerte o senescencia celular.

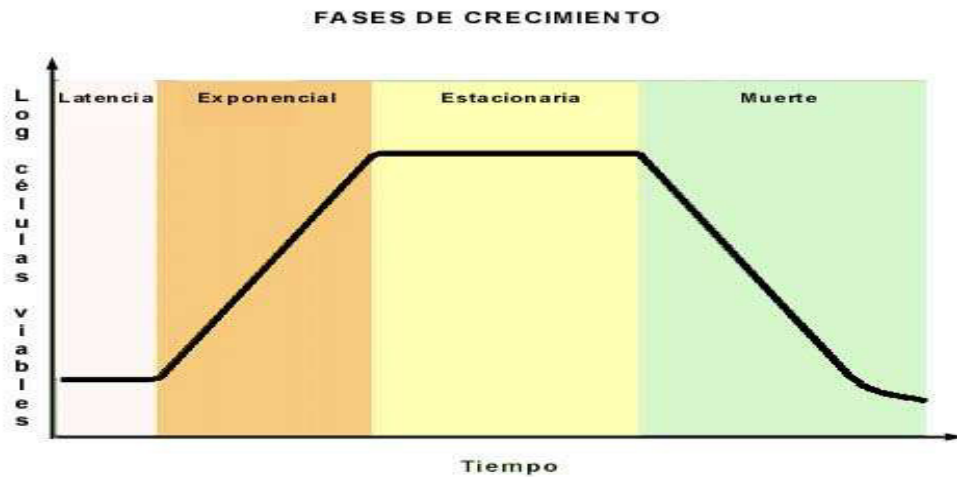


Figura 2 Curva de crecimiento microbiano.

Fuente: (García, 2012).

2.4 INMOVILIZACIÓN

2.4.1 Características generales

La inmovilización se define como la localización específica de células o enzimas manteniendo la misma característica en su actividad y demás propiedades, de esta forma son reutilizadas en los procesos bioquímicos durante largos periodos de tiempo (Fajardo, Osuna, Villa Velásquez, Escalante, & Ibarra, 2011). Dentro del concepto de inmovilización de células implica el encerramiento de las células vivas dentro de una red rígida que permite la difusión de sustratos y productos, permitiendo el crecimiento y mantenimiento de células activas en polímeros naturales (Chamon & Divies, 2001). Además, la inmovilización tiene como finalidad el diseño sencillo de reactores en la producción de metabolitos, adicionalmente ventajas en el control del proceso, la eficiencia de la producción y la estabilización de sistemas continuos de sustrato (Martins et al., 2013).

Las enzimas y células completas por lo general son difíciles de reutilizar además de ser delicadas en grandes procesos de producción en condiciones normales de operación, debido a esta la inmovilización proporciona características químicas y bioquímicas facilitando los métodos de síntesis y la utilización de biopolímeros promete disminuir el impacto ambiental de los procesos, siendo el mayor atractivo de las industrias (Scragg, 2002; Miletić et al., 2012).

Tabla 2***Inmovilización características generales para su aplicación.***

Ventajas	Desventajas	Atractivo industrial
Mejor productividad en fermentaciones.	Crecimiento excesivo celular	Barato.
Adaptación a procesos continuos.	Perdida de actividad en el uso continuo	Robusta.
Mayor tolerancia a fermentación sustancias inhibidoras	Estabilidad de la matriz.	No oxida de vinos.
Menor escala en la fermentación		No es susceptible a contaminación.
Aplicativo a diferentes microorganismos incluyendo		Debe usar soportes y organismos

Adaptada de Chamon & Divies, 2001.

La inmovilización de microorganismos se puede realizar por diferentes métodos:

- Unión covalente a soportes sólidos. Las enzimas forman un verdadero enlace covalente con la superficie del soporte insoluble sea: vidrio poroso cerámica, carbón, celulosa o polímeros sintéticos. Debe pasar por dos etapas siendo la activación de soporte y el acoplamiento específico (figura 3e).
- Absorción en soportes sólidos. La primera técnica de inmovilización utilizando intercambio catiónico, formando interacciones débiles, requiere condiciones de control, además de ser utilizado para la purificación de proteínas (figura 3a).
- Captura de una red tridimensional de polímero. Antes de la formación de gel se agrega la enzima u organismos a los monómeros, los cuales formado el polímero quedan adentro o entrecruzados con la red formada (figura 3d).

- Microencapsulación. Se forma en el interior de la microcapsula que puede ser obtenida por polimerización interfacial, desecación o separación de una fase (figura 3b).
- Entrecruzamiento con reactivos bifuncionales. Es un entrecruzamiento entre moléculas (figura 3c).
- Captura detrás de membrana semipermeable (Scragg, 2002).

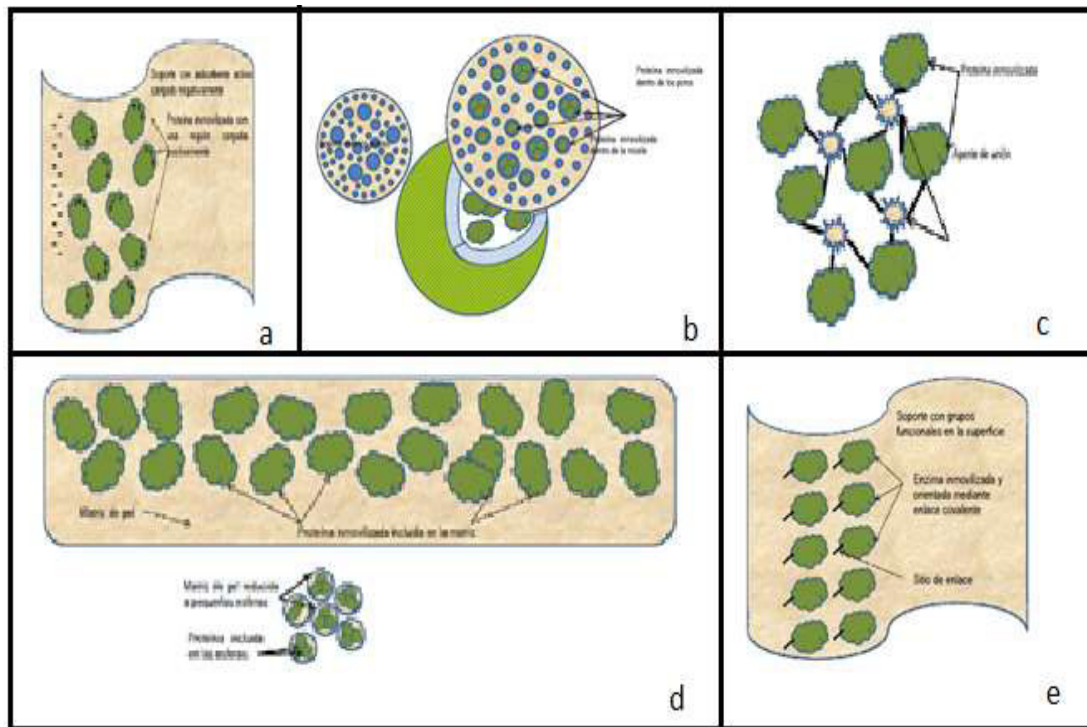


Figura 3 Métodos de inmovilización de enzimas.

Fuente: (Fajardo, Osuna, Villa Velázquez, Escalante, & Ibarra, 2011).

Nota: a) adsorción, interacción de enzimas positiva con las paredes del soporte negativo. b) Microencapsulación por perlas porosas o micelas. c) Entrecruzamiento de enzimas. d) Formación de matriz por polímero en gelificación. e) enlace covalente con el soporte.

El principal objetivo de la inmovilización es mantener la viabilidad celular y disminuir factores que afecte la reacción durante la producción en una reacción.

2.4.2 Alginato de calcio

El alginato es un polisacárido proveniente de la pared celular de las algas marinas, se encuentra como sal de ácido algínico y es utilizado en la industria alimenticia como espesante o emulsionante. Igualmente, es utilizado en los laboratorios de biología en la fijación de cepas de distintos microorganismos. Dentro de sus propiedades están: fisicoquímicas con una alta viscosidad, es biodegradable y debido a su inocuidad es permitido por la FDA (Avendaño-Romero, López-Malo, & Palou, 2013).

El alginato de calcio es ampliamente utilizado en la inmovilización, debido a que forma un gel con capacidad de mejorar la actividad enzimática, la estabilidad y la reutilización (Datta, Christena, & Rajaram, 2013). El modelo de gelificación del alginato es conocido como modelo “caja de huevo” (figura 4), basado en la dimerización de la cadena lineal, cuando el ácido algínico es hidratado a pH bajos de 3 -4, forma un gel de alta viscosidad (Avendaño-Romero, López-Malo, & Palou, 2013).

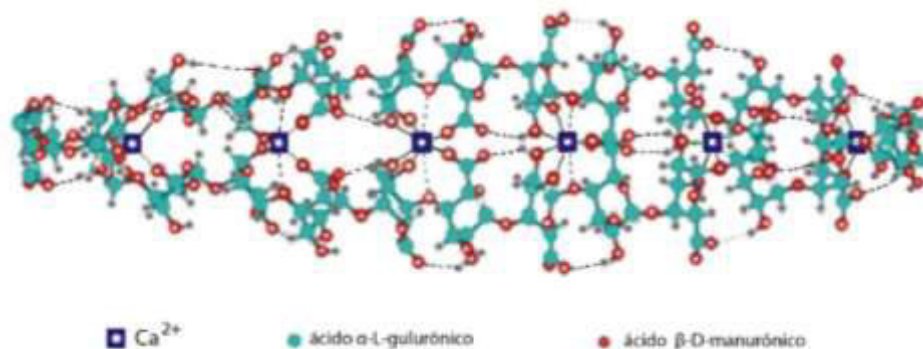


Figura 4 Modelo caja de huevo del alginato de calcio.
Fuente: (Avendaño-Romero, López-Malo, & Palou, 2013).

3 CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PARTICIPANTES

El desarrollo del proyecto se realizó bajo la dirección del Dr. Luis E. Trujillo Ph.D y colaboración del Dr. Rodrigo Avalos.

3.2 ZONA DE ESTUDIO

El trabajo de investigación se realizará en el laboratorio de Biotecnología en el Centro de Investigaciones científicas (CENCINAT) Que se encuentra en el campus matriz de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicado en Sangolquí, con dirección: Av. El Progreso S/N vía Amaguaña, cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, Ecuador y con coordenadas Latitud 0°18'53,891'' (Oeste), Altura Elipsoidal 2518.640 m.

3.3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El desarrollo investigativo se inició con una revisión bibliográfica en el área de obtención fructooligosacáridos y aplicaciones, parámetros de crecimiento de levaduras, así como la obtención de biomasa y enzima fructosiltransferasa en diferentes bases de datos en inglés y español.

3.4 MATERIALES Y REACTIVOS

Se especifican los materiales, reactivos, equipos realizados de la investigación planteada. En la tabla 3 se encuentra la contribución por parte del laboratorio de Biotecnología del CENCINAT de la Universidad de las fuerzas Armadas ESPE.

