



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE COMPUESTOS PREBIÓTICOS

Trabajo Fin de Máster Universitario en
Ciencia e Ingeniería de los Alimentos

ALUMNO/A: ADRIÁN GARCÍA SIRERA

TUTOR/A ACADEMICO: ISABEL HERNANDO HERNANDO

DIRECTOR EXPERIMENTAL: JULIO POLAINA MOLINA

Curso Académico: 2015/2016

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2016

Índice

1-Introducción	3
1.1-Probióticos, prebióticos y simbióticos	3
1.1.1-Probióticos.....	3
1.1.2-Prebióticos	3
1.1.3-Simbióticos	3
1.2-Microorganismos utilizados en el estudio	4
1.2.1-Bifidobacterium.....	4
1.2.2-Lactobacillus	4
1.2.3-Escherichia Coli Nissle.....	4
1.2.3-Saccharomyces Cerevisiae Boulardii	5
1.3-Fructooligosacáridos y 6-kestosa.....	5
2-Materiales y métodos	6
2.1-Purificación mediante HPLC.....	6
2.2-Purificación mediante <i>Escherichia Coli Nissle</i>	8
2.3-Utilización de la 6-Kestosa como compuesto prebiótico.....	8
2.4-Medios de cultivo	9
2.4.1-MRS (sólido y líquido).....	9
2.4.2-MRS basal	9
2.5-Protocolo <i>Bifidobacterium</i>	9
2.6-Protocolo <i>Lactobacillus</i>	10
2.7-Protocolo <i>Saccharomyces Boulardii</i>	12
3-Resultados	13
3.1-Purificación de 6-Kestosa mediante HPLC	13
3.2-Purificación de 6-Kestosa mediante <i>Escherichia Coli Nissle</i>	13
3.3-Resultado <i>Bifidobacterium</i>	14
3.1-Resultados <i>Lactobacillus</i>	18
2.6-Resultados <i>Saccharomyces Boulardii</i>	19
4-Conclusiones	20
5-Bibliografía	21

PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA DE COMPUESTOS PREBIÓTICOS

Adrián García Sirera, Julio Polaina Molina, Isabel Hernando Hernando

RESUMEN

Los ensayos que se llevarán a cabo durante la realización de este trabajo tienen como objetivo por un lado, la purificación del fructooligosacárido denominado 6-Kestosa, y una vez conseguida, la comprobación de su efecto prebiótico. En lo referido a la purificación, ésta se realizará mediante cromatografía HPLC utilizando una columna específica de oligosacáridos, obteniendo mediante esta técnica resultados positivos y altos niveles de pureza. A su vez también se tratará de purificar de forma microbiológica mediante *E.coli Nissle*, obteniendo en este caso resultados negativos pues no se pudo aislar la 6-kestosa. En cuanto a su aplicación como prebiótico, se utilizará para el crecimiento de diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ambas aceptadas como microorganismos probióticos. Los resultados positivos se obtuvieron con las cepas de *Bifidobacterium* ensayadas. Finalmente se iniciará el proceso de optimización para poder comprobar la utilización de la 6-Kestosa en el crecimiento de *Saccharomyces Boulardii*.

PALABRAS CLAVE: 6-Kestosa, prebiótico, probiótico, cromatografía.

ABSTRACT

The tests that will be carried out in this work are intended on the one hand, to purify the fructooligosaccharide 6-kestose, and on the other hand to check their prebiotic effect. In reference to the purification, it will be performed by means of HPLC chromatography using a specific oligosaccharides column, obtaining positives results and high purity levels. At the same time, it will be purified by microbiological means using *E.coli Nissle*, obtaining in this case negative results because it couldn't be isolated the 6-Kestose. As regards its application like a probiotic, it will be used for growth different strains of *Lactobacillus* y *Bifidobacteriu*, both accepted as probiotic microorganisms. Positive results were obtained only with *Bifidobacterium* strains assayed. Finally the process of optimization will be carried out to check the utilization of 6-Kestose in growth of *Saccharomyces Boulardii*.

KEY WORDS: 6-Kestose, prebiotic, probiotic, chromatography

RESUM

Els assajos que es duran a terme durant la realització d'aquest treball tenen com a objectiu d'una banda, la purificació del fructooligosacárido denominat 6-Kestosa, i una vegada aconseguida, la comprovació del seu efecte prebiòtic. En allò que s'ha referit a la purificació, esta es realitzarà per mitjà de cromatografia HPLC utilitzant una columna específica d'oligosacàrids, obtenint

per mitjà d'esta tècnica resultats positius i alts nivells de puresa. Al seu torn també es tractarà de purificar de forma microbiològica per mitjà d'E.coli Nissle, obtenint en este cas resultats negatius perquè no es va poder aïllar la 6-kestosa. Quant a la seua aplicació com prebiòtic, s'utilitzarà per al creixement de diferents ceps de Lactobacillus i Bifidobacterium ambdós acceptades com a microorganismes probiòtics. Els resultats positius es van obtenir amb els ceps de Bifidobacterium assajades. Finalment s'iniciarà el procés d'optimització per a poder comprovar la utilització de la 6-Kestosa en el creixement de Saccharomyces Boulardii.

PARAULES CLAU: 6-Kestosa, prebiòtic, probiòtic, cromatografia

1-INTRODUCCIÓN

1.1-Probióticos, prebióticos y simbióticos

1.1.1-PROBIÓTICOS

El término probiótico hace referencia a microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren al hospedador un efecto beneficioso a nivel de salud, estimulando el desarrollo de la flora microbiana en el intestino de forma beneficiosa y estimulando las funciones protectoras del sistema digestivo (De las Cagigas Reig and Blanco Anesto, n.d.)

Entre los microorganismos utilizados y aceptados actualmente como probióticos se encuentran las bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* los cuales pueden encontrarse en alimentos tales como yogures, batidos lácteos y queso.

1.1.2-PREBIÓTICOS

Al hablar de prebióticos, se hace referencia a ingredientes no digeribles que causan efectos beneficiosos sobre el organismo que los consume mediante el efecto que generan en la microbiota intestinal del huésped, es decir, dichos prebióticos sólo podrán ser metabolizados por determinados microorganismos y por tanto se puede favorecer un crecimiento selectivo de aquellos microorganismos causantes de efectos beneficiosos sobre la salud humana. Entre los principales requisitos que debe tener un prebiótico se debe destacar el hecho de que deben ser capaces de resistir la digestión ácida del estómago, la acción de las enzimas digestivas y la absorción en el tracto digestivo superior. Entre muchos de estos prebióticos se encuentran la inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y la lactulosa. (De las Cagigas Reig and Blanco Anesto, n.d.)

