

Casa abierta al tiempo  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Biotecnología

Estudio de fucosidasas microbianas y su aplicación  
en la síntesis de oligosacáridos

TESIS  
Para obtener el grado de

**Doctor en Biotecnología**

PRESENTA

**M. en B. Yolanda Escamilla Lozano**

Director  
Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Fecha: 09 de Marzo del 2016.



**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana  
está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC), con  
referencia 001466**

**Este estudio fue realizado con el apoyo de la beca de CONACYT número 234678**



México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2016

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Estudio de fucosidasas microbianas y su aplicación en la síntesis de  
oligosacáridos**

que presentó

M. B. Yolanda Escamilla Lozano

Comité Tutorial:

Director: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero.

Asesor: Dr. José Mariano García Garibay.

Asesor: Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Jurado:

Presidente: (Nombre, firma) \_\_\_\_\_.

Secretario (Nombre y firma) \_\_\_\_\_.

Vocal: (Nombre y firma) \_\_\_\_\_.

Vocal: (Nombre y firma) \_\_\_\_\_.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00164

Matrícula: 209381324

ESTUDIO DE FUCOSIDASAS  
MICROBIANAS Y SU APLICACION  
EN LA SINTESIS DE  
OLIGOSACARIDOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 17:30 horas del día 9 del mes de marzo del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY  
DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA CANALES  
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES  
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: YOLANDA ESCAMILLA LOZANO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



YOLANDA ESCAMILLA LOZANO  
ALUMNA

REVISÓ  
*[Signature]*

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

*[Signature]*  
DR. JOSE MARIANO GARCIA GARIBAY

VOCAL

*[Signature]*  
DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA CANALES

VOCAL

*[Signature]*  
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

SECRETARIA

*[Signature]*  
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana que me dio la oportunidad de formarme como profesionista.

Me gustaría agradecer sinceramente a mi directora de tesis, la Dra. Alma Cruz-Guerrero, por su esfuerzo, dedicación y amistad, ya que sus conocimientos, su orientación y su manera de trabajar han motivado mi formación como investigador.

Al Dr. Mariano García-Garibay y al Dr. Agustín López-Munguía Canales por sus enseñanzas, asesorías y sugerencia durante todo mi proyecto.

A la Dra. Gabriela Rodríguez- Serrano a quienes respeto y admiro profundamente por su compromiso en la enseñanza y su excelente calidad humana.

A la Dra. Lorena Gómez-Ruiz por orientarme y brindarme sus conocimientos y sus palabras de apoyo.

A la M. B. María Elena Rodríguez por sus enseñanzas y por su gran apoyo durante mi estancia en el Intituto de Biotecnología, que aportaron mucho a este trabajo.

A mis queridos padres que me inculcaron el camino del estudio y la perseverancia y que me han apoyado y brindado palabras de aliento.

A mis cuatro hermanos de los que he tomado enseñanzas, ya que cada uno tiene cualidades que admiro.

A mis todos mis compañeros y amigos que de la planta piloto 2 ya que gracias a su compañerismo y amistad han hecho más grato mi estancia en el laboratorio sobre todo en los días en que fueron largas las horas de trabajo.

## **Dedicatoria**

Quiero dedicar esta tesis con todo mi cariño a mi compañero de viaje y compañero de vida Alejandro Angel Cuapio quien siempre me ha motivado a trabajar duro y a esforzarme para ser mejor en mi trabajo, él que ha compartido conmigo muchos días difíciles, pero que siempre ha tenido las mejores palabras de aliento y nunca palabras de derroto. Quien ha compartido conmigo también los días más bellos de mi vida como el nacimiento de nuestra amada hija Alisson. A ella también le dedico mis esfuerzos y mis logros ya que llegó a renovarme, ella que es mi inspiración y mi motivación para dar el máximo esfuerzo, mi bebé que cada día me recuerda que siempre hay un reto más por cumplir.