Tabla 3**Aporte de laboratorio planteado (materiales, equipos y reactivos).**

Materiales, equipos y reactivos provistos por el Laboratorio de Biotecnología			
Ítem	Detalle	Cantidad	Descripción
1	Incubadora	1	
2	Balanza analítica	1	
3	pHmetro	1	
4	HPLC	1	
5	Espectrofotómetro	1	
6	Refrigerador	1	
7	Mechero	1	
8	Cámara de baño maría	1	
9	Plancha de calentamiento	1	Del 1 al 24 son equipos y materiales Materiales
10	Microscopio óptico	1	
11	Microondas	1	
12	Cámara de electroforesis vertical	1	
13	Cámara de electroforesis horizontal	1	
14	Juego de micropipetas	1	
15	Autoclave	1	
16	Matraz 1l, 500 ml , 250 ml	7	
17	Matraz 1l, 500 ml , 250 ml	7	

18	Probeta 100 ml	1	
19	Espátula	1	
20	Agitador magnético	1	
21	Vaso de precipitación 1 L , 500 ml , 10 ml	6	
22	Embudo de vidrio	1	
23	Celdas 1cm	15	
24	Matraz balón aforado 1L, 500 ml, 10ml,	7	
25	Agua destilada grado HPLC	1	Reactivos
26	Agar		
	Extracto de levadura		
	Peptona		
	Glicerol		
	Sacarosa		
	Fructosa		
	Acetona		
	Urea		
	Ácido acético		
	Tris base		
	PBS		
	DNS		

3.5 Potenciación del cultivo de levadura *Pichia pastoris* en medio YPG

Para el crecimiento y mantenimiento de la levadura hospedera se utilizó el medio YPG en líquido y sólido que contiene extracto de levadura al 2%, peptona, 1% y

glicerol 1%, para el medio sólido se colocó agar al 1%. Dicho medio líquido se realizó en matraz de 500ml y se vertió el 11% del volumen total del matraz. Los frascos fueron esterilizados en el autoclave durante 20 minutos, el cultivo puro de levadura *Pichia pastoris* recombinante fue proporcionada por el Dr. Luis E. Trujillo, obtenida a partir de trabajos anteriores, posteriormente se procedió a colocar 25 ul del antibiótico higromicina como agente de selección

Para el medio sólido se inoculó una caja petri en forma estriada con un asa recta, manteniendo la asepsia, al igual que los frascos con medio líquido.



Figura 5 Preparación de medio YPG para el cultivo de levadura *P. pastoris*

Nota: a) medio sólido en cajas petri b) medio líquido en Erlenmeyer de 500ml de capacidad.

Los frascos con medio líquido se dejaron en agitación a 180 rpm en el agitador orbital de la marca OrbiCult AS1 (figura 6), mientras los cultivos en caja Petri en la incubadora a 30 °C.



Figura 6 Cultivos de levadura a 180 rpm a los 4 días de agitación.

3.6 Determinación de la Densidad Óptica

La densidad óptica (DO) se la realizó para determinar el crecimiento de la levadura, puesto que existe una relación directa entre la DO y el crecimiento. Para ello se tomó con una micropipeta alícuotas de 1 ml de los medios de cultivo, esto realizó tres veces por día y se utilizó medio sin cultivar como blanco. Se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro **Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis**.

3.7 Obtención de Biomasa y enzima

Se recolectó el cultivo en tubos falcón de 50 ml, posteriormente se centrifuga a 4000 rpm y temperatura 4 °C por 15 minutos. Se procedió a separar el sobrenadante donde se encuentra la enzima libre y el sedimentado que es levadura. Se filtró el sobrenadante en filtros de jeringa con poros de 0,22 μm para evitar cualquier la presencia de organismo o residuos ajenos a nuestro cultivo, mientras la biomasa fue recolectada en tubos falcón previamente esterilizados. Se almacenó a 4 °C tanto la biomasa obtenida como la enzima libre.

3.8 Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

El DNS es un reactivo utilizado para medir azúcares reductores. En nuestro caso se utiliza para medir la glucosa liberada durante la reacción de transfructosilación (Ruiz et al., 2011). Se preparó 500 ml de solución DNS. Se pesó 150 g de tartrato de sodio y potasio, además 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico y finalmente 8 g de hidróxido de sodio (NaOH). Se procedió a disolver los reactivos; en 200 ml de agua destilada se disolvió completamente el NaOH, durante la agitación se colocó lentamente el tartrato de Na-K, se enrasó a 400 ml y finalmente se añade el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se depositó en un frasco ámbar y tapado con papel aluminio, la solución de mantuvo en agitación toda la noche, para concluir enrasó a 500 ml y se filtró la solución para evitar la formación de grumos (Bello, Carrera, & Días, 2006).

3.9 Medición de la actividad enzimática

Para la medición de la actividad enzimática de la enzima libre asociada a las células o células inmovilizadas, se realizó una curva de calibración, con una solución de glucosa (100 mg/dl) y del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), que tiene capacidad de oxidar a los azúcares reductores. Posteriormente se midió en espectrofotómetro con una longitud de onda de 546 nm.

Partiendo de la solución patrón de glucosa 10 g/L, se realizó una serie de diluciones a distintas concentraciones: 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3 y 3.5 g/L en tubos eppendorf. A cada uno de los tubos, se colocó 500 μ L de solución DNS y se sometió a calentar por 8 minutos cuando empiece la ebullición del agua, para que se dé la reacción. Se tomó en consideración un blanco que consta de DNS con agua, se medirá las absorbancias en el UV-VIS.

Para obtener el volumen necesario que corresponde a las concentraciones de glucosa que se plantearon: 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3 y 3.5 g/L se usó la siguiente ecuación:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \text{ (1)}$$

Donde:

V_1 : Volumen empleado de la solución patrón de fructosa.

C_1 : Concentración de la solución patrón de fructosa (g/L).

V_2 : Volumen final de la preparación.

C_2 : Concentración final planteada de la preparación (g/L).

En la ecuación (1), se encontró el término V_1 , para obtener las diferentes concentraciones deseadas. Se generó una tabla que relaciona las concentraciones de las diferentes soluciones de fructosa y la absorbancia obtenidas en cada una de ellas ($\lambda = 546$ nm). A partir de dicha tabla, se realizó un ajuste lineal de curva por medio del software Excel y se obtendrá recta de la forma:

$$y = ax + b \text{ (2)}$$

Donde:

y : Absorbancia de la muestra problema.

x : Concentración (g/L) de fructosa.

La concentración de la glucosa liberada x . Se encontró de la ecuación (2), teniendo en cuenta un coeficiente de correlación (R^2) $> =$ al 0.96, con este valor se discriminará errores y se confirmó que los datos no están muy dispersos (Guzmán et al., 2013).

Para la determinación de la actividad enzimática. Se centrifugaron los medios de cultivo a 4000 rpm a 4 °C por 20 minutos, de tal manera que las células se precipiten y la

enzima de interés permanezca en el sobrenadante. A continuación, una solución de sacarosa al 30% en acetato de sodio 60 mM (pH= 6.5) fue el sustrato utilizado.

Se colocó en un tubo Eppendorf (tubo de reacción), 320 μ L de solución de sacarosa, 80 μ L del sobrenadante que contiene la enzima y 500 μ L del reactivo DNS, el procedimiento se realizó en frío. Posteriormente, se incubó a 30°C tres tubos de reacción a diferentes tiempos (1, 2 y 3 minutos), se inactivó la enzima sometiendo el tubo a 100 °C por 5 min. Se realizó tres repeticiones. Cada tubo de reacción, se midió en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 546 nm en celdas de cuarzo 1 cm.

La actividad enzimática se calculó en Unidades Internacionales (U), indicando la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato en productos, en un minuto de reacción, bajo condiciones determinadas.

$$A = \frac{CT}{t} \quad (3)$$

Donde:

CT: cantidad de enzima que cataliza 1 μ mol de sustrato en productos.

t: tiempo en minutos

La actividad específica de la enzima se calculó (U/mg o ml enzima), indicando la pureza de la enzima.

$$AE = \frac{A}{mg \text{ o } ml \text{ proteína}} \quad (4)$$

3.10 Caracterización de la enzima producida por *P. pastoris*

La caracterización de diferentes muestras de la enzima 1-SST fructosiltransferasa, que se expresa previamente en *P. pastoris* fueron mediante SDS – PAGE al 12% (w/v) para verificar pureza de la preparación y posteriormente, se procedió a montar la cámara de electroforesis vertical. Se colocó entre las placas de vidrio alrededor de 7 mL de

resolving gel, se esperó su solidificación para después verter 3 mL de stacking gel (Tabla 4).

Tabla 4

Reactivos necesarios para la preparación del gel de electroforesis.

Reactivo	Resolving Gel (mL)	Stacking Gel (mL)
Agua	3.3	3.4
30% acril: bisacrilamida	4	830 uL
1,5 M Tris pH 8,8	2.5	630 uL (pH = 6.8)
10% SDS	0.1	50 uL
10% APS	0.1	50 uL
TEMED	4 uL	5 uL

Para la preparación de la muestra se colocó en un tubo eppendorf 15 μ L de la muestra de la enzima y se añadió 5 μ L del buffer de carga (Tabla 5). Se cargó 15 μ L de la muestra preparada en cada pocillo.

Tabla 5

Reactivos necesarios para la preparación de la solución de carga de la muestra a 4X.

Reactivo	Volumen
Tris 0,5 M (pH 6,8)	2.5 mL
SDS al 10 %	2.5 mL
2-Mercaptoetanol	2.5 mL
Glicerol	2.5 mL
Azul de bromofenol	1 mg

Para la corrida electroforesis se colocó el buffer de electroforesis (Tabla 6) hasta que cubra toda la extensión del gel y se aplicó 120 V durante dos horas aproximadamente, se

sacara el gel a una bandeja evitando dañarlo. Una vez finalizada la transferencia, se teñió el gel de electroforesis, con la solución de tinción (Tabla 7), durante 2 horas a temperatura ambiente y en la Sorbona. Posteriormente, se pasó el gel a una solución de destinción (Tabla 8) durante toda la noche y a temperatura ambiente (Yabar, 2003).

Tabla 6

Reactivos necesarios para preparar el buffer de corrida.

Reactivo	Cantidad
Tris base	3.038 gr
Glicina	15.01 gr
SDS	1 gr

Fuente: (Yabar, 2003).

Tabla 7

Reactivos necesarios para la preparación de la solución de tinción.

Reactivo	Cantidad
Azul brillante de coomasie	0.25 g
Metanol:H ₂ O (v/v 1:1)	90 mL
Ácido acético glacial	10 mL

Fuente: (Yabar, 2003).

*Se hace circular a través de papel filtro para eliminar la presencia de residuos y se deja en reposo por una semana en un frasco oscuro.

Tabla 8***Reactivos necesarios para la preparación de la solución de destinción.***

Reactivo	Volumen
Ácido acético glacial	10 mL
Metanol	50 mL
Agua destilada	40 mL

Fuente: (Yabar, 2003).

**Figura 7 Instalación, preparación y aplicación de muestras en la cámara de electroforesis.**

3.11 Determinación de pureza de las cepas por Microscopía

Con el fin de comprobar la contaminación del cultivo de la cepa recombinante de *P. pastoris* se realizó una tinción Gram. Para la cual se tomó una muestra del cultivo de la levadura en medio YPG en un portaobjetos cerca de un mechero. A continuación, se fijó la muestra de *P. pastori* y se colocó cristal de violeta durante un minuto, se enjuagó con agua destilada y se colocó lugol, durante el mismo tiempo, luego de lo cual se proporcionó 10 gotas de decolorante y finalmente, se teñó con safranina durante un minuto. Luego de enjuagar el portaobjetos se observó la presencia de células de

levaduras teñidas con el colorante safranina y la ausencia de otros tipo de organismos en el microscopio con el lente de 100X.