1.1.3-SIMBIÓTICOS

Se trata de una mezcla de probióticos y prebióticos destinada a aumentar la supervivencia de las bacterias que promueven la salud, con el fin de modificar la flora intestinal y su metabolismo, así como obteniendo en muchas ocasiones

un efecto sinérgico que el de ambos por separado (Rodríguez Gómez, 2006). Como ejemplo de este tipo de alimentos se puede encontrar la leche materna, que contiene mezclas de fructooligosacáridos además de constituir una fuente de bacterias lácticas (Brunser T, 2013). De esta forma será la microflora materna la que colonizará el colon del bebé impidiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

1.2-Microorganismos utilizados en el estudio

1.2.1-BIFIDOBACTERIUM

Se trata de bacterias Gram positivas, anaerobias, no formadoras de esporas y con morfología de bífido (Y) que son residentes normales del tracto gastrointestinal humano, en el cual aparecen pocos días después del nacimiento (Martínez Álvarez, 2003). En cuanto a sus propiedades probióticas, a este género bacteriano se le atribuye una importante función en lo referido al mantenimiento del equilibrio del ecosistema intestinal, limitando el crecimiento de organismos patógenos. Esta función está relacionada con la producción de sustancias antimicrobianas, competición por los sitios de adhesión e inmunomodulación

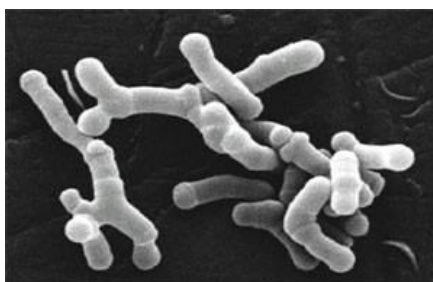


FIGURA 1. Imagen de Bifidobacterias

1.2.2-LACTOBACILLUS

Los Lactobacillus son bacterias ácido-lácticas y Gram positivas. Son microorganismos anaerobios facultativos capaces de tolerar bajos niveles de oxígeno y muy utilizados a nivel industrial para la realización de fermentaciones. Actúan ejerciendo efectos beneficiosos a nivel terapéutico como por ejemplo su actuación frente a la inflamación intestinal, reducción de procesos de diarrea, disminución de los niveles de colesterol, etc... (Microbewiki.kenyon.edu, 2016), debido a la producción de sustancias bacteriostáticas y bactericidas (Rondón et al., 2008)

1.2.3- ESCHERICHIA COLI NISSLE

Escherichia coli es una enterobacteria Gram negativa que habita el tracto gastrointestinal humano y que está relacionada con procesos de diarrea e infecciones urinarias. En este trabajo se realizarán los ensayos en concreto utilizando la cepa E.coli Nissle descubierta por el profesor alemán Alfred Nissle

durante la primera guerra mundial debido a su acción antagónica frente a enterobacterias y que se trata de un microorganismo aceptado como GRAS (generalmente conocido como seguro) (Midtvedt, 2009). Se trata de una cepa no patogénica debido a la no producción de factores de adhesión patogénica y a que no produce citotoxinas y enterotoxinas.

1.2.4-SACCHAROMYCES BOLUARDII

Se trata de una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada ampliamente como probiótico frente a trastornos del tracto gastrointestinal como diferentes tipos de diarrea. Este efecto es ejercido gracias a mecanismos de unión y neutralización de patógenos o sus toxinas y la inducción de secreción de IgAs. Actualmente es la única cepa de *Saccharomyces Cerevisiae* autorizada para su uso en seres humano (Palma et al., 2015).

1.3-Fructooligosacáridos y 6-kestosa

Los fructooligosacáridos (FOS) son carbohidratos no digeribles por los seres humanos, compuestos por glucosa y fructosa, y que son metabolizados por los microorganismos de la microflora intestinal.

La 6-kestosa es un fructooligosacárido generado mediante una acción combinada de hidrólisis de sacarosa, liberando un residuo de glucosa, y transfructosilación, uniendo el residuo de fructosa restante a una sacarosa, de manera que se genera un trisacárido de dos residuos de fructosa y uno de glucosa y que variará en función de la unión que tienen estos monosacáridos entre sí. La 6-kestosa se obtiene cuando el enlace establecido entre los dos residuos de fructosa es del tipo β 2-6.

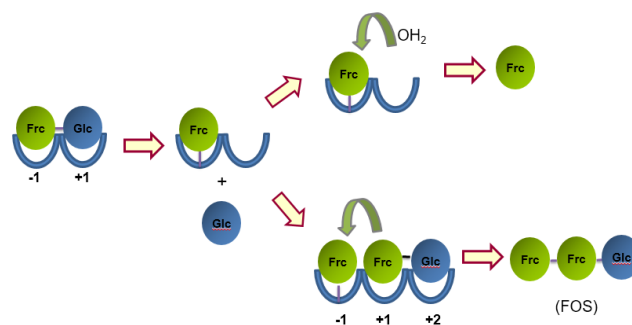


FIGURA 2. Esquema de la generación de FOS a partir de Sacarosa

Gracias a la ingeniería genética, se ha diseñado una invertasa de *Sacharomyces cerevisiae*, introducida en un plásmido y expresada en *E.coli*, en la que se ha aumentado su actividad transfructosilante, que además permite la obtención extracelular de una gran proporción de 6-kestosa en comparación con el resto de fructooligosacáridos generados por el microorganismo (Lafraya

et al., 2011). Dado que la producción se produce de forma extracelular, mediante centrifugación pudo aislarse los oligosacáridos de las estructuras celulares. La principal ventaja de este método desarrollado en el laboratorio de Julio Polaina Molina del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos es que todo se produce en un único recipiente y mediante un proceso continuo. En los costes de fabricación de productos en los que se utilizan enzimas su purificación es uno de los pasos más costosos es por ello que esta nueva técnica da lugar a un proceso que facilita muchísimo su escalado industrial reduciendo los costes (Marín-Navarro, Talens-Perales and Polaina, 2014).

Como ventajas, además de ser un proceso seguro, inocuo y medioambientalmente limpio, consigue la obtención de FOS a un precio muy inferior al de su actual valor de mercado utilizando bio-herramientas calificadas como de grado alimentario.

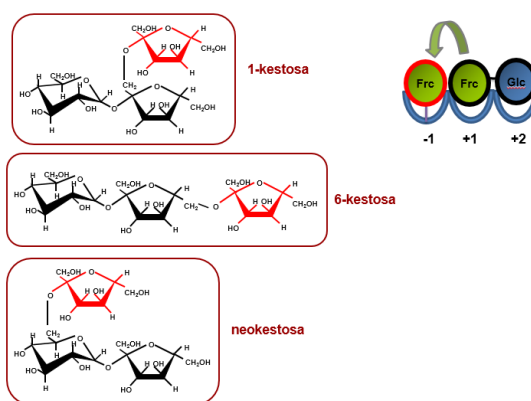


FIGURA 3. Estructura química de la 6-Kestosa y de las variedades de FOS que se generan en función de los enlaces químicos establecidos.