## Resumen

Este es el primer estudio que reporta las síntesis de  $\alpha$ -L-fucosidasa en seis bacterias ácido lácticas, lo que abre un amplio campo de investigación sobre el metabolismo y la asimilación de los oligosacáridos de la leche humana por parte de estos microorganismos. *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB-2772 fueron capaces de producir  $\alpha$ -L-fucosidasa. Las cinéticas de crecimiento y el consumo de carbohidratos indicaron que las seis cepas fueron capaces de metabolizar D-glucosa y D-galactosa como fuente de carbono; pero no asimilaron L-fucosa. Por otro lado, las  $\alpha$ -L-fucosidasas sintetizadas son enzimas asociadas a la célula y se produjeron de manera constitutiva en diferentes fuentes de carbono. La mayor actividad enzimática se observó en *L. rhamnosus* GG (0.16 U/mg). De esta manera, se comprobó que el extracto enzimático obtenido de la fermentación con *L. rhamnosus* GG puede ser utilizado como fuente de enzima en reacciones de transfucosilación para la obtención de fucosil-oligosacáridos. Sin embargo, se sugiere el empleo de métodos de purificación eficientes para retirar la lactasa de este extracto y evitar la formación de galactooligosacáridos.

Adicionalmente, se logró producir la  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. marítima* expresada en *E.coli* BL21. Se demostró que la enzima presenta capacidad de transferasa para la síntesis de fucosil-lactosa. Esto se logró cuando se empleó pNP-F como sustrato donador y lactosa como sustrato aceptor, con un rendimiento máximo de 49 %. Se comprobó que el empleo de lactasa de *A. oryzae* en combinación con la fermentación con *Sacharomyces cerevisiae* representa una alternativa en el proceso de purificación del fucosil-oligosacárido.

## Abstract

The ability of six lactic acid bacteria to produce  $\alpha$ -L-fucosidase is reported here for first time, opening a wide field of investigation related to the metabolism and assimilation of human milk oligosaccharides by lactic acid bacteria.

*Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB-2772 were all able to produce  $\alpha$ -L-fucosidases. Growth kinetics and carbohydrate consumption measurements indicated that the six strains were able to metabolise D-glucose and D-galactose as a carbon source; surprisingly, they did not assimilate L-fucose. However,  $\alpha$ -L-fucosidase was a cell-associated enzyme and produced constitutively in different carbon sources. The highest cell associated  $\alpha$ -L-fucosidase activity was observed in *L. rhamnosus* GG (0.16 U/mg). It was found that the enzyme extract obtained from *L. rhamnosus* GG may be used for synthesize fucosyl-oligosaccharides; however, the use of efficient purification methods for removing lactase in this extract and prevent the formation of galactooligosaccharides is suggested.

Moreover, it was possible to produce recombinant *T. maritime*  $\alpha$ -L-fucosidase expressed in *E. coli* BL21, and demonstrated that the enzyme has the ability to synthesize fucosyl-lactose when pNP-F is used as donor substrate and lactose as acceptor substrate; the highest yield was 49%. It was also found that the use of lactase from *A. oryzae* in combination with fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* is a good alternative as purification process of fucosyl-oligosaccharide.