3.12 Inmovilización celular

Se preparó 50 ml de solución de alginato de sodio por cada concentración de 2%,3% y 4%, posteriormente se realizó 300 ml de solución de cloruro de calcio a 0,5 M. En la obtención de biomasa se aplicó la relación entre 0.5 a 1.5 g levaduras (peso húmedo) por cada 10 ml de solución alginato de sodio. La mezcla obtenida se disuelve constantemente. En la obtención de perlas se hizo gotear la mezcla obtenida sobre un vaso de 250 ml con la solución de cloruro de calcio. Se dejó precipitar, además se dejó en agitación y se lavó con agua destilada (Tapia et al., 2009).

3.13 Evaluación de la actividad de productos de las células inmovilizadas.

Se recolectó 2 g de las perlas obtenidas de cada una de las concentraciones 2%, 3% y 4%, y se suspendió en 3ml de solución de sacarosa al 30% por 1 hora a 35 °C, Se procedió a recuperar las perlas y se recolectó la solución que posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 6 min. Luego se recolectó el sobrenadante. En eppendorf se colocó sobrenadante y DNS en relación 1:1. Se tomó 1ml y se colocó en celdas de 1cm para la medición a 546 nm.

Posterior se analizó la actividad específica obtenida por el biocatalizador con la ecuación 4.

3.14 Detección del perfil de productos como resultados de la incubación de perlas de alginato con sacarosa por Cromatografía Líquida de alta Resolución HPLC

Se realizó esta técnica con el fin de analizar el perfil de productos resultantes. Así como el contenido de 1-kestosa, de diferentes reacciones de la enzima recombinante 1-SST y las perlas que conforman el biocatalizador sobre sacarosa. Para lo cual se realizó ensayos: con perlas obtenidas de la inmovilización y con células libres. A los ensayos se colocó 4 ml de sacarosa al 50% en buffer acetato (pH 6.5) a 30 °C y agitación de 200 rpm. A continuación se tomó muestra a distintos tiempos de reacción pasando 2 horas.

Obtenidas alícuotas se procedió a preparar las muestras en viales para inyectar al HPLC (Shodex, 2015). Los parámetros con los que se realizará la cromatografía, se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9

Parámetros para la realización de la cromatografía HPLC para el análisis de azúcares.

Características	
Columna	HyperRez XP carbohydrate Na (300*7.7 mm)
Índice de flujo	0.28 mL/min
Fase móvil	agua
Volumen de inyección	6 µl
Detector	Índice de refracción (RI) a 35 °C
Temperatura de la columna	85°C
Tiempo	37 min

3.15 Preparación de estándar de kestosa

Durante las corridas realizadas en el equipo de cromatografía líquida (uHPLC), utilizando las condiciones de la tabla 7. Se recolectó continuamente cada corrida una muestra mientras se formaba el pico correspondiente con el tiempo de retención. Se procedió a guardar en refrigeración un tubo falcon de 15 ml.

3.15.1 Protocolo de concentración de kestosa de las muestras recolectadas.

En base a las muestras obtenidas en cada corrida de uHPLC, se realizó un protocolo de concentración del trisacárido. Se lavó 3 veces con agua destilada el balón de 250 ml, quitando completamente manchas o impurezas. Se procedió a secarlo completamente en la estufa a 70 °C por unos 6 minutos. Se deja enfriar por 10 min y se pesa el balón en una balanza analítica. Posteriormente se coloca 8 ml de la muestra que fue obtenida para concentrarla en el rotavapor BUCHI R-210, a una temperatura de 60-65 °C de baño maría y una presión que llegue continuamente hasta 110 mbar, hasta el punto de deshidratado.



Figura 8 Preparación de las condiciones en la desecación de sirope en rotavapor.

Se seca la parte exterior del balón y se vuelve a pesar para obtener la cantidad final del trisacárido formado.

3.15.2 Solución estándar de kestosa.

Se procede a lavar con 1ml agua destilada el balón, hasta disolver completamente los residuos pegados a las paredes, se recolecta un tubo eppendorf y se vuelve a lavar con 1ml de agua destilada y se recolecta. Finalmente se pasan los 2 ml recolectados de solución por un filtro de 0.22 μ m.

3.16 Análisis cualitativo de fructanos con cromatografía de capa fina (TLC).

Las muestras de reacción se analizaron también, como alternativa a la detección por HPLC, en una lámina de capa fina. La lámina se colocó con un capilar 5 veces sacarosa, fructosa y muestra de la reacción realizada, dejando secar para evitar que se expanda la muestra, además evitando que se dañe la placa. Seguidamente se realizó tres veces en acetona: agua (90:10) como fase móvil. Se procedió a teñir los azúcares con un spray de etanol absoluto y ácido sulfúrico 10% para el cual después de haber corrido en la solución orgánica se roció por toda la lámina. Las láminas son incubadas a 100 °C en la estufa por 10 minutos (Trujillo et al., 2004).

3.17 Análisis estadístico

Para la preparación de biocatalizadores en la optimización para la producción de FOS se tendrá en cuenta los siguientes parámetros.

3.17.1 Fase uno: obtención de la curva de crecimiento de *Pichia pastoris*

Se recolecta la biomasa en periodos de tiempo.

3.17.1.1 Diseño experimental

Para comprobar el crecimiento de biomasa en los cultivos, se aplicará el método espectrofotométrico en donde se analizará la varianza, desviación estándar y media para realizar una curva de crecimiento de *Pichia pastoris*. También se identificará la etapa exponencial del crecimiento para la recolección de biomasa relacionada con la mayor producción de enzima.

3.17.1.1.1 Factor controlable

Concentración de biopolímero y cantidad de biomasa

3.17.1.1.2 Modelo experimental

Para el ensayo se realizarán cuatro repeticiones como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

Modelo para realización de la curva de crecimiento

Tiempo	Observaciones				Totales	Promedio
T0	Y ₁₁	Y ₁₂	Y ₁₃	Y ₁₄	Y ₁	\bar{Y}_1
T1	Y ₂₁	Y ₂₂	Y ₂₃	Y ₂₄	Y ₂	\bar{Y}_2
T2	Y ₃₁	Y ₃₂	Y ₃₃	Y ₃₄	Y ₃	\bar{Y}_3
T3	Y ₄₁	Y ₄₂	Y ₄₃	Y ₄₄	Y ₄	\bar{Y}_4
T4	Y ₅₁	Y ₅₂	Y ₅₃	Y ₅₄	Y ₅	\bar{Y}_5
T5	Y ₆₁	Y ₆₂	Y ₆₃	Y ₆₄	Y ₆	\bar{Y}_6
T6	Y ₇₁	Y ₇₂	Y ₇₃	Y ₇₄	Y ₇	\bar{Y}_7
T7	Y ₈₁	Y ₈₂	Y ₈₃	Y ₈₄	Y ₈	\bar{Y}_8
T8	Y ₉₁	Y ₉₂	Y ₉₃	Y ₉₄	Y ₉	\bar{Y}_9
T9	Y ₁₀₁	Y ₁₀₂	Y ₁₀₃	Y ₁₀₄	Y ₁₀	\bar{Y}_{10}

3.17.1.1.3 Variables de respuesta

La variable de respuesta será la densidad óptica que se encuentre en las muestras que refleja el crecimiento de la levadura.

3.17.1.1.4 Modelo estadístico

El modelo se puede expresar como:

$$Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde $i = 1, \dots, a$; $j = 1, \dots, n_i$, siendo μ_i el valor medio de Y , la variable respuesta, en la población o nivel i -ésimo, y ε_{ij} es el error aleatorio que incluye a todos los factores que influyen en la respuesta y no están incluidos en el modelo.

Alternativamente, se puede expresar de esta manera:

$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$ donde $i = 1, \dots, a$; $j = 1, \dots, n$, suponiendo grupos de igual tamaño.

De este modo,

- (i) Y_{ij} es la observación (i, j) -ésima.
- (ii) μ es la media global.
- (iii) τ_i es el efecto del i-ésimo tratamiento.
- (iv) ε_{ij} es el error aleatorio, tal que $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ independientes entre sí, $E[\varepsilon_{ij}] = 0$ y $V ar[\varepsilon_{ij}] = \sigma^2$.

Se supone, además, que las unidades experimentales están en un ambiente uniforme, lo que lleva a un diseño completamente aleatorizado. Para este caso se realizará un análisis de varianza y un ANOVA. Los errores experimentales que serán considerados, son los que ocurren debido a la pipeteo por parte del investigador. Los análisis se realizarán en el programa INFOSAT y los resultados serán interpretados en base a la realización de la curva de crecimiento para la identificación de la fase exponencial.

3.17.2 Fase dos: preparación de los biocatalizadores en base a la encapsulación de *Pichia pastoris*

3.17.2.1 Producción de fructooligosacáridos

Se evaluará la cantidad de polisacáridos obtenidos a partir del sustrato establecido, se seleccionará el biocatalizador que contenga una mayor producción de fructooligosacáridos a las mismas condiciones.

3.17.2.2 Diseño experimental

El diseño experimental que se empleará será un arreglo factorial 3x3, Pues se evaluará la combinación de dos factores a 35°C: la cantidad de biomasa y 3 concentraciones del biopolímero 2%, 3%, 4%, más un testigo que consiste en células libres.

3.17.2.2.1 Factores controlables

Cantidad de biomasa utilizada: las diferentes relaciones de levadura *Pichia pastoris* utilizada se describen en la tabla 11.

Tabla 11**Cantidad de biomasa húmeda**

Código	Descripción
L1	0.5 g de biomasa por cada 10ml de alginato de calcio
L2	1 g de biomasa por cada 10ml de alginato de calcio
L3	1.5 g de biomasa por cada 10ml de alginato de calcio

Concentración de alginato de calcio: las 3 concentraciones se describen en la tabla 12.

Tabla 12**Concentraciones del biopolímero**

Código	Descripción
A1	Alginato de sodio al 2%
A2	Alginato de sodio al 3%
A3	Alginato de sodio al 4%

Temperatura de reacción: para la producción se realizara a la temperatura 35°C.

3.17.2.2.2 Tratamientos

Se llevará a cabo 9 tratamientos (3x3) probándose la eficiencia en la producción de fructooligosacáridos, como se detalla en la tabla 13.

Tabla 13

Tratamientos en la preparación de los biocatalizadores

Tratamiento	Código	Descripción
T1	L1A1	Perla de 0.5 g de biomasa, 2% de alginato de calcio
T2	L1A2	Perla de 0.5 g de biomasa, 3% de alginato de calcio
T3	L1A3	Perla de 0.5 g de biomasa, 4% de alginato de calcio
T4	L2A1	Perla de 1 g de biomasa, 2% de alginato de calcio
T5	L2A2	Perla de 1 g de biomasa, 3% de alginato de calcio
T6	L2A3	Perla de 1 g de biomasa, 4% de alginato de calcio
T7	L3A1	Perla de 1.5 g de biomasa, 2% de alginato de calcio
T8	L3A2	Perla de 1.5 g de biomasa, 3% de alginato de calcio
T9	L3A3	Perla de 1.5 g de biomasa, 4% de alginato de calcio
Control +	C+	Célula libre

3.17.2.2.3 Repeticiones

Se realizará tres repeticiones para cada tratamiento.

3.17.2.2.4 Unidad Experimental

Los tratamientos serán aplicados en unidades experimentales que consisten en matraz Erlenmeyer de 25 ml. Se tendrá un total de 27 unidades experimentales resultantes de 9 tratamientos y 3 repeticiones. Estas unidades experimentales se mantendrán en condiciones de laboratorio durante 2 días.