2-MATERIALES Y MÉTODOS

2.1-Purificación mediante HPLC

El primer paso para comenzar los ensayos es tratar de purificar la 6-kestosa en cantidad y pureza suficiente para poder realizar los estudios necesarios para comprobar su posible aplicación como prebiótico. Con el objetivo de conseguir esta purificación se recurre a realizar una cromatografía en HPLC en la que la detección se realiza por índice de refracción y en el que la columna es específica para la separación de azúcares. Se parte de una mezcla de FOS en los cuales están presentes la 6-kestosa, la 1-kestosa, sacarosa, glucosa y fructosa. Partiendo de los datos cromatográficos (tiempos de elución) de muestras purificadas anteriormente de cada uno de estos compuestos en el cromatógrafo HPLC Dionex (imposibilidad de utilización de este equipo para purificar ya que su método de detección, intercambio iónico, es parcialmente

destruccion con las muestras) se recogieron las diferentes fracciones de nuestra muestra.

Partiendo de la muestra de FOS inicial, se realizó una dilución 1/20 para poderla introducir en el HPLC, debido a la alta concentración en azúcares de la muestra inicial. El paso por la columna se realizó con dos muestras, pasando 1 ml (mililitro) cada vez (este es el volumen que admite el loop del cromatógrafo). Previamente a la introducción de la muestra en el HPLC se realiza una centrifugación utilizando tubos concentradores, cuya función es eliminar posibles restos de material genético residuales de los microorganismos modificados genéticamente a partir de los cuales se obtuvo la mezcla de FOS.



FIGURA 4. Tubo concentrador

Se recogieron 10 fracciones de cada una de las muestras introducidas en el HPLC, siendo las fracciones correspondientes a la 6-kestosa aquellas cuyos tiempos de elución se encuentran entre el minuto 7 y el 10 (el tiempo total de elución de todas las fracciones correspondientes a la muestra oscila entre los 20 y 25 minutos). Puesto que el equipo permite ver en una pantalla la salida de los picos puede recogerse específicamente aquellos únicamente de interés. Cada fracción de 6-Kestosa se dividió en la parte de subida del pico y la parte de bajada del mismo, esto es debido a que la parte de bajada puede quedar solapada con el siguiente pico que pasa por el cromatógrafo y por tanto causaría una pérdida de pureza.

Las fracciones correspondientes a glucosa, fructosa, sacarosa y 6-kestosa se analizaron en el cromatógrafo Dionex comparando con la muestra inicial que contenía todos los FOS, de modo que pueda comprobarse la existencia de únicamente un compuesto si las fracciones del HPLC han sido obtenidas de forma correcta.

La muestra de FOS original en la cual aún no se había realizado la separación de los distintos oligosacáridos se encuentra diluida a su paso por el Dionex del orden de 1/4000, con el objetivo de que las fracciones separadas en el HPLC se encuentren en un mismo rango de dilución y puesto que tras su paso por el HPLC se encuentran diluidas en torno a 1/100, se realizan diluciones 1/40 de estas fracciones (tubos 6 y 7 correspondientes a la 6-kestosa junto con los tubos de la sacarosa, glucosa y fructosa) cogiendo 0,025 μ l (microlitros) de estas y añadiendo 975 μ l de agua destilada que posteriormente son filtradas.

Junto con las muestras, es necesario pasar un patrón de glucosa 0,5 mM (milimolar) que se realizó partiendo de un stock 20 mM para poder asegurar la sensibilidad del equipo.

2.2-Purificación mediante *Esccherichia Coli* Nissle

Partiendo de colonias aisladas, se inoculó una de estas colonias en 5 ml de medio LB manteniendo dicho cultivo a 37°C durante 24 horas. Tras este primer paso se pasan estos 5 ml del cultivo crecido a un volumen mayor de LB, en este caso 100 ml, repitiendo de nuevo el proceso de mantenerse 24 horas a 37°C.

El contenido se dividió en 4 tubos de centrífuga y se realizaron dos lavados con Buffer salino, juntando tras acabar el segundo lavado el contenido en 2 tubos de centrífuga. Tras este segundo lavado se pasó el contenido a un matraz completando el volumen hasta 100 ml con Buffer salino y se mantuvo durante una noche a 37°C.

Los 100 ml se dividieron en 20 ml y 80 ml, se realizó una centrifugación y se eliminaron los sobrenadantes. Se añadieron 2 ml de una mezcla diluida 1/10 de los FOS iniciales con Buffer salino al pellet de los 20 mililitros (quedando por tanto una muestra 10x) y 2 ml de esta misma composición al pellet de los 80 ml (40x). Se tomaron muestras de los sobrenadantes de ambas diluciones a la hora, 4 horas y 16 horas. Tras ello se realizó una detección cromatográfica para determinar si se ha conseguido aislar la 6-kestosa.

2.3-Utilización de la 6-kestosa como compuesto prebiótico

Con el objetivo de determinar la posible aplicación de la 6-kestosa purificada como prebiótico, van a realizarse cultivos de *Lactobacillus* (17 especies y 39 cepas en colección) y *Bifidobacterium* (8 especies y 9 cepas en colección) siguiendo un protocolo de crecimiento en el que tras su crecimiento en el medio MRS se pasarán a un medio MRS basal que carece de fuente de carbono, esto favorece la posible utilización de oligosacáridos como la 6-kestosa por parte de los microorganismos cuando se pasen a un medio en presencia de esta como fuente de carbono.

Las Bifidobacterias se tratan de microorganismos fuertemente anaerobios por lo que para su crecimiento se utilizarán jarras de anaerobiosis en las que se depositarán los cultivos y crecerán a 37°C.

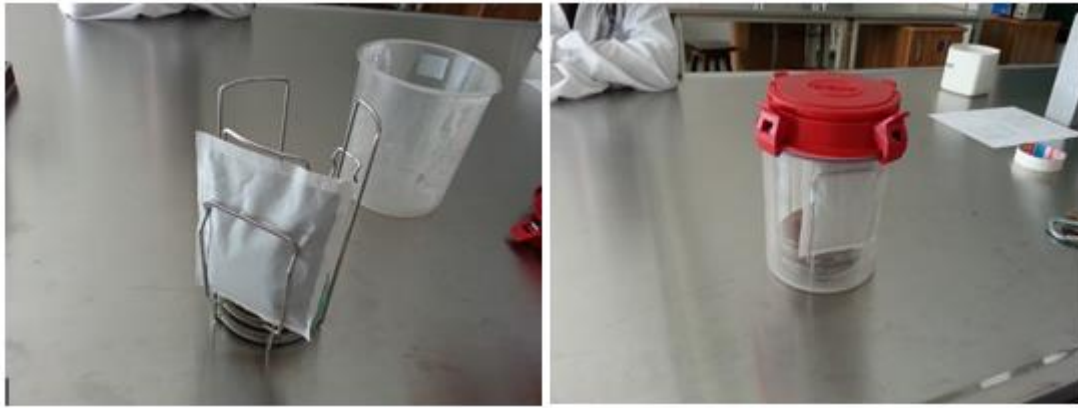


FIGURA 5.Jarras de anaerobiosis para el crecimiento de las Bifidobacterias

2.4-Medios de cultivo.