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>13</b>
2.1 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LA LECHE HUMANA.....	13
2.2 SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA .....	14
2.3 IMPORTANCIA DE LOS OLH .....	15
2.3.1 EFECTO PREBIÓTICO DE LOS OLH.....	17
2.3.2 EFECTO ANTI-INFECCIOSO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LA LECHE HUMANA .....	18
2.3.4 OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE MATERNA Y LA MODIFICACIÓN DEL GLICOMA .....	20
2.3.5. EFECTOS SISTÉMICOS DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE LA LECHE HUMANA .....	21
2.4 FUCOSIDASAS .....	21
2.4.1 FUENTES DE FUCOSIDASAS .....	23
2.4.2 FUCOSIDASAS DE BIFIDOBACTERIAS .....	25
2.4.3 FUCOSIDASAS DE LACTOBACILOS .....	27
2.4.4 FUCOSIDASA DE <i>T. MARÍTIMA</i> .....	27
2.5 USO DE LAS FUCOSIDASAS .....	27
2.6 EMPLEO DE FUCOSIDASA EN LA SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS CON ESTRUCTURA SIMILAR A LOS OLH .....	28
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>5 METODOLOGÍA .....</b>	<b>33</b>
5.1 ESTUDIO DE FUCOSIDASAS DE LACTOBACILOS .....	33
5.1.1 CEPAS DE LACTOBACILOS .....	33
5.1.2 PRUEBA PRELIMINAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS PRODUCTORES DE FUCOSIDASA.....	33
5.1.3 CRECIMIENTO DE LACTOBACILOS CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO .....	33
5.1.4 CONSUMO DE LAS FUENTES DE CARBONO.....	34
5.1.5 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD DE FUCOSIDASA.....	34
5.1.6 LOCALIZACIÓN DE A-L-FUCOSIDASA DE <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG .....	35
5.1.7 LIBERACIÓN DE FUCOSIDASA DE <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG .....	37
5.1.8 SÍNTESIS DE FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS EMPLEANDO A-L- FUCOSIDASA DE <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG .....	38
5.2 ESTUDIO DE FUCOSIDASA DE <i>THERMOTOGA MARÍTIMA</i> RECOMBINANTE .....	38
5.2.1 CLONACIÓN DEL GEN TM306 EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	38
5.2.2 ACTIVACIÓN DE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	38
5.2.3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES .....	38
5.2.4 TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES .....	39
5.2.5 EXPRESIÓN DE LA FUCOSIDASA DE <i>T. MARITIMA</i> EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	40
5.2.6 GEL DE ELECTROFORÉISIS SDS-PAGE.....	40
5.2.7 CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE <i>T. MARÍTIMA</i> RECOMBINANTE.....	41
5.2.8 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD .....	41
5.2.9 SÍNTESIS DE FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS EMPLEANDO A-L- FUCOSIDASA RECOMBINANTE DE <i>T. MARITIMA</i> .....	42
5.2.10 ANÁLISIS DEL OLIGOSACÁRIDO MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA .....	42

<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
6.1	ESTUDIO DE FUCOSIDASAS DE LACTOBACILOS .....	43
6.1.1	PRUEBA PRELIMINAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS PRODUCTORES DE FUCOSIDASA .....	43
6.1.2	CRECIMIENTO DE LACTOBACILOS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO .....	44
6.1.3	CONSUMO DE FUENTES DE CARBONO .....	47
6.1.4	CUANTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD FUCOSIDASA EN LACTOBACILOS .....	49
6.1.5	LOCALIZACIÓN DE A-L-FUCOSIDASA DE <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG. ....	53
6.1.6	LIBERACIÓN DE FUCOSIDASA DE <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG .....	57
6.1.7	SÍNTESIS DE FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS EMPLEANDO A-L- FUCOSIDASA DE <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> GG .....	58
6.2	ESTUDIO DE A-L-FUCOSIDASA DE <i>THERMOTOGA MARÍTIMA</i> RECOMBINANTE .....	59
6.2.1	CLONACIÓN DE FUCOSIDASA DE <i>T. MARÍTIMA</i> EN <i>E. COLI</i> .....	59
6.2.2	EXPRESIÓN DE LA FUCOSIDASA DE <i>T. MARÍTIMA</i> EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> . ....	60
6.2.3	DETERMINACIÓN DE FUCOSIDASA Y LACTASA EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE <i>T. MARITIMA</i> .....	62
6.2.4	SÍNTESIS DE FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS EMPLEANDO A-L- FUCOSIDASA RECOMBINANTE DE <i>T. MARITIMA</i> .....	63
6.2.5	PURIFICACIÓN DEL FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDO.....	66
6.2.6	ANÁLISIS DE FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDO MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA .....	67
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>70</b>
<b>9.</b>	<b>PUBLICACIÓN CIENTÍFICA</b> .....	<b>79</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>86</b>

### *Índice de figuras*

<b>Figura 1:</b>	<i>Ejemplo de la diversidad de estructuras de los OLH</i> .....	14
<b>Figura 2:</b>	<i>Efectos que proporcionan los oligosacáridos de leche humana</i> .....	17
<b>Figura 3:</b>	<i>Efecto prebiótico de los OLH</i> . ....	18
<b>Figura 4:</b>	<i>Efecto anti-infeccioso de los OLH</i> .....	19
<b>Figura 5:</b>	<i>Modificación del glicoma por efecto de los OLH</i> .....	20
<b>Figura 6:</b>	<i>Ruta metabólica de OLH por parte de <i>Bifidobacterium bifidum</i>, <i>B. infantis</i>, <i>B. breve</i> y <i>B. longum</i></i> .....	26
<b>Figura 7:</b>	<i>Mecanismo de acción de la <math>\alpha</math>-L-fucosidasa para la síntesis de oligosacáridos</i> .....	29
<b>Figura 8:</b>	<i>Prueba rápida para la identificación de cepas productoras de fucosidasa</i> .....	43
<b>Figura 9:</b>	<i>Curvas de crecimiento de lactobacilos en diferentes fuentes de carbono</i> .....	46