3.17.2.2.5 Variables

Variables de respuesta: Las variables de respuesta será:

La producción de fructooligosacáridos.

3.17.2.2.6 Modelo Estadístico

Para el análisis de los resultados de un modelo A x B tratamientos que se replican n veces, el diseño está dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} :$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, n$$

Donde μ es la media general, α_i es el efecto debido al i -ésimo nivel del factor A, β_j es el efecto del j -ésimo nivel del factor B, $(\alpha\beta)_{ij}$ representa al efecto de interacción en la combinación ij y ε_{ijk} es el error aleatorio que se supone sigue una distribución normal con media cero y varianza constante $\sigma^2(N(0, \sigma^2))$ y son independientes entre sí.

Para estas variables la evaluación se realizará durante tres meses desde el primer día en que se aplican los tratamientos con los exudados radicales. El análisis estadístico consistirá en efectuar un análisis de ANOVA, prueba de significancia según el método de Duncan para diferenciar entre tratamientos.

3.17.2.3 Error aleatorio y experimental

Los errores aleatorios que serán considerados, son los debidos a la variabilidad, lo que conlleva errores en los reactivos o fallas en los equipos.

Los errores experimentales que serán considerados, son los que ocurren debido a la manipulación por parte del investigador.

3.17.2.4 Análisis

El programa que se utilizará para realizar los análisis será INFOSAT.

3.17.2.5 Interpretación

Los resultados serán interpretados en base a la cuantificación de prebiótico obtenido en la reacción.

3.17.2.6 Conclusiones finales

Después de 2 semanas se terminará el ensayo y se identificara la cantidad de fructooligosacáridos producidos.

3.18 HIPÓTESIS

En la preparación de biocatalizadores existe una concentración de *Pichia pastoris* que, mejoran la producción de fructooligosacáridos.

3.19 OPERATIVIDAD DE LAS VARIABLES

La operatividad de las variables y sus factores a determinar se indican en la tabla 14.

Tabla 14 Variables y factores a determinar

Variables	Factor a determinar
Masa húmeda de biomasa	Cantidad de FOS
Concentración de alginato	

4 CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Control de contaminación en medio de cultivo YPG

A partir de una colonia aislada crecida en medio YPG se inocularon cultivos de 100 ml de YPG líquido. Se realizó una tinción Gram cada día de los frascos de cultivo de la levadura *P. pastoris*, se procedió a identificar en el microscopio óptico la morfología de la levadura, además de identificar la presencia de algún microorganismo contaminante que se encuentre en el medio de cultivo e interfiera con la recuperación de biomasa. Se observó que los cultivos están libres de microorganismos contaminantes como se muestra en la figura 9. Por lo tanto los cultivos en medio YPG con que se trabajó se encuentran puros.

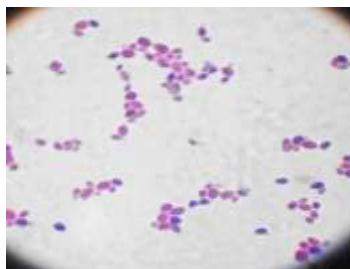
a



b



c



d

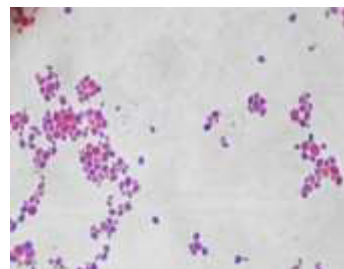


Figura 9 Tinción Gram realizada a 100x de los frascos de cultivo a diferentes fases de crecimiento, realizados cada día durante el crecimiento respectivo.

4.2 Curva de crecimiento de la levadura *P. pastoris*

En una primera etapa del proyecto se tomaron tres mediciones diarias las absorbancias a diferentes intervalos de tiempo con una longitud de onda de 600 nm, hasta llegar a la fase estacionaria de la curva de crecimiento, con el fin de obtener las características del crecimiento de *P. pastoris* en medio YPG con agitación de 180 rpm a temperatura ambiente, como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15

Medidas de resumen de la curva de crecimiento *P. pastoris*

Tiempo (h)	Variable	n	Media	D.E.	E.E.	Mín	Máy
0	D.O.	12	0.123	0.054	0.016	0.065	0.225
3	D.O.	12	0.125	0.059	0.017	0.061	0.252
6	D.O.	12	0.141	0.065	0.019	0.067	0.24
24	D.O.	12	0.58	0.345	0.1	0.148	1.155
27	D.O.	12	0.785	0.476	0.138	0.146	1.434
30	D.O.	12	0.869	0.558	0.161	0.147	1.61
48	D.O.	12	1.789	0.667	0.193	0.551	2.336
51	D.O.	12	1.862	0.612	0.177	0.727	2.408
54	D.O.	12	1.943	0.561	0.162	0.881	2.455
72	D.O.	12	2.302	0.093	0.027	2.15	2.457
75	D.O.	12	2.374	0.155	0.045	2.134	2.651

Se observó las medias obtenidas en cada intervalo de tiempo. Se obtiene que al día 4 la levadura llega a su fase estacionaria debido a q su crecimiento permanece estable. Para la identificación de las fases de la curva de crecimiento se realizó un análisis de variancia (ANOVA) como se muestra en la tabla 16.

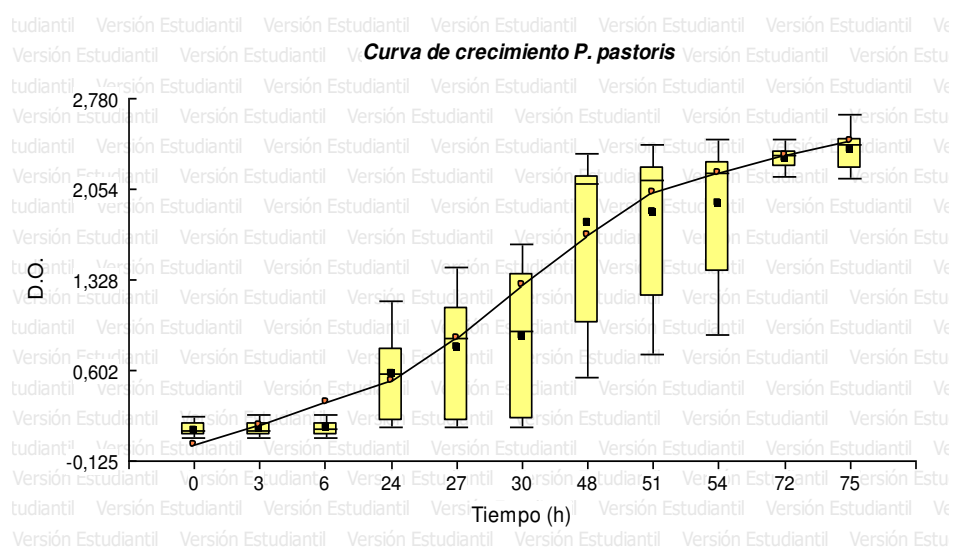


Figura 10 Curva de crecimiento de la levadura hospedera con diagrama de cajas tomando maximos y minimos en software Infostat.

Tabla 16

Análisis de Varianza para el crecimiento de levadura *P. pastoris*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
D.O.	132	0.83	0.81	34.84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	96.32	10	9.63	57.77	<0.0001
Tiempo	96.32	10	9.63	57.77	<0.0001
Error	20.17	121	0.17		
Total	116.49	131			

El análisis de varianza mostró que el p-valor es menor que el alfa, indicando que hay diferencias en las medias obtenidas en cada intervalo de tiempo. Para lo cual se pasó identificar las fases del crecimiento, se realizó una prueba de Tukey.

Tabla 17

Identificación de las fases de crecimiento Test:Tukey

Alfa=0.05

DMS=0.53779

Error: 0.1667 gl: 121

Tiempo	Medias	n	E.E.		
0	0.12	12	0.12	A	
3	0.13	12	0.12	A	
6	0.14	12	0.12	A	
24	0.58	12	0.12	A	B
27	0.78	12	0.12		B
30	0.87	12	0.12		B
48	1.79	12	0.12		C
51	1.86	12	0.12		C D
54	1.94	12	0.12		C D
72	2.3	12	0.12		C D
75	2.37	12	0.12		D

Medias con una letra común no son

significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Al comparar las medias durante los 4 días, se realizó la construcción de la curva como se muestra en la figura 10. Se obtuvo tres fases representativas: la fase de latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria.

4.3 Identificación y Actividad enzimática de la FTF producida durante el crecimiento. .

4.3.1 Cuantificación de glucosa liberada como resultado de la reacción de transfructosilación

Se realizó una curva de calibración para glucosa con el método de DNS, permitiendo ver el cambio de coloración a mayor concentración de azúcar reductor (figura 11), Debido a que el DNS actúa como reactivo oxidante. Se realizó a diferentes concentraciones de glucosa tomando sus medidas en el espectrofotómetro como se muestra en la tabla 18. Posteriormente se realizó regresión lineal con un coeficiente de correlación mayor igual a 0.96, se obtuvo la ecuación $Y = 0.9457x - 0.2408$ (5) con $r^2=0.9612$ como indica la figura 11.



Figura 11 Muestras colorimétricas a diferentes concentraciones de glucosa con reactivo de DNS

Nota: colores oscuros indican mayor concentración de glucosa.

Tabla 18

Datos obtenidos para la curva de calibración para glucosa a diferentes concentraciones.

Número de tubos	Concentración Glucosa (g/L)	Absorbancia
blanco	0	0
1	0.5	0.269
2	1	0.599
3	1.5	0.691
4	2.5	2.332
5	3	2.749
6	3.5	3.023

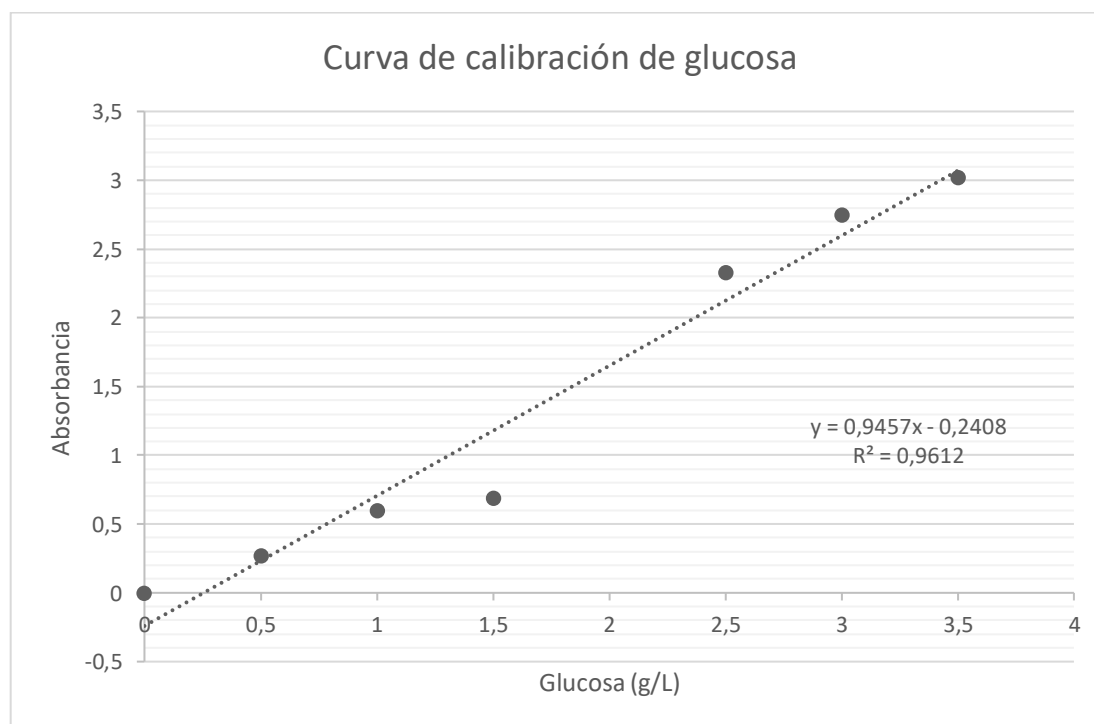


Figura 12 Curva de calibración a diferentes concentraciones de glucosa tomando un $r^2 > 0,96$.