2.4.1-MEDIO MRS (SÓLIDO Y LÍQUIDO)

Con el objetivo de cultivar en placas las cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* utilizadas para determinar su crecimiento en presencia de 6-Kestosa se preparó medio MRS sólido cuyos componentes son medio MRS comercial y Agar (únicamente para la realización del medio sólido) así como la cantidad de agua estéril necesaria para alcanzar el volumen deseado. La mezcla se llevó al autoclave (permite la esterilización por aplicación de altas presiones y temperaturas) y tras ello se plaquearon las placas Petri que fueron inoculadas e introducidas en jarras de anaerobiosis (solo en *Bifidobacterium*) durante 48 horas. Una vez las colonias bacterianas han crecido se procede a la preparación de MRS líquido, cuya única diferencia es la ausencia de Agar y que no puede mantenerse durante tiempos prolongados en conservación.

En el caso de los cultivos de *Bifidobacterium*, los medios están suplementados con un 0,1% de L-cisteína.

2.4.2-MEDIO MRS BASAL (LÍQUIDO)

La diferencia respecto al medio MRS es que este medio carece de fuente de carbono y por tanto no es un medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos, pero sin embargo, facilita por parte de los mismos el consumo posterior de oligosacáridos. La composición de este medio se basa en un conjunto de cuatro sales que se adicionan posteriormente al autoclavado de una mezcla de extracto de levadura, peptona y Tween 80 al 10%. Esto se debe a que estas sales precipitan con la temperatura. Las sales adicionadas son acetato sódico, citrato tri-amonio, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso (todas ellas al 10%). Únicamente se utiliza en su forma líquida.

2.5-Protocolo Bifidobacterias.

En primer lugar se adiciona un inóculo de colonias aisladas y se mantiene a 37°C overnight en 12 ml de MRS (líquido) que contiene un 0,1% de L-cisteína (anaerobiosis).

Tras ello se pasan 100 µl de inóculo a 12 ml de MRS basal suplementados con un 0,1% de L-cisteína. Se carece de fuente de carbono y se mantiene overnight a 37°C (anaerobiosis)

Finalmente se centrifugan las muestras y se resuspenden en aproximadamente 1 ml del mismo medio de cultivo. La absorbancia se mide a 550 nm (nanómetros) y se ajusta para determinar el volumen necesario de esta muestra inicial con el objetivo de que al final el valor de absorbancia sea de 0,1 en un volumen final de 250 µl. Se realizan triplicados tanto con 6-kestosa, como con controles negativos (sin fuente de carbono) y positivos (con glucosa).

-125 µl de MRS basal (2x) + inóculo sin azúcar

-125 µl de MRS basal (2x) + inóculo + Glucosa 7,5 mM

-125 µl de MRS basal (2x) + inóculo + 6-kestosa 7,5 mM

Las cepas de *Bifidobacterium* utilizadas fueron tres, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum* y *Bifidobacterium gallicum*.

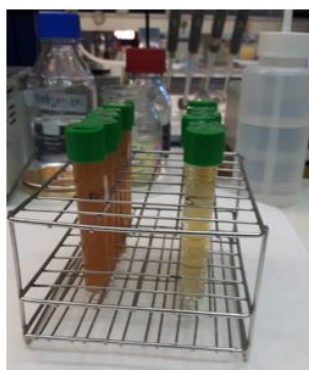


FIGURA 6. Comparación del medio MRS (parte izquierda) y medio MRS basal (parte derecha)

Los cultivos finales de 250 µl permanecen a 37°C durante 48 horas momento tras el cual se procede a realizar una medida de pH, pues el crecimiento de Bifidobacterias estará directamente relacionado con una bajada de pH en comparación con el control negativo debido a la liberación de ácidos durante su crecimiento y en caso de resultados positivos, se procede a aislar el sobrenadante y a su paso por el cromatógrafo Dionex para determinar qué FOS permanecen en el medio y asegurar que se ha metabolizado la 6-kestosa.

2.7-Protocolo Lactobacillus.

A continuación se muestra una tabla con las especies de *Lactobacillus* utilizadas para el ensayo de crecimiento con utilización de la 6-kestosa.

TABLA 1. Cepas de *Lactobacillus* utilizadas para los ensayos con la 6-kestosa

Espece	Cepa
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BL1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BL8
<i>Lactobacillus curvatus</i>	BL14
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	BL17
<i>Lactobacillus casei</i>	BL23
<i>Lactobacillus delbruckii</i> <i>subsp.bulgaricus</i>	BL33
<i>Lactobacillus pentosus</i>	BL35
<i>Lactobacillus zeae</i>	BL95
<i>Lactobacillus farciminis</i>	BL156
<i>Lactobacillus salivaricus</i>	BL158

En primer lugar se transfiere un inóculo de colonias aisladas y se mantiene a 37°C overnight en 12 ml de MRS líquido (anaerobiosis).

Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se pasan 100 µl de inóculo a 12 ml de MRS basal, sin fuente de carbono, overnight a 37°C (anaerobiosis).

Para finalizar se centrifugan las muestras y se resuspenden en aproximadamente 1 ml del mismo medio de cultivo. La absorbancia se mide a 550 nm y se ajusta para determinar el volumen inicial que se necesita con la finalidad de que la absorbancia sea de 0,1 en un volumen final de 100 µl.

-50 µl de MRS basal (2x) + inóculo sin azúcar

-50 µl de MRS basal (2x) + inóculo + Glucosa 7,5 mM

-50 µl de MRS basal (2x) + inóculo + 6-kestosa 7,5 mM

Las disoluciones se disponen en una placa de 84 pocillos y se depositan en el PolarStar, aparato que permite visualizar las curvas de crecimiento de los microorganismos en función de la OD, la cual es medida tras agitaciones realizadas por el propio aparato durante 20 segundos. Se realiza la medida de la OD cada 30 minutos. Para asegurar una correcta medida los pocillos externos se rellenan con 100 µl de H₂O, depositando a su vez un blanco constituido por MRS basal (2x) y H₂O.



FIGURA 7. Pocillos para el crecimiento de los *Lactobacillus* en medio con 6-kestosa, Glucosa o Agua.