<b>Figura 10:</b> Fucosidasa extracelular producida en medio con pNP-F por diferentes lactobacilos .....	49
<b>Figura 11:</b> Fucosidasa asociada a la célula producida por lactobacilos .....	51
<b>Figura 12:</b> Fotos tomadas en el microscopio de contraste de fases .....	56
<b>Figura 13:</b> Alineamiento de aminoácidos del gen de la $\alpha$ -L fucosidasa de <i>T. marítima</i> (TM306) y la $\alpha$ -L fucosidasa recombinante .....	60
<b>Figura 14:</b> Células transformadas de <i>E. coli</i> C43 (A) y <i>E. coli</i> BL21 (B).....	60
<b>Figura 15:</b> Geles de electroforesis SDS-PAGE de la fucosidasa de <i>T. marítima</i> expresada en las diferentes cepas de <i>E. coli</i> .....	61
<b>Figura 16:</b> Actividad de fucosidasa en diferentes cepas de expresión de <i>E. coli</i> .....	62
<b>Figura 17:</b> Cinética de reacción de transfucosilación para la síntesis de fucosil-oligosacáridos .....	63
<b>Figura 18:</b> Cromatograma de los productos de la reacción de síntesis de fucosil-oligosacárido, empleando $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de <i>T. marítima</i> .....	63
<b>Figura 19:</b> Productos obtenidos en las reacciones de transfucosilación cuando se emplean diferentes concentraciones de lactosa como sustrato aceptor.....	65

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Acontecimientos y contribuciones más importantes en el estudio de los oligosacáridos de la leche humana.....	16
<b>Tabla 2:</b> Clasificación de las $\alpha$ -L-fucosidasas según la IUBMB.....	22
<b>Tabla 3:</b> Fucosidasas comerciales.....	23
<b>Tabla 4:</b> Fucosidasas purificadas.....	24
<b>Tabla 5:</b> Fucosidasas en bifidobacterias .....	26
<b>Tabla 6:</b> Cepas de lactobacilos que en su genoma codifican posibles fucosidasas.....	27
<b>Tabla 7:</b> Oligosacáridos sintetizados por reacciones de transfucosilación empleando $\alpha$ -L-fucosidasas.....	30

<b>Tabla 8:</b> Condiciones empleadas en los tratamientos para lisis celular de <i>L. rhamnosus</i> GG.	36
<b>Tabla 9:</b> Antibiótico empleado para cada cepa de expresión de <i>E. coli</i> .	39
<b>Tabla 10:</b> Consumo de glucosa, galactosa, fucosa durante el crecimiento de BAL.	48
<b>Tabla 11:</b> Determinación de actividad muramidasa.	54
<b>Tabla 12:</b> Actividad lactasa como medida de la eficiencia de la lisis de la pared celular de <i>L. rhamnosus</i> GG con diferentes tratamientos.	55
<b>Tabla 13:</b> Actividad fucosidasa en las fracciones celulares de <i>L. rhamnosus</i> GG.	56
<b>Tabla 14:</b> Fucosidasa liberada de <i>L. rhamnosus</i> GG.	57
<b>Tabla 15:</b> Concentración y rendimiento de oligosacáridos obtenidos en la reacción de transfucosilación empleando el extracto enzimático de <i>L. rhamnosus</i> GG.	58
<b>Tabla 16:</b> Determinación de actividades enzimáticas empleando diferentes sustratos.	62
<b>Tabla 17:</b> Concentraciones de los carbohidratos durante el proceso de purificación.	67
<b>Tabla 18:</b> Concentraciones de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida del fucosil-oligosacárido purificado.	68