4.3.2 Identificación de la producción y pureza de la enzima secretada al medio de cultivo durante la fase de crecimiento, utilizando SDS-PAGE

Se colocó dos muestras de enzima: recuperada del medio de cultivo y otra disuelta a partir de un proceso de secado. Se dejó correr a 30 mA por 1 hora, Después se realizó sucesivamente la tinción y destinción del gel de poliacrilamida, se observó la corrida del marcador de proteínas SeeBlue Plus 2 y se comparó con los carriles de las muestras de enzima como se muestra en la figura 11, se pudo apreciar el peso de la enzima que se encuentra entre 64 y 82 KDa según el marcador y con alta pureza lo que demuestra que las proteínas secretadas al medio extracelular cuando se utiliza *P. pastoris* tienen una alta pureza lo que elimina procedimientos posteriores de purificación que son caros y consumen tiempo. Además se encontró que la muestra recuperada del medio de cultivo presenta una banda de más concentrada.

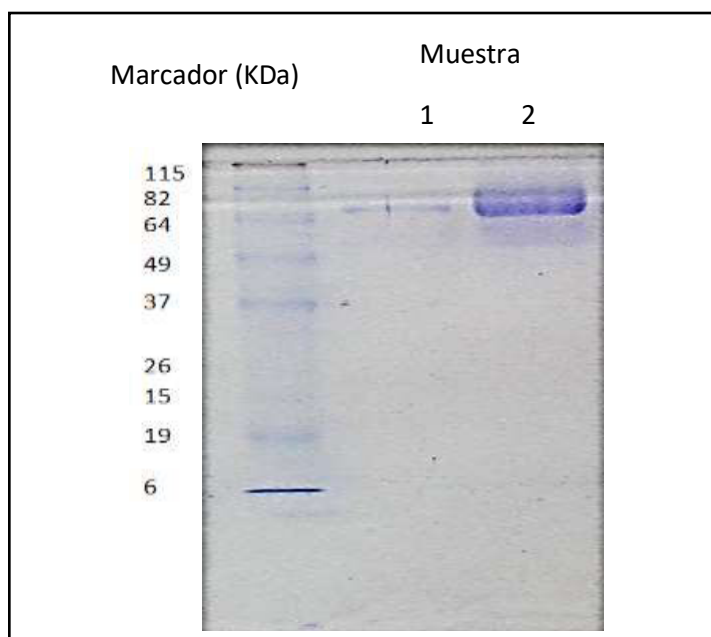


Figura 13 Gel de electroforesis SDS PAGE 12.5%.

Nota: Corrida de la enzima fructosiltransferasa, de lado izquierdo el marcador de proteínas SeeBlue Plus 2 en KDa y las muestra de enzima extracelular, 5 y 20 μ l respectivamente con más de 80% de pureza.

4.3.3 Actividad Enzimática

Se recogió 80 μ L de sobrenadante de cada tiempo de crecimiento de la levadura. Se midió la actividad específica de la enzima, para esto se reemplazó el valor obtenido en el espectrofotómetro en la ecuación 5, se obtuvo el valor de la glucosa como producto formado por la reacción enzimática. En la tabla 19 muestra la cantidad de producto formado y la actividad específica de enzima. La figura 14 muestra la relación de la curva de crecimiento y actividad enzimática extracelular. Se observa que a mayor crecimiento de la levadura es mayor la presencia de enzima en el medio de cultivo. Precisamente porque la enzima es producida durante el crecimiento.

Tabla 19

Actividad enzimática extracelular durante el crecimiento de la levadura *P. pastoris*.

Tiempo (h)	Absorbancia	Glucosa (μ mol/ml)	A.E(U/ml)
0	0.181	0.79316	9.914 \pm 0.06
3	0.179	0.78987	9.873 \pm 0.013
6	0.185	0.79950	9.993 \pm 0.011
24	0.277	0.97386	12.173 \pm 0.023
27	0.458	1.31388	16.432 \pm 0.084
30	0.397	1.19968	14.996 \pm 0.063
48	1.519	3.30770	41.346 \pm 0.139
51	1.736	3.71563	46.445 \pm 0.193
54	2.118	4.43373	55.422 \pm 0.356
72	2.912	5.92657	74.082 \pm 0.362
75	3.126	6.32956	79.12 \pm 0.321

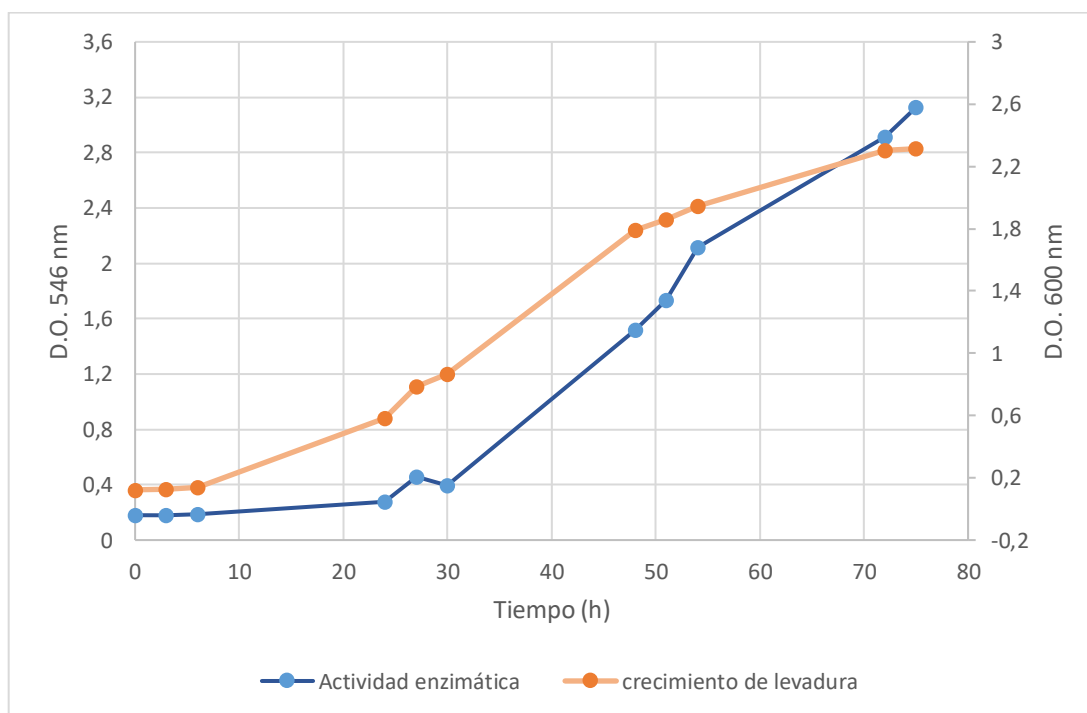


Figura 14 Curva de crecimiento de *Pichia pastoris* y actividad durante el crecimiento en medio YPG.

Nota: Utilizando como sustrato sacarosa 0,876 M, línea azul representa la cantidad de glucosa formada a 546nm, línea naranja representa la curva de crecimiento a 600nm, los datos representan la media de tres replicas.

4.4 Inmovilización de la levadura *P. pastoris*

4.4.1 Observación de la morfología y tamaño del biocatalizador

En la figura 18 se observa la forma del biocatalizador que mostro una forma esférica, además tomando en cuenta 15 diferentes perlas se determina que su diámetro promedio es de 0,5 cm.



Figura 15 Biocatalizador de células inmovilizadas productoras de FTF.

Nota: a) formación de las perlas de alginato en solución de CaCl_2 . b) y c) tamaño y forma del biocatalizador en el estereoscopio.

4.4.2 Cuantificación de los tratamientos de inmovilización

La inmovilización de células intactas presenta algunas ventajas desde el punto de vista de establecimiento de bioprocesos, Por este motivo se realizaron diferentes tratamientos con diferentes cantidades de células inmovilizadas, como se muestra en la tabla 13. Cada uno se realizó la reacción discontinua con sustrato sacarosa 0,876 M, después de 24 horas de reacción se analizaron e identificaron en el equipo uHPLC productos obtenidos. Además de una cuantificación como se muestra en la tabla 20, se analizó la producción de 1-kestosa con una prueba de Duncan y se observó el mejor tratamiento. Para la cuantificación de 1-kestosa se realizó la recolección de muestras con el tiempo de retención, esta alícuota se concentró en el rotavapor obteniendo 5,69 mg/ml de 1-kestosa.

Tabla 20**Cuantificación de productos obtenidos uHPLC**

Tratamiento	Glucosa mg/ml	Fructosa mg/ml	Sacarosa mg/ml	1- Kestosa mg/ml
L1A1	53,254	49,452	174,348	2,434
L1A2	57,239	25,083	133,251	24,247
L1A3	68,345	35,453	139,635	2,667
L2A1	79,345	20,134	128,266	59,613
L2A2	81,309	20,231	106,342	76,935
L2A3	36,892	20,345	245,24	2,768
L3A1	68,831	18,047	113,066	80,600
L3A2	73,704	17,342	139,409	62,499
L3A3	41,456	37,843	215,345	1,930
C+				95,83

El análisis ANOVA de la tabla 21. Se observa que la concentración de alginato es el factor que influye con respecto a la variable de respuesta. Posteriormente se realiza una prueba de Duncan para comparar las medias obtenidas y se observa que los tratamientos L3A1 y L2A2 se acercan al control positivo como se muestra en la tabla 22. Además que los tratamientos con la concentración de alginato al 4% dan una muy pobre producción. Se realiza una prueba de Shapiro Wills (ANEXO2), donde se comprueba la normalidad de los datos obtenidos con un p-valor = 0.0558, se acepta la hipótesis nula como se muestra en la figura 15.