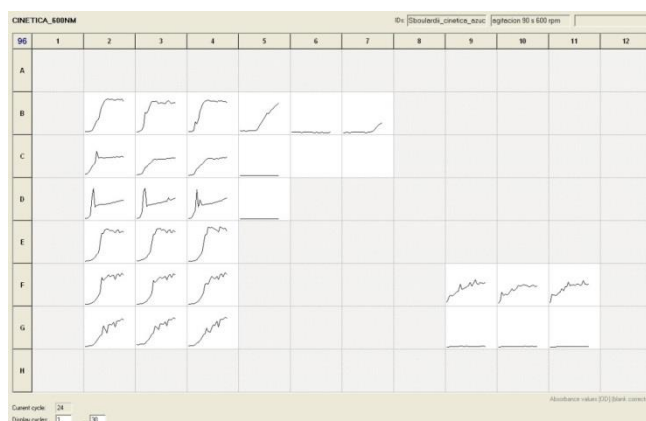


FIGURA 8. Ejemplo de curvas de crecimiento obtenidas en el PolarStar.

2.4- Protocolo *Sacharomyces cerevisiae boulardii*

El objetivo será comenzar la optimización de los parámetros de crecimiento de la levadura, tanto en lo referido a las condiciones de temperatura, como en las del medio de crecimiento. Para ello se realizaron dos tipos de medios de cultivo líquidos, YPD y SD y en cada uno se inocularon una colonia de levadura. Se realizaron por duplicado y los medios se mantuvieron a 30°C y 37°C para poder comprobar que condiciones son las óptimas para el crecimiento del microorganismo.

A su vez también se comprobará como afecta el volumen de cultivo al crecimiento, ya que el objetivo es utilizar el mínimo medio de cultivo posible en el momento en el que se adicione la 6-kestosa, debido a la dificultad de obtención de la misma. Para ello, previamente a usar la 6-kestosa se realizan controles de crecimiento usando glucosa, fructosa y sacarosa al 2% en diferentes volúmenes. Se realizó un crecimiento en matraz (5 ml) con cada azúcar, además de un crecimiento en placa multipocillo (cada pocillo tiene un volumen de 100 µl) y se compararon las medidas de absorbancia a 600 nm tanto en espectrofotómetro, donde la mínima cantidad de medio necesaria para medir es de 800 µl, como en el PolarStar, equipo que permite tanto realizar medidas de absorbancia puntuales utilizando una mínima cantidad de medio, como realizar curvas de crecimiento en continuo, para lo cual se utilizan las placas multipocillos, donde el volumen usado es de 100 µl. En este último caso

se midieron tanto cultivos que crecían en estos pocillos, como muestras de los matraces que se sacaban a diferentes horas y se disponían en estos pocillos. El objetivo es poder determinar si existen discrepancias en las medidas obtenidas y si sería posible realizar medidas de un cultivo en continuo utilizando el PolarStar para este tipo de microorganismos.

Una vez establecidos los parámetros óptimos de crecimiento se realizarán cultivos de 300 µl del medio más adecuado en el que el azúcar añadido será fructosa, glucosa, sacarosa y 6-kestosa, todos ellos adicionados al 2% y en los que el inóculo se añade para que su absorbancia en el volumen final sea de 0,1 a 600 nm

3-RESULTADOS

3.1- Purificación de la 6-kestosa mediante HPLC

Tras pasar todas las muestras por la columna cromatográfica del Dionex, se pudo determinar que las fracciones de 6-kestosa seleccionadas del HPLC además de haber sido aisladas del resto de azúcares contenían aproximadamente un 99% de pureza del compuesto específico de cada fracción.

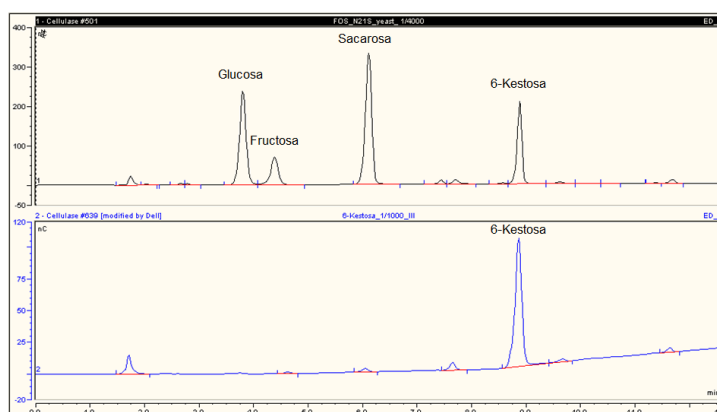


FIGURA 9. Resultados de la purificación de la 6-kestosa mediante HPLC.

3.2- Purificación de 6-Kestosa mediante E.coli Nissle

Se analizaron cromatográficamente los sobrenadantes obtenidos tanto del matraz de células de concentración 10x como del de 40x a las horas establecidas previamente. Este análisis demuestra que el microorganismo es incapaz de purificar la 6-kestosa, ya que existe presencia de sacarosa en proporción similar a la 6-kestosa. En el caso de glucosa y fructosa el microorganismo sí es capaz de consumirlas y utilizarlas para su crecimiento por lo que aunque no se consigue obtener únicamente 6-kestosa, sí es posible reducir la cantidad de azúcares presentes en nuestra mezcla de FOS.

En lo referido a la cantidad de células utilizadas, en el caso de la muestra 40x los resultados de eliminación de glucosa y fructosa se alcanzan a las 4 horas mientras que para obtener esos mismos resultados en la muestra 10x hubo que esperar a las 16 horas. Por tanto es posible realizar esta disminución de azúcares o bien en menor tiempo aunque con mayor cantidad de células, o bien en un tiempo más prolongado pero con menor cantidad de microorganismo.