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1:</b> Curvas patrón de carbohidratos	86
<b>Anexo 2:</b> Curva patrón de p-nitrofenol 1	86
<b>Anexo 3:</b> Curva patrón de p-nitrofenol 2	86
<b>Anexo 4:</b> Curva patrón de peso seco de lactobacilos	87
<b>Anexo 5:</b> Curvas patrón de carbohidratos 2	87
<b>Anexo 6:</b> Construcción del vector pET-22b empleado en la clonación de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. marítima</i> ; lleva una secuencia N-terminal de señal pelB para la localización periplásmica	88
<b>Anexo 7:</b> Curva Patrón de 4-nitrofenol 3	89
<b>Anexo 8:</b> Curva patrón de seroalbúmina elaborada por el método de Bradford	89

## 1. INTRODUCCIÓN

En las dos últimas décadas los oligosacáridos de la leche humana (OLH) han sido estudiados por presentar diferentes beneficios a la salud. Estos compuestos ocupan el tercer lugar en concentración en leche humana, después de lípidos y lactosa y su concentración en el fluido mamario es similar a la cantidad de proteínas.

Los OLH han sido reconocidos como prebióticos debido a que en diversas investigaciones se ha demostrado que la incidencia de enfermedades gastrointestinales en niños alimentados con leche materna, es mucho menor que en aquellos, que por alguna razón son privados de este alimento. Adicionalmente, se ha descubierto que pueden actuar como receptores de bacterias patógenas, evitando la adhesión a las células epiteliales y previniendo enfermedades, además de estar involucrados en el desarrollo del sistema inmune.

La búsqueda para crear fórmulas lácteas que puedan imitar los beneficios que otorga la lactancia, ha abierto un amplio campo de estudio. En este sentido, algunas fórmulas lácteas maternizadas han sido suplementadas con galactooligosacáridos y fructooligosacáridos, compuestos que sustituyen o igualan la función de los OLH.

Es evidente que la purificación de OLH de la fuente natural no es una opción. La baja disponibilidad (únicamente en periodo de lactancia), así como las implicaciones sociales y económicas, hacen imposible el uso de OLH para ser adicionados a alimentos para bebés. Es por ello, que el uso de leche de fuentes animales (vaca, cabra, etc.) parecería una mejor opción. Sin embargo, se ha demostrado que la leche de otros mamíferos no presenta la gran variedad y cantidad de oligosacáridos que se encuentra en la leche humana.

Recientemente tanto la industria como los centros de investigación han invertido recursos en buscar alternativas para poder producir compuestos que sean similares a los OLH y han empleado a la Biotecnología como una herramienta útil para conseguir estos objetivos. Un ejemplo de ello, es la producción in vitro de la ruta biosintética que sucede en la glándula mamaria. Sin embargo, los costos de este proceso son una limitante para llevarlo a gran escala. Por otro lado, la síntesis química emplea métodos y reactivos que no son considerados seguros para la salud.

El uso de glicosil-hidrolasas se planteó como una alternativa para resolver los problemas que implican la producción de OLH. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tienen costos menores comparados con las glicosil-transferasas (usadas en la ruta biosintética) y además pueden generar una mayor variedad de compuestos.

En este estudio se buscaron estrategias para establecer una metodología en la síntesis de oligosacáridos similares a los encontrados en la leche humana. Los estudios preliminares en nuestro equipo de trabajo, dieron como resultado la síntesis de un trisacárido (fucosil-lactosa); sin embargo, el agotamiento de la fuente de enzima detuvo esta investigación. Es por ello, que en este proyecto se estudiaron algunas alternativas para contar con una fuente de enzima que no limite el alcance y con estas proponer estrategias de síntesis de oligosacáridos similares a los encontrados en la leche humana.