Tabla 21**Análisis de varianza para los tratamientos en la producción de kestosa.**

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
kestosa		27	0,98	0,97	15,33
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25725,65		8	3215,71	98,77 <0,0001

Levadura	5596,8	2	2798,4	85,95	<0,0001
Alginato	16321,38	2	8160,69	250,65	<0,0001
Levadura*Alginato	3807,47	4	951,87	29,24	<0,0001
Error	586,04	18	32,56		
Total	26311,7	26			

Tabla 22**Comparación de los tratamientos con el Test Duncan, alfa 0.05**

Tratamiento	Medias	n	E.E.		
L3A3	1,93	3	3,24	A	
L1A3	2,67	3	3,24	A	
L2A3	2,77	3	3,24	A	
L1A1	23,77	3	3,24	B	
L1A2	24,25	3	3,24	B	
L2A1	59,61	3	3,24		C
L3A2	62,5	3	3,24		C
L2A2	76,94	3	3,24		D
L3A1	80,6	3	3,24		D
control +	95,83	2	3,96		E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

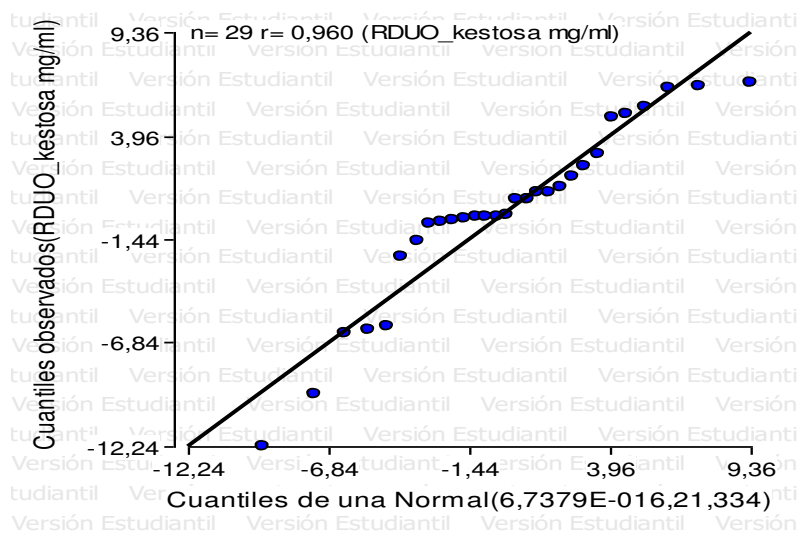


Figura 16 Grafica de Q-Q plot para la normalidad de los datos en los diferentes tratamientos en la producción de FOS.

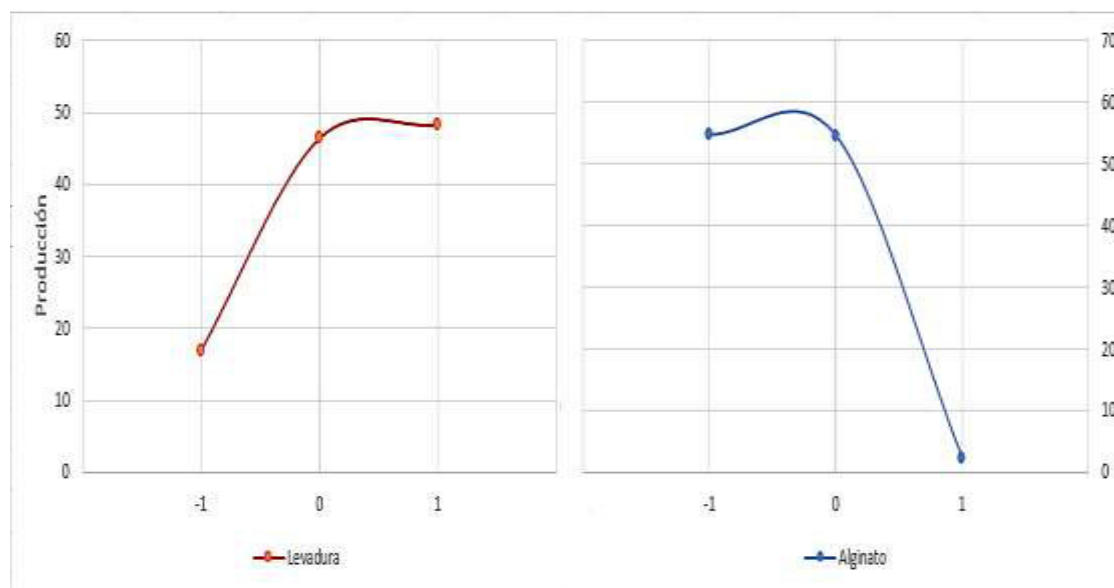


Figura 17 Los efectos principales para la producción de FOS.

Se grafican los efectos principales con respecto a la producción de 1-Kestosa. Se observa en la figura 16 que linealmente interfiere la levadura, siendo a mayor cantidad de levadura mayor producción, mientras que en el alginato se muestra que a mayor concentración menor producción de 1-kestosa. En la figura 17 se evidencia que el tratamiento L3A1, corresponde la concentración de alginato al 2% y de concentración de levadura 1.5, presente el tiempo de reacción se selecciona el que mayor estabilidad y producción de 1-kestosa

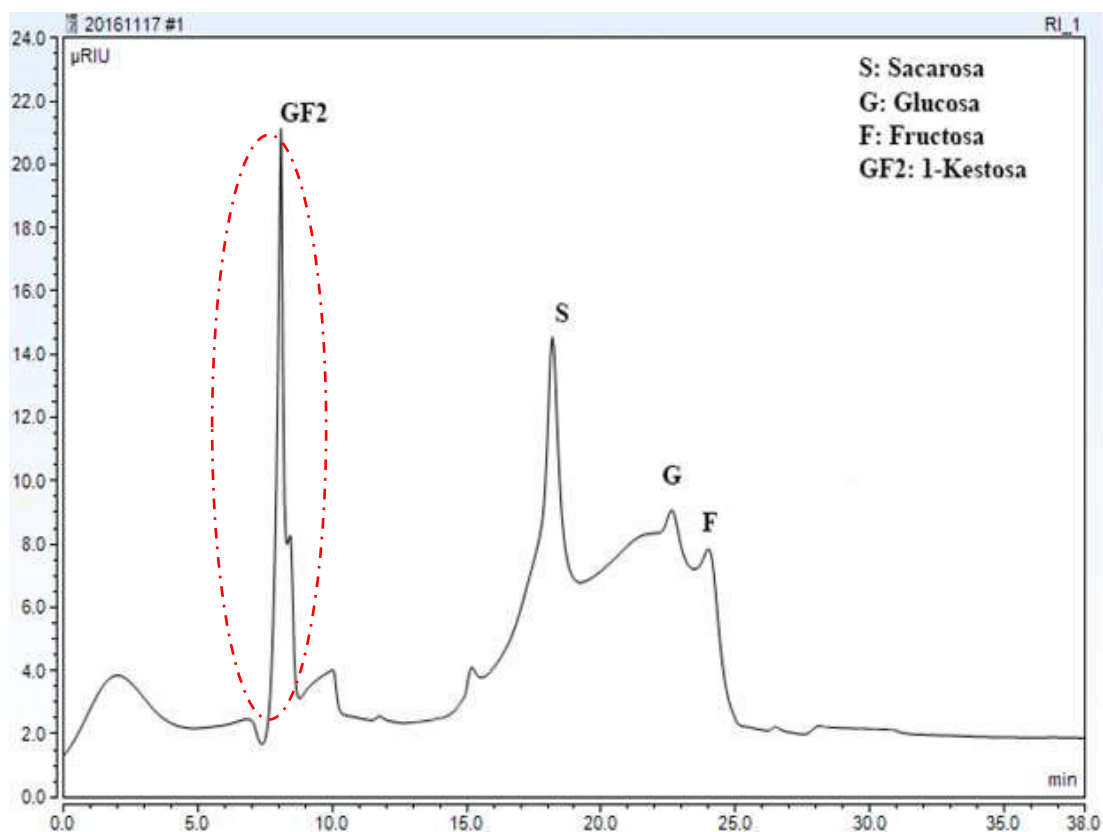


Figura 18 Cromatograma del sirope obtenido de la reacción con el tratamiento L3A1. Se identifica los picos de los productos obtenidos.

4.4.3 Análisis cualitativo de fructanos con cromatografía de capa fina (TLC).

La TLC se realizó como una forma de visualización previa a la cuantificación en HPLC., además de servir de método de análisis rápido en el proceso de reacción. Se realizó en placas de 11 cm de largo con 1.2 cm como inicio de partida, la figura 19 muestra la obtención cualitativa de productos de la reacción de biocatalizador. Se identificaron tres manchas de la muestra (M) de reacción y al ser comparados con los estándares de sacarosa (S) y fructosa (F), que muestran mayor recorrido en la placa por tener menor peso. Teniendo como resultado los factores de retardo R_f : 0.687 glucosa y fructosa, 0.587 sacarosa y 0.469 para trisacárido.

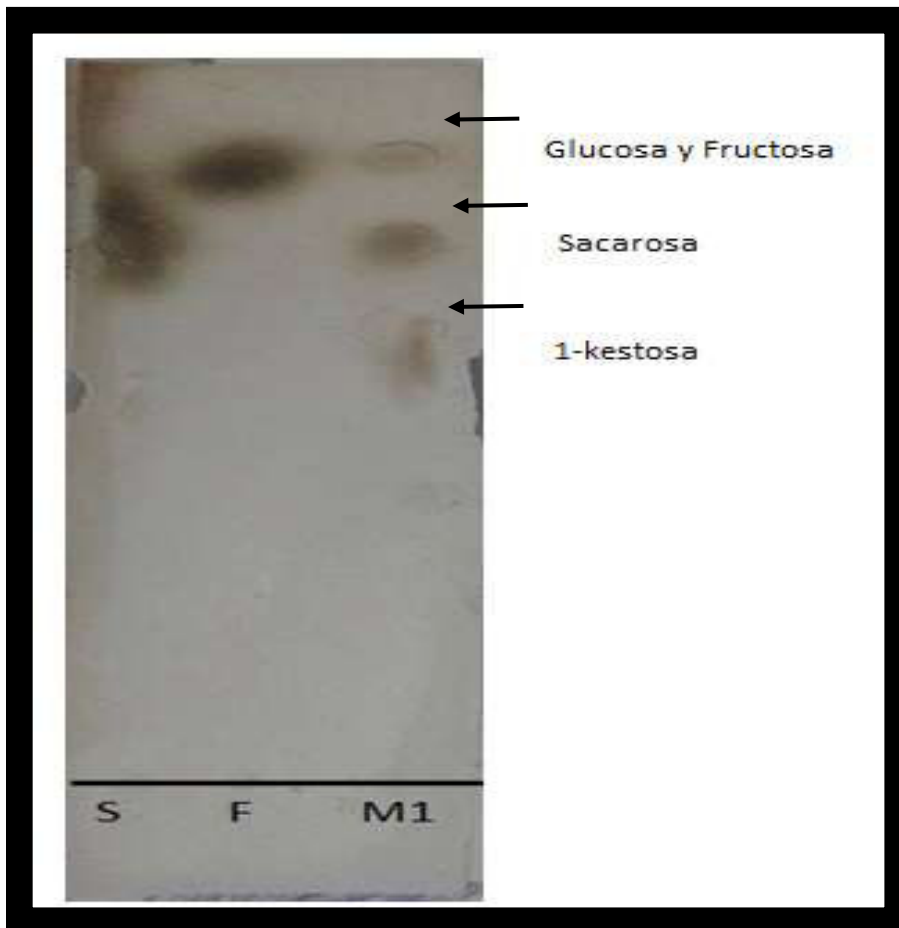


Figura 19 Placa de corrida de azúcares en cromatografía en capa fina

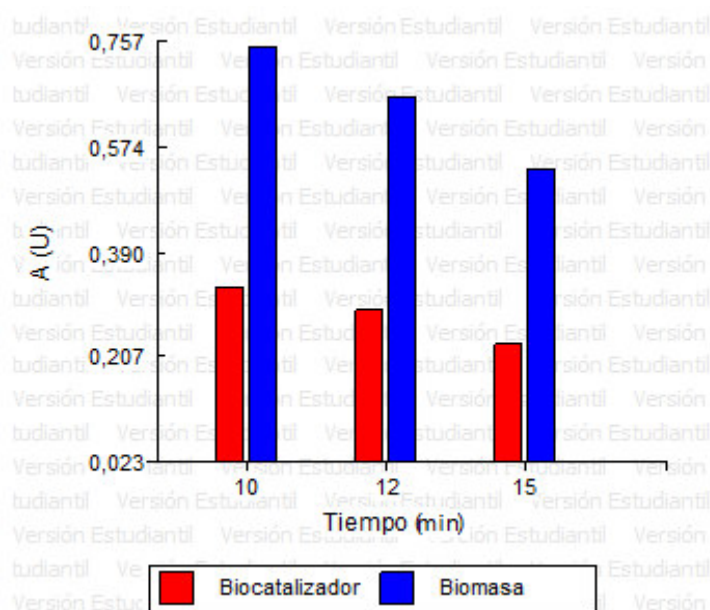
Notas: placa revelada a 85°C. M1 son los productos del sirope, obteniendo fructosa, sacarosa y 1-kestosa de la reacción del biocatalizador, comparados con sus estándares de sacarosa (S) y fructosa (F).