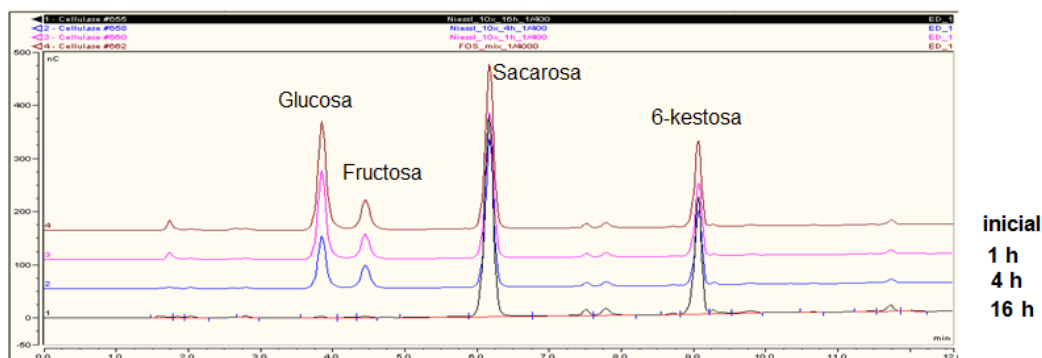


FIGURA 10. Resultados de la purificación de 6-kestosa con E.coli Nissle 10x

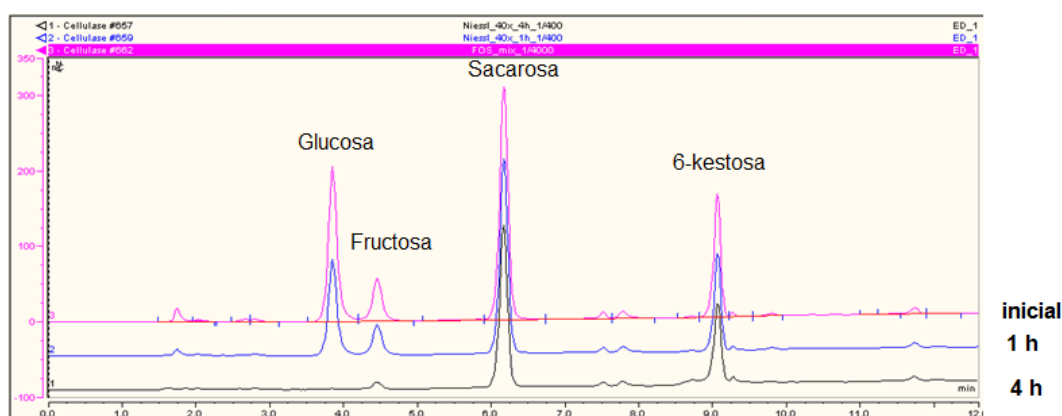


FIGURA 11. Resultados de la purificación de 6-kestosa con E.coli Nissle 40x

3.2-Resultados Bifidobacterium

TABLA 2. Absorbancia de las diluciones de las cepas de Bifidobacterias

Espécie	Cepa	Absorbancia 550 nm
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	BL333	0,196
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	BL335	0,473
<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	BL336	0,196

Para poder realizar las medidas de absorbancia y que el espectrofotómetro no se saturara, fue necesario realizar una dilución, en este caso de 2,5. El

hecho de que la dilución se haya realizado a 2,5 se debe a que en el caso de diluciones mayores, los valores de absorbancia serían demasiado bajos y contendrían mayor error por parte del espectrofotómetro. Puesto que conocemos el valor de dilución, se puede extrapolar el valor de absorbancia obtenido al que hay en el cultivo inicial (recordar que el nuevo cultivo debe realizarse con un volumen del cultivo previo que presente una OD de 0,1 en el volumen final requerido)

TABLA 3. Absorbancia del cultivo inicial.

Espécie	Cepa	Absorbancia 550 nm (Cultivo inicial)
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	BL333	0,980
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	BL335	1,183
<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	BL336	0,490

Puesto que se conoce la absorbancia de partida y la absorbancia que se requiere para inicial el cultivo (0,1) junto con el volumen final (250µl) es posible determinar la cantidad de cultivo y de H₂O que se necesita de cada uno de los cultivos.

TABLA 4. Volumen requerido de cada cultivo para determinar el uso prebiótico de la 6-Kestosa

Espécie	Cepa	Volumen (µl)
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	BL333	25,51
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	BL335	21,13
<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	BL336	51,02

La 6-kestosa fue concentrada mediante una centrífuga SpeedVAC (permite la aplicación de temperaturas elevadas) pasando de un volumen inicial de 17,55 ml 3,10 mM (obtenido tras su purificación mediante HPLC) a un volumen de 0,714 ml 65 mM, determinado nuevamente mediante su paso por el Dionex. En el caso de la segunda purificación de 6-kestosa que se realizó, la concentración inicial obtenida era de 4,25 mM, siendo por tanto necesario una concentración del orden de 15 veces con la finalidad de alcanzar una concentración suficientemente elevada. Las condiciones de temperatura del SpeedVac es de 60°C.



FIGURA 12. SpeedVAC

La composición de los medios y las cantidades de cada uno de los componentes (a falta del microorganismo) utilizados son los siguientes:

TABLA 5. Composición de los medios de crecimiento bacteriano

Componentes	Medio A	Medio B	Medio C
MRS Basal 2x +Cys	125 µl	125 µl	125 µl
Azúcar	30 µl de 6-Kestos (65 mM)	30 µl de Glucosa 65 mM	-
H₂O	-	-	30 µl

Se preparan 3 Stock, uno por cada medio, determinando los volúmenes totales, ya que cada medio se utilizará para 3 cepas y por triplicado (a excepción de la 6-Kestosa que debido a su difícil obtención se hará por duplicado). El hecho de realizar Stock de composiciones iguales se debe a que facilita pipetear los componentes pues no se debe cambiar constantemente de volumen evitando por tanto errores.



FIGURA 13. Medición de pH

TABLA 6. PH obtenido de cada una de las especies en cada medio de cultivo.

CEPA	pH					
	MEDIO CON 6-KESTOSA	6-	MEDIO CON GLUCOSA	CON	MEDIO SIN AZÚCAR	
BL333	5,47		5,87		6,91	
	5,47		6,14		7,02	
	-		6,12		7,05	
BL335	5,54		5,53		6,29	
	6,32		5,81		6,86	
	-		5,55		6,74	
BL336	5,47		6,13		6,72	
	5,60		6,02		6,95	
	-		6,12		6,73	

El pH ácido, como consecuencia de la actividad metabólica de las Bifidobacterias indica el crecimiento de las mismas y por tanto que son capaces de utilizar como fuente de carbono la 6-kestosa. Para poder comprobar dicha afirmación se realiza una centrifugación para obtener el sobrenadante, el cual se hace pasar a través del cromatógrafo Dionex. Los picos obtenidos en el gráfico se comparan con una muestra de 6-kestosa purificada. Los resultados indican que tanto *Bifidobacterium angulatum* como *Bifidobacterium gallicum*

son capaces de utilizar toda la 6-kestosa para su crecimiento pues en ambos casos la cantidad de 6-kestosa residual es del 0%.

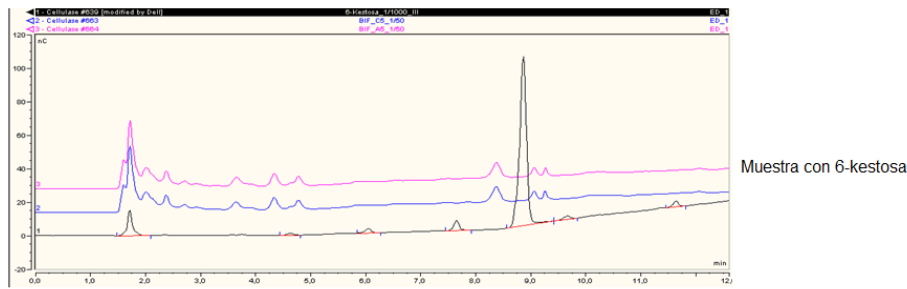


FIGURA 14. Comparación de los sobrenadantes tras su paso por cromatografía HPLC del cultivo de *Bifidobacterium angultaum* en presencia de 6-kestosa, en presencia de Glucosa y ambas comparadas con un patrón de 6-kestosa purificada previamente.