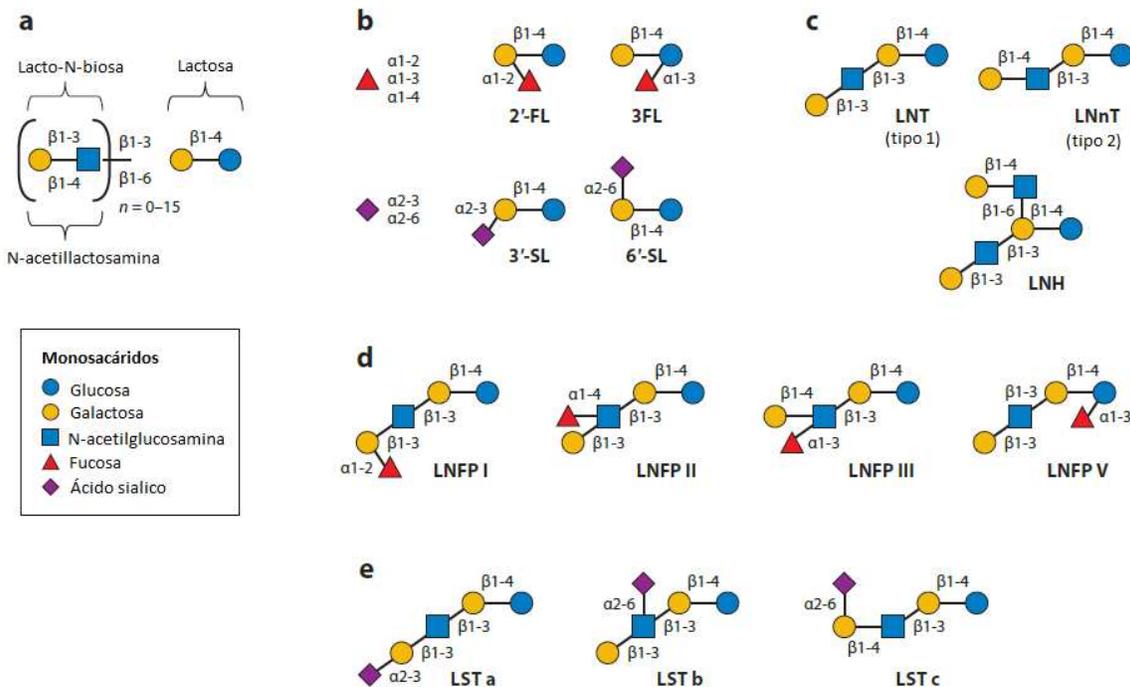
## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estructura y composición de los oligosacáridos de la leche humana

La leche materna es considerada como un “estándar de oro” para la nutrición infantil al proveer nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo; sin embargo, los beneficios que aportan los compuestos presentes en la leche, van más allá de la nutrición básica. Desde hace dos décadas se ha estudiado su efecto prebiótico, pero también existen otros mecanismos propios de estos compuestos que pueden traer beneficios a la salud (Bode, 2009; Bode, 2012).

La leche humana contiene más de 200 oligosacáridos diferentes. Estos constituyen el tercer componente sólido de mayor concentración en la leche (10-20 g/L) después de la lactosa y los lípidos, y tan abundante como las proteínas (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009; Urashima *et al.*, 2009; Background *et al.*, 2013).

Los bloques de construcción de los OLH son cinco monosacáridos (**Figura 1**): D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc) y ácido siálico (Sia) (Kunz *et al.* 2000). La lactosa se encuentra formando el extremo reductor de las estructuras y está unida a lacto-N-biosa o N-acetilactosamina (**Figura 1a**), salvo algunas excepciones como la 2'fucosillactosa. Por otro lado, los “oligosacáridos de cadena corta” (**Figura 1b**) están compuestos por fucosa o ácido siálico unido a lactosa; particularmente la galactosa presente en el disacárido puede estar sialilado en el carbono 3 ó 6, formando enlaces  $\alpha$  (2-3) en el 3'sialillactosa y enlaces  $\alpha$  (2-6) en 6'sialillactosa, y por otro lado, la lactosa puede estar fucosilada formando enlaces  $\alpha$  (1-2) en 2'fucosillactosa o enlaces  $\alpha$  (1-3) en 3'fucosillactosa. Además, la lactosa puede ser elongada adicionando varias moléculas de lacto-N-biosa (tipo1) o N-acetilactosamina (tipo 2); por ejemplo la lacto-N-tetraosa (LNT), lacto-N-neotetraosa (LNnT) y la lacto-N-hexosa (LNH) (**Figura 1c**). La elongación tipo 1 o tipo 2 puede ser fucosilada en diferentes enlaces para formar una gran cantidad de estructuras (**Figura 1d**). La elongación de las estructuras core de los OLH pueden ser sialiladas por enlaces  $\alpha$  (2-3) o (2-6) en la posición terminal formando isómeros (**Figura 1e**) (Bode, 2009; Smilowitz *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Ejemplo de la diversidad de estructuras de los OLH.