4.4.4 Comparación de la actividad de la biomasa libre recuperada y biocatalizador con espectrofotómetro utilizando el reactivo de DNS.

Se analizó la actividad con 4gr de biocatalizador y 1 gr de biomasa en 10 ml de sacarosa 0,876 M a distintos tiempos, utilizando reacción tipo batch se dejó en agitación 180 rpm, para finalizar la reacción se calentó a 70 °C por 10 minutos. La tabla 21 indica los valores obtenidos de la actividad obtenida.

Tabla 23**Actividad de biomasa y biocatalizador**

Tiempo (min)	Actividad (U)	
	Biocatalizador	Biomasa
10	0,330	0,747
12	0,287	0,660
15	0,230	0,536

**Figura 20 Actividad de la biomasa inmovilizada**

Nota: barra color rojo y sin inmovilizar barra azul. Las muestras fueron centrifugadas y filtradas por un milipore 0.22 μm .

$$Y_{PS} = \frac{\text{masa o moles totales del producto formado}}{\text{masa o moles de reactante utilizado para formar el producto}} \quad (6)$$

Analizando la actividad obtenida muestra que la célula libre muestra mayor actividad comparado con el biocatalizador, con estas observaciones muestra que el biocatalizador tiene un rendimiento teórico $Y_{PS}=0.019 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ a los 15 minutos de reacción. Finalmente se tiene un rendimiento teórico a las 24 horas $Y_{PS}=0.26 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. En

el ANEXO 3 se muestra los cromatogramas de la formación de producto en el tiempo, formando la aparición de 1-kestosa y la disminución de sacarosa. Teniendo que la inmovilización de células necesarias podrían aumentar para mejorar el rendimiento del biocatalizador.

Tabla 24

Cuantificación de la producción de 1-kestosa

tiempo	kestosa mg/ml
T0	0
T1	53.71
T2	58.798
T3	60.798
T4	72.479
T5	73.156
T6	77.231

El la cuantificación de FOS con el tratamiento L3A1 a distintos tiempos de reacción se obtiene el aumento progresivo de 1-kestosa durante el tiempo como se muestra en la tabla 23, además se ve la disminución de la sacarosa y la formación de los picos de glucosa y fructosa que son parte de los productos obtenidos de la fructosilación. En el ANEXO 3, se observan los cromatogramas en los distintos tiempos de reacción.

5 CAPITULO V

DISCUSIÓN

Curva de crecimiento de la levadura *P. pastoris*

La curva de crecimiento de la levadura *Pichia pastoris* se obtuvo en 4 días, hasta llegar a la fase estacionaria, logrando identificar cada una de las fases como se describe en la tabla 17 utilizando una prueba de Tukey para la comparación de la media de 12 repeticiones en cada uno de los intervalos de tiempo. Se identificó 4 grupos diferenciados clasificando como la fase de latencia con una pendiente cero, la fase exponencial y la fase estacionaria. Además Doran en 1998 recalca que existe la fase de aceleración que es el paso entre la fase de latencia y la fase de crecimiento o exponencial, y la fase de desaceleración que es el paso a la fase estacionaria. Siendo a las 24 h y 57 h como se indica en la figura 10. Jahic y sus colaboradores en el 2002 mencionan que los delimitantes para el aumento celular en un cultivo por lotes son la temperatura de crecimiento y la velocidad de alimentación, sin embargo este último parámetro depende de la capacidad de transferencia de oxígeno del reactor. Esta consideración afirma que el periodo de crecimiento de la levadura *P. pastoris* puede acortarse tomando en cuenta la temperatura óptima de la levadura y la agitación para la difusión de oxígeno al medio de cultivo. Estos experimentos deben repetirse utilizando un fermentador con condiciones controladas y con aplicación de O₂

Identificación y Actividad enzimática de la FTF producida durante el crecimiento.

En la reacción enzimática de la FTF utilizando sacarosa como sustrato, se obtiene la presencia de azúcares reductores: Glucosa y Fructosa. Estos monosacáridos por su capacidad reductora pueden ser identificados por el reactivo DNS que tiene la capacidad de cambiar de coloración de amarillo a rojo ladrillo según aumente la concentración de azúcares reductores, esta coloración es medida a 546 nm (Bello et al., 2006). Con la curva de calibración obtenida a concentraciones conocidas de glucosa, se obtiene la concentración de azúcares reductores presentes en el sirope como productos de la

reacción, y a partir de estos valores, consiguientemente se obtiene la actividad enzimática.

Maiorano y otros en el 2008 reportan diferentes actividades enzimáticas para la fructosiltransferasa dependiendo del organismo productor, siendo los hongos los de mayor actividad con 600 U/ml frente a la actividad en plantas de que obtienen alrededor de 46 U/ml. Sin embargo en la obtención de la actividad enzimática extracelular obtenida del medio de cultivo de *Pichia pastoris* al cuarto día es de 79.12 U/ml. La expresión de proteínas heterólogas en microorganismos aumenta durante el crecimiento llegando a las etapas más altas de producción en las fases exponencial y estacionaria del crecimiento (Heinzle et al., 2006). Este resultado sin dudas ofrece ventajas desde el punto de vista del establecimiento de un bioproceso si se toma en cuenta la facilidad de crecimiento y rendimiento de *P.pastoris* en comparación con hongos o plantas.

Identificación de la producción y pureza de la enzima utilizando SDS-PAGE

Olvera y sus colaboradores en 2007 mencionan que la FTF de plantas contienen pesos moleculares de aproximadamente 70 KDa debido a la presencia de dos dominios: un dominio catalítico tipo β -propela y un segundo denominado β -sandwich. Realizando la electroforesis vertical con un gel de poliacrilamida al 12.5 % (p/v) se obtiene las banda alrededor de 64 y 80 KDa con respecto marcador de proteínas SeeBLue Plus2 Prestained, logrando identificar la presencia de la enzima FTF de interés. Además se encontró que la muestra recuperada del medio de cultivo presenta una banda de más concentrada como se indica en la figura 13. El fácil manejo de *P. pastoris* para la producción de proteínas heterólogas permite obtener resultados tres veces mayores en la producción de la proteína de interés. Además tomando las mejores condiciones en crecimiento del mutante de levadura esta producción puede aumentar hasta 15 veces de forma extracelular (Viader & Guerrero, 2011).

Análisis cualitativo de fructanos con cromatografía de capa fina (TLC)

Los productos de reacción con el biocatalizador analizados mediante cromatografía en capa fina confirmo la presencia de tres diferentes azúcares de distinto

tamaño, según Mellado y López en el 2013 el análisis de carbohidratos en TLC presentan que los monosacáridos van a recorrer mayor distancia debido a su menor peso, posteriormente aparecerán los disacáridos, así sucesivamente mientras las moléculas son de mayor tamaño. Obteniendo Factores de retardo (Fr) 0.6 de glucosa y fructosa, 0.55 de sacarosa y 0.44 de kestosa. Comparando factor de retardo obtenido 0.469 de la tercera mancha de la figura 19 confirma la presencia del trisacárido.

Inmovilización de *Pichia pastoris*

En comparación de los tratamientos y la capacidad de obtención de FOS se obtiene que los tratamientos L3A1 y L2A2 obtuvieron mejores resultados frente a los demás tratamientos y siendo próximos al control positivo. El material de soporte juega un rol importante en la actividad enzimática, el tamaño del poro formado causa limitación en la difusión de sustratos, además las consideraciones de agitación deben ser prioritarias en el proceso (Miletić et al., 2012).

Según Contesini y otros en el 2013, concluyeron que la utilización de células inmovilizadas para la producción de FOS permite un rápido escalamiento. Además el biocatalizador formado no pierde actividad en 20 ciclos continuos de reacción, estos resultados se verificarán en próximos trabajos de tesis. Los tratamientos utilizados con los parámetros establecidos se vieron influenciados por la concentración del polímero según ANOVA realizado en la producción, sin verse afectado por la cantidad de células inmovilizadas, mostrando estabilidad en los periodos de reacción.

La concentración de sacarosa puede influir en la cantidad de producción de la enzima, siendo las concentraciones menores del 30% p/v que se establezcan como fuente de carbono que estimularía el metabolismo de crecimiento, sin embargo a mayor concentración de sustrato se obtiene mayor producción enzimática (Maiorano et al., 2008).

Las reacciones realizadas con el biocatalizador dan como producto una mezcla de azúcares, siendo la 1-Kestosa el de mayor interés de industrial pero al estar con demás azúcares no se puede obtener un valor real comercial. Lu y sus colaboradores (2013),

recalcan que el rendimiento de la producción de FOS aumenta con la purificación que puede ser realizada en base otro proceso de inmovilización por donde el sirope debe pasar, observando la disminución en la cantidad de azúcares simples de la mezcla.

Determinación de los parámetros para el análisis cromatográficos

Se empleó en este estudio una columna de sodio, que es una columna de intercambio iónico, diseñada para la separación de azúcares en el jarabe del maíz, y ácidos orgánicos (ANEXO 1). Esta columna necesitó como fase móvil agua 100%, con detector de índice de refracción acoplado al equipo uHPLC. Diseñándose la fase móvil de forma isocrática. Foitzich et al. (2013), menciona que en la implementación de una metodología de HPLC para la separación de azúcares, la fase móvil dependerá de las características de la columna, además de ser completamente isocrático debido que no se puede hacer eluciones en la corrida.

Establecido la fase móvil, se determinó el flujo de corrida. Ureña y sus colaboradores en el 2007 proponen un flujo 1.3 a 1.5 ml/min de la Norma Chilena para el análisis de carbohidratos. Sin embargo con el fin de tener una separación de picos y comparando con los parámetros del fabricante de la columna comprobamos flujos que no sobrepasen los 500 psi con una temperatura de la columna de 85 °C. Obteniendo un flujo 0.28 ml/min por 37 min de tiempo de corrida como se muestra en la figura 17.

La identificación de picos se realizó con el método de estándar externo glucosa, fructosa y sacarosa. Observándose los tiempos de retención según su tamaño. Mellado y López (2013), señalan que dependiendo de la naturaleza de la columna los picos de los monosacáridos aparecen en tiempos de retención mayores, comparando con los estándares utilizados se encuentra que el primer pico obtenido es de kestosa debido a su mayor peso.