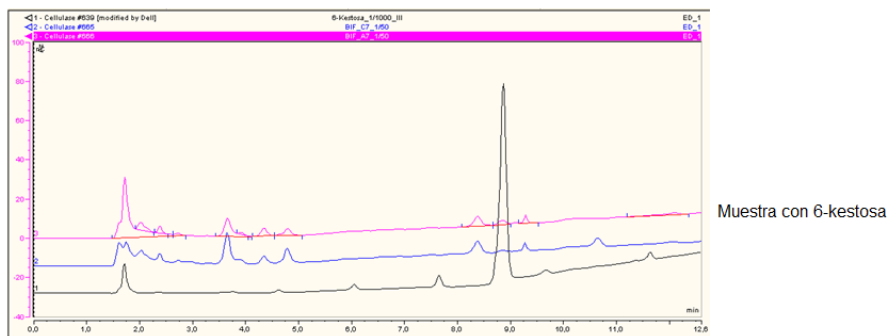


FIGURA 15. Comparación de los sobrenadantes tras su paso por cromatografía HPLC del cultivo de *Bifidobacterium gallicum* en presencia de 6-kestosa, en presencia de Glucosa y ambas comparadas con un patrón de 6-kestosa purificada previamente.

Sin embargo *Bifidobacterium adolescentis* no es capaz de metabolizar en su totalidad la 6-kestosa presente en el medio, quedando tras su crecimiento aproximadamente un 20% de la 6-kestosa inicialmente presente.

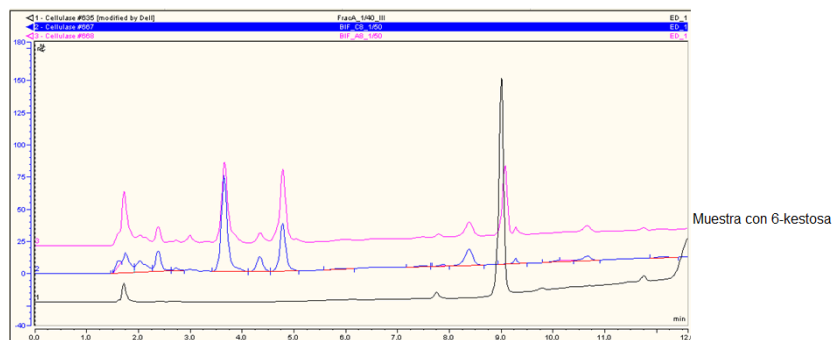


FIGURA 16. Comparación de los sobrenadantes tras su paso por cromatografía HPLC del cultivo de *Bifidobacterium adolescentis* en presencia de 6-kestosa, en presencia de Glucosa y ambas comparadas con un patrón de 6-kestosa purificada previamente.

3.3-Resultados *Lactobacillus*

Tras el crecimiento en MRS basal se procede a medir la absorbancia de las cepas con el objetivo de poder ajustarla a 0,1 en un volumen final de 100 μ l. Con la finalidad de no sobrepasar el límite del espectrofotómetro y en función de la turbidez obtenida en los cultivos se realizaron diluciones que variaban entre las cepas para que los valores de absorbancia a 550 nm se encontraran dentro del rango de medición del espectrofotómetro.

TABLA 7. Absorbancias de las especies de *Lactobacillus* tras su crecimiento en MRS basal.

Cepa	Dilución	Absorbancia a 550 nm
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1/10	0,187
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1/10	0,163
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1/2	0,210
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1/5	0,330
<i>Lactobacillus casei</i>	1/10	0,445
<i>Lactobacillus delbruckii.susp bulgaricus</i>	1/2	0,209

Utilizando el factor de dilución, se puede determinar el volumen necesario de cada cepa para ajustar la absorbancia a 0,1 en el cultivo final. Al igual que con los *Bifidobacterium* se realizan pruebas con la 6-kestosa (7,5 mM), Glucosa (7,5 mM) y control negativo utilizando H₂O. Los resultados de las medidas de OD durante 24h muestran que no existe crecimiento en las cepas tanto en los ensayos en los que se le adicionaba la 6-kestosa, como en los controles negativos, en comparación con el control positivo, la glucosa, en las cuales se observa un crecimiento muy superior.

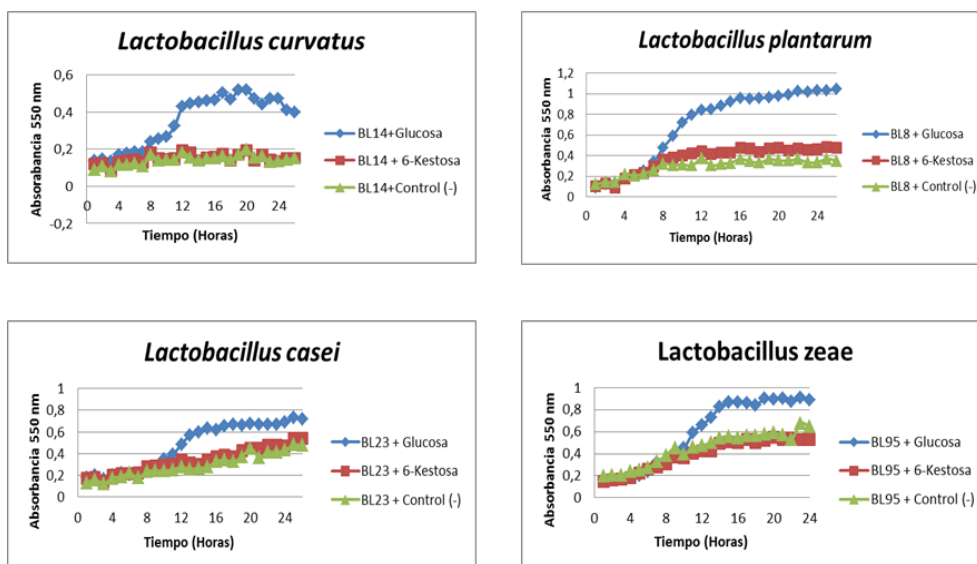


FIGURA 17. Resultados de la curva de crecimiento de diferentes especies de *Lactobacillus* utilizando en el medio de crecimiento Glucosa, 6-kestosa y un control negativo que carece de azúcar. En todos los casos existe una clara diferencia en el crecimiento cuando en el medio hay presencia de Glucosa.