6 CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- Se determina las fases de crecimiento de la levadura *Pichia pastoris* a 180 rpm para difusión de oxígeno y temperatura ambiente, obteniendo una actividad específica enzimática extracelular 79.12 ± 0.321 U/ml a los 4 días del cultivo en medio YPG.-La enzima extracelular obtenida del sobrenadante del medio de cultivo presenta un peso de 70 KDa utilizando SDS-PAGE al 12.5%. Estableciendo la certeza de la presencia de la enzima de interés para la formación de fructooligosacáridos de interés industrial.
- Las condiciones de operación establecidas son adecuadas para la producción de FOS a nivel de laboratorio utilizando células de levaduras inmovilizadas en alginato de calcio. Permitiendo obtener con el mejor tratamiento una actividad enzimática promedio de 34 U/g de perla. -Se determina la presencia de fructooligosacáridos de cadena corta por medio de cromatografía en capa fina, obteniendo un factor de retardo de 0.469 utilizando las condiciones establecidas como fase móvil y revelador de placas para azúcares.
- Se identifica y cuantifica los productos obtenidos de la reacción de *Pichia pastoris* inmovilizada en alginato de calcio utilizando sacarosa como fuente de carbono mediante las condiciones establecidas en el equipo HPLC acoplado al detector de índice de refracción.
- El mejor tratamiento para la inmovilización con alginato de calcio en la producción de FOS son los tratamientos L3A1 y L2A2 obteniendo un rendimiento teórico de $Y_{PS}=0.019$ g*g⁻¹ a los 15 minutos, además el tamaño del poro representa la capacidad de soporte y de saturación del biopolímero. Teniendo como técnica implementada a nivel industrial mejor manejo de microorganismo, rapidez y de bajo costo.

7 CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

- Obtener las fases de crecimiento de *Pichia pastoris* a temperatura 30 °C para mayor producción en menor tiempo. Realizar el cultivo en un fermentador bajo condiciones controladas de pH, temperatura y oxígeno disuelto para acortar el tiempo de crecimiento.
- Realizar reacciones continuas con el biocatalizador para establecer tiempo de vida útil, estabilidad y comportamiento durante la producción de fructooligosacáridos.
- Evaluar el efecto de otras técnicas de inmovilización en la producción de fructooligosacáridos.
- Realizar lotes de mayor tamaño para la observación del comportamiento de la reacción con el fin de proceder a un escalamiento en biorreactores.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera-Olivera, & Maugeri. (2011). Thermal stability of the immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 363-372.
- Al-Sheraji, Ismail, Manap, Mustafa, Yusof, & Hassan. (2013). Prebiotic as functional foods: A review. *Journal of Funvntional Food*, 1542-1553.
- Avendaño-Romero, López-Malo, & Palou. (2013). Propiedades de alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de ingenieria de alimentos 7*, 87-96.
- Bello G., Carrera E., Díaz Y., (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, Mayo-Agosto, 45-50.
- Bornet F., Brouns F., Tashiro Y., Duvillier V. (2002) Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digest Liver Dis* (2); 111-120
- Butel MJ, Catala I, Waligora Dupriet AJ, Taper H, Tessedre AC, Duraó J y Szylił O (2002a) Protective effect of dietary oligofructose against cecitis induced by clostridia in gnotobiotic quails. *Microbial Ecology in Health and Disease* 13 (3): 166-172
- Butel MJ, Waligora Dupriet, AJ y Szylił O (2002b) Oligofructose and experimental model of neonatal necrotizing enterocolitis. *British Journal of Nutrition* 87 (2): S213-S219
- Calselato, Freitas, & Sgarbieri. (2011). The importance of prebiotic in funtional food and clinical practice. *Food and Nutrition Sciences*, 133-144.

- Chamon, R., & Divies, C. (2001). IMMOBILISED CELL TECHNOLOGY IN WINERY AND FRUIT WINE. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, 413–421.
- Cherbut C (2002) Inulin and oligofructose in the dietary fiber concept. *British Journal of Nutrition* 87 (2): S159-S162
- Contesini FJ, de Alencar Figueira J, Kawaguti HY, et al. Potential Applications of Carbohydrases Immobilization in the Food Industry. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(1):1335-1369. doi:10.3390/ijms14011335.
- Cregg, J., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 23-52.
- Darwen CWE y John P (1989) Localisation of the enzymes of fructan metabolism in vacuoles isolated by a mechanical method from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiology* 89: 658-663
- Datta, S., Christena, L., & Rajaram, Y. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*, 1-9.
- Darby, R. A., Cartwright, S. P., Dilworth, M. V., & Bill, R. M. (2012). Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris* (review). *Recombinant Protein Production in Yeast: Methods and Protocols*, 11-23.
- De la Cagigas, A., & Blanco, J. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista cubana de nutrición*.
- Domínguez Á, Fermiñán E, Sánchez M, González FJ, Pérez-Campo FM, García S, Herrero AB, San Vicente A, Cabello J, Prado M, Iglesias FJ, Choupinal A, Burguillo FJ, Fernández-Lago1 L y López MC (1998) Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiology* 1 (2): 131–142

- Dominguez , A. L., Rodrigues, L. R., Lima, N. M., & Texeira, J. A. (2013). An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Application. *Food Bioprocess Technol*, 324-337.
- Doran P., (1998). Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial Academic Press Limited.
- El Universo (2015). Crece la incidencia de cáncer de colon; es quinto en Guayaquil; Disponible en: <http://www.eluniverso.com/noticias/2015/11/01/nota/5215826/sales-carnes-procesadas-pueden-generar-cancerigenos>; recuperado 20 de julio de 2016.
- Fajardo, R., Osuna, J., Villa Velásquez, C., Escalante, P., & Ibarra, V. (2011). inmovilización de células y enzimas. *Universidad Autónoma de Coahuila*, 42-56.
- Foitzich A. (2013). Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC- IR. Repositorio Universidad Austral de Chile. Recuperado 08 de diciembre 2016.
- Ford, A. C., Quigley, E. M., Lacy, B. E., Lembo, A. J., Saito, Y. A., Schiller, L. R., ... & Moayyedi, P. (2014). Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*, 109(10), 1547-1561.
- García M., (2012). Microbiología y Parasitología, Disponible en: <http://gruponfermeriaunpa.blogspot.com/2012/05/formas-de-crecimiento-bacteriano.html>. Recuperado 16 de febrero de 2017
- Guzmán et al. (2013). *Determinación de azúcares reductores - Método DNS*. Colombia: Fundación Universidad de América.
- Jahic, M., Rotticci-Mulder, J., Martinelle, M., Hult, K., & Enfors, S. O. (2002). Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(6), 385-393.

- Heinzle E., Biber A., Cooney Ch. Development of sustainable bioprocesses, modeling and assessment. Ed John Wiley & Sons, Ltd (2006).
- Lüscher M y Nelson CJ (1995) Fructosyltransferase activities in the leaf growth zone of tall fescue. *Plant Physiology* 107 (4): 1419–1425
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M., McNeil, B., & Harvey, L. (2005). Heterologous protein production using the Pichia. *Yeast*, 249-270.
- Maiorano, A. E., Piccoli, R. M., Sabino da Silva, E., & de Andrade, M. F. (2008). Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnol Lett*, 1867–1877.
- Marquina D y Santos A (2003) Probióticos, prebióticos y salud. *Revista Actualidad* 32: 24-27.
- Martins, S. C. S., Martins, C. M., Fiúza, L. M. C. G., & Santaella, S. T. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12(28).
- Mellado E., Lopez M., (2013). ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE JARABE DE AGAVE AZUL (*Agave tequilana* Weber var. azul) Y OTROS JARABES NATURALES. *Agrociencia* 47: 233-244.
- Miletić, N., Nastasović, A., & Loos, K. (2012). Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*, 115, 126-135.
- Mora, Calderón, & Contreras. (2002). Colon cancer: epidemiology, clinic, diagnosis and treatment. *Medicina*, 91-94.
- Mohammadi, R., & Mortazavian, A. M. (2011). Review article: technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. *Food Reviews International*, 27(2), 192-212.

- Mutanda, T., Mokoena, M., Olaniran, A., Wilhelmi, B., & Whiteley, C. (2014). Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. *Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*.
- Olivera , C., Castillo , E., & López, A. (2005). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa.
- Ooi, L. G., & Liong, M. T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International journal of molecular sciences*, 11(6), 2499-2522.
- Patel , S., & Goyal, A. (2012). The current trends and future perspectives of prebiotic research. *Springer*, 11.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., y Klein, D. A. Microbiología. 7ª edición. McGraw-Hill Interamericana, 2009
- Potvin, G., Ahmad, A., & Zhang, Z. (2012). Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochemical Engineering Journal*, 64, 91-105.
- Ringo, E., Olsen, RE, Gifstad, T. S., Dalmo, RA, Amlund, H., HEMRE, GI, y Bakke, AM (2010). Prebiotics in aquaculture: a review. *Acuicultura Nutrición* , 16 (2), 117-136
- Roberfroid M (2000) Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition* 71(Suppl): 1682-1687
- Roberfroid M (2001) Prebiotics: preferential substrates for specific germs. *American Journal of Clinical Nutrition* 65 (5): 405-408
- Roberfroid M., e. a. (2010). *Prebiotic effects: metabolic and health benefits. British journal of Nutrition*.

- Ruiz P., Olvera C., López A., (Junio de 2011). ESPECIFICIDAD DE FRUCTOSILTRANSFERASAS QUIMÉRICAS. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Congreso llevado a cabo en Queretaro, México.
- Sarmiento , V., Vargas, D., Pedroza, A., Matiz, A., & Poutou, R. (2003). *Producción de alfa-amilasa con células libres e inmovilizadas de Thermus sp. MVZ-Córdoba*, 310-317.
- Sangeetha, PT, Ramesh, MN, y Prapulla, SG (2005). Las tendencias recientes en la producción microbiana, análisis y aplicación de fructooligosacáridos. *Tendencias en la Ciencia y Tecnología de los Alimentos* , 16 (10), 442-457
- Scragg A. Biotecnología para ingenieros Sistemas biológicos en procesos tecnológicos, LIMUSA, Noriega Editor (2002).
- Shodex. (enero de 2015). *Análisis de alimentos con columnas Shodex*. Obtenido de <http://shodexhplc.com/wp-content/uploads/2015/01/C.T.-3-Analisis-de-Alimentos-con-Columns-Shodex.pdf>.
- Suzuki N, Aiba Y, Takeda H, Fukumori Y y Koga Y (2006) Superiority of 1-kestose, the Smallest Fructo-oligosaccharide, to a Synthetic Mixture of Fructo-oligosaccharides in the Selective Stimulating Activity on Bifidobacteria. *Bioscience and Microflora* 25(3): 109-116.
- Tapia N., Cabrejos J., Rojas N., Torres F., Reyes I., (2009). Preparación de perlas de alginato de calcio con propiedades magnéticas y su aplicación en la adsorción de Cu (II). *Per. Quim. Ing*, 12, 29-33.
- Trujillo Toledo, L., Gómez Riera, R., Banguela Castillo, A., Soto Romero, M., Arrieta Sosa, J., y Hernández García, L. (2004). Propiedades catalíticas de diazotrophicus Gluconacetobacter N-glicosilada levansucrasa producidos en la levadura. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (2). Consultado el 5 de diciembre de 2016, los

de <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v7n2-4/514>

Ureña, M.; Varela, E.; Arrieta D.; Umaña, E.; Zamora, L.; Arias, M. (2007). Evaluación de las posibles adulteraciones en miel de abeja comerciales de origen costarricense al compararlas con mieles artesanales provenientes de apiarios específicos. Archivos latinoamericanos de nutrición 57(12007). 68.

Viader J., Guerrero M. (Junio de 2011). BIOTECNOLOGÍA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON *PICHIA PASTORIS*. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Congreso llevado a cabo en Queretaro, México.

Yábar C., (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Disponib <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>