3.4- Resultados *Saccharomyces Cerevisiae* Boulardii

Los resultados indicaron que el medio que permite el mayor crecimiento es YPD y la temperatura de 37 °C, por lo cual el inicio del proceso de optimización de basó en este medio y esta condición de temperatura. Utilizando diferentes azúcares y cultivando durante 24 horas a 30°C en agitación, se procede a medir la absorbancia a 600 nm de las cepas de *Saccharomyces* en medio YP con un azúcar en concreto a diferente hora (el término D hace referencia al azúcar del medio), se utilizó por un lado glucosa, por otra fructosa y finalmente sacarosa, todas adicionadas en cada caso al 2%. Se realizaron medidas tanto en placa (PolarStar), usando volúmenes de 100 µl, comparando los valores cuando el cultivo crece directamente en estas placas como si crece en matraz y se extraen 100 µl de cultivo para adicionarlos a la placa. También se realizaron medidas en el espectrofotómetro para determinar equivalencias. Puesto que el PolarStar tiene un nivel de saturación mayor que el espectrofotómetro, no se realizaron diluciones para obtener sus medidas.

TABLA 8. Valores de absorbancia obtenidos tanto en el PolarStar como en el Espectrofotómetro a las 5 horas en función del origen de la muestra

Absorbancia (600 nm). 5 horas del inicio del cultivo							
Matraz	Espectrofotómetro	Glucosa		Fructosa		Sacarosa	
		Dilución 1/2	Cultivo inicial	Dilución 1/2	Cultivo Inicial	Dilución 1/2	Cultivo Inicial
		0,445	0,89	0,388	0,776	0,408	0,816
Matraz	PolarStar	1,075		0,698		0,720	
		1,061		0,777		0,777	
Cultivo en multipocillo	PolarStar	Alteración de las medidas debido a la presencia de condensación en la tapa y la sedimentación celular.					

TABLA 9. Valores de absorbancia obtenidos tanto en el PolarStar como en el Espectrofotómetro a las 7,5 horas en función del origen de la muestra

Absorbancia (600 nm). 7,5 horas del inicio del cultivo							
Matraz	Espectrofotómetro	Glucosa		Fructosa		Sacarosa	
		Dilución 1/4	Cultivo inicial	Dilución 1/4	Cultivo Inicial	Dilución 1/4	Cultivo Inicial
		0,613	2,452	0,535	2,140	0,692	5,506
Matraz	PolarStar	2,669		2,253		2,370	
		2,699		2,280		2,433	
Cultivo en multipocillo	PolarStar	Alteración de las medidas debido a la presencia de condensación en la tapa y la sedimentación celular.					

TABLA 10. Valores de absorbancia obtenidos tanto en el PolarStar como en el Espectrofotómetro a las 10 horas en función del origen de la muestra

Absorbancia (600 nm). 10 horas del inicio del cultivo							
Matraz	Espectrofotómetro	Glucosa		Fructosa		Sacarosa	
		Dilución 1/8	Cultivo inicial	Dilución 1/8	Cultivo Inicial	Dilución 1/8	Cultivo Inicial
		0,728	5,832	0,621	4,968	0,692	5,506
PolarStar		4,178		3,683		3,954	
Cultivo en multipocillo	PolarStar	Alteración de las medidas debido a la presencia de condensación en la tapa y la sedimentación celular.					

Existe equivalencia de datos hasta la medida de Absorbancia de las 7,5 horas, sin embargo, a partir de esa medida se produce una saturación del PolarStar lo cual impediría poder realizar medidas utilizando un mínimo de volumen. Los datos obtenidos de los crecimientos en continuo indican alteraciones debidas probablemente a la sedimentación celular. Debido a ello el siguiente objetivo del laboratorio será realizar una nueva prueba en la que se probará medio SD además del YPD con diferente concentración de azúcar (2%, 1% y 0,5%). El objetivo será tratar de obtener cultivos que no alcancen la saturación y permitan hacer las medidas de crecimiento en continuo para así poder pasar a realizar pruebas con la 6-kestosa.

4-CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos en los ensayos realizados se puede concluir que la cromatografía HPLC utilizando una columna específica de oligosacáridos permite purificar con éxito la 6-kestosa, resultado que no se obtuvo al tratar de realizar una purificación microbiológica con E.coli Nissle, la cual fue incapaz de eliminar la Sacarosa presente en el medio. En cuanto a su aplicación como compuesto prebiótico, los resultados permiten concluir que las Bifidobacterias son microorganismos capaces de utilizar dicho compuesto para su crecimiento por lo que sí puede ser utilizado como compuesto prebiótico en esta especie (será necesario continuar con un mayor número de cepas). Por otro lado los Lactobacillus son incapaces de metabolizarla y por tanto no puede ser utilizada como prebiótico para estos microorganismos. En ambos casos las previsiones futuras deben centrarse en continuar probando con diferentes cepas. En lo referido a Saccharomyces Boulardii los resultados indican que es necesario reducir la concentración de azúcar para evitar la saturación de los equipos que miden la absorbancia en continuo

5-REFERENCIAS

Brunser T, O. (2013). El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana. *Rev. chil. nutr.*, 40(3), pp.283-289.

De las Cagigas Reig, A. and Blanco Anesto, J. (n.d.). Prebioticos y probioticos, una relacion beneficosa.

Lafraya, A., Sanz-Aparicio, J., Polaina, J. and Marin-Navarro, J. (2011). Fructo-Oligosaccharide Synthesis by Mutant Versions of *Saccharomyces cerevisiae* Invertase. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), pp.6148-6157.

Marín-Navarro, J., Talens-Perales, D. and Polaina, J. (2014). One-pot production of fructooligosaccharides by a *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing an engineered invertase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(6), pp.2549-2555.

Midtvedt, T. (2009). U. Sonnenborn & J. Schulze: The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microb Ecol Health Dis*, 21(3-4), pp.158-158.

Microbewiki.kenyon.edu. (2016). *Bifidobacterium* - MicrobeWiki. [online] Available at: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium>

Microbewiki.kenyon.edu. (2016). *Lactobacillus* - MicrobeWiki. [online] Available at: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus> [Accessed 9 Aug. 2016]

Palma, M., Zamith-Miranda, D., Martins, F., Bozza, F., Nimrichter, L., Montero-Lomeli, M., Marques, E. and Douradinha, B. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement?. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(16), pp.6563-6570.

Rodríguez Gómez, J. (2006). *Microorganismos y salud*. Madrid: Editorial Complutense.

Rondón, A., Samaniego, L., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M., Laurencio, M. and Pérez, M. (2008). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE *Lactobacillus* sp. PROCEDENTES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE POLLOS DE CEBRA ISOLATION, IDENTIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE PROBIOTIC PROPERTIES OF *Lactobacillus* sp. STRAINS OBTAINED FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF BROILERS. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), pp.56-63.

Sepyp.es. (2016). Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. [online] Available at: <http://www.sepyp.es/es/home> [Accessed 9 Aug. 2016].

Vandenplas, Y. (2002). El rol de los agentes bioterapéuticos en el tratamiento de la diarrea. *Medwave*, 2(3).