2´-fucosillactosa (2´-FL); 3´ fucosillactosa (3FL); 3´ sialillactosa (3´SL); 6´ sialillactosa (6´SL); lacto-N-fucopentosa I, II, III, V (LNFP I, II, III, V); lacto-N-hexaosa (LNH); lacto-N-neotetraosa (LNnT); lacto-N-tetraosa (LNT); sialil-lacto-N-tetraosa a-c (LST a, b, c).

## 2.2 Síntesis de oligosacáridos de leche humana

La síntesis de los OLH ocurre en el aparato de Golgi de las células secretoras de las glándulas mamarias. La  $\alpha$ -lactoalbúmina regula la galactosiltransferasa que cataliza la reacción entre la uridina-5´-difosfato-galactosa y la glucosa para producir lactosa; posteriormente otras transferasas como galactosiltransferasa, N-acetilglucosamiltransferasa, fucosiltransferasa o sialiltransferasas adicionan monosacáridos sobre lactosa para formar los distintos oligosacáridos (Gudiel-Urbano e Isabel Goñi, 2001; Urashima *et al.*, 2011).

La adición de fucosa es dependiente de distintas fucosil-transferasas (FucT). La FucT-2 está determinada por el gen secretor (*Se*). Esta enzima da lugar a oligosacáridos con enlaces  $\alpha$  (1-2) a fucosa; los más importantes son: lacto-N-fuco-pentosa I (antígeno H1) que se forma al actuar la FucT-2 sobre la lacto-N-tetraosa, y la 2´fucosil-lactosa (antígeno H2), que se sintetiza al

actuar la FucT-2 sobre la lactosa. La FucT-2 está presente en el 77% de la población caucásica (Miñana 2007; Albermann *et al.* 2001).

La FucT-3 está controlada por el gen Lewis (*Le*), que da lugar a oligosacáridos con enlaces  $\alpha$  (1-3/4) a fucosa; los más importantes son: lacto-N-fucopentaosa II (antígeno Lewis *a*), que se forma al actuar la FucT-3 sobre la lacto-N-tetraosa; la 3' fucosil-lactosa (antígeno Lewis *x*), sintetizada al actuar la FucT-3 sobre la lactosa y la lacto-N-fucopentaosa III al actuar la FucT-3 sobre la lacto-N-neotetraosa.

Cuando están presentes la FucT-2 y la FucT-3 se pueden formar la lacto-N-difucohexaosa (antígeno Lewis *b*) y lacto-difucosil-tetraosa (antígeno Lewis *y*)(Albermann *et al.*, 2001).

Debido a su complejidad, oligosacáridos con estructuras idénticas a los OLH aún no están disponibles como ingredientes alimenticios (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009). En contraste, la leche de vaca, que es la base de las fórmulas maternizadas, es una fuente pobre en oligosacáridos además éstos son menos complejos y no aportan los mismos beneficios (Bode y Jantscher-krenn, 2012).

### 2.3 Importancia de los OLH

Las primeras investigaciones sobre los OLH se originaron a finales del siglo XIX; pediatras y microbiólogos estudiaron los beneficios de la leche materna en la salud de los lactantes y los químicos caracterizaron los carbohidratos presentes únicamente en la leche humana. A principios del siglo XX, con la colaboración de varias disciplinas los científicos concluyeron que la leche posee un “factor bifidus” al que nombraron "ginolactosa". Más tarde se descubrió que son los oligosacáridos quienes aportan todos los beneficios a la salud y desde entonces se ha buscado aislarlos y caracterizarlos. A la fecha se ha logrado identificar un centenar de oligosacáridos y se han estudiado sus múltiples efectos (Bode, 2012).

En la **Tabla 1** se muestra brevemente los eventos de mayor trascendencia en el estudio de los OLH (Bode, 2012).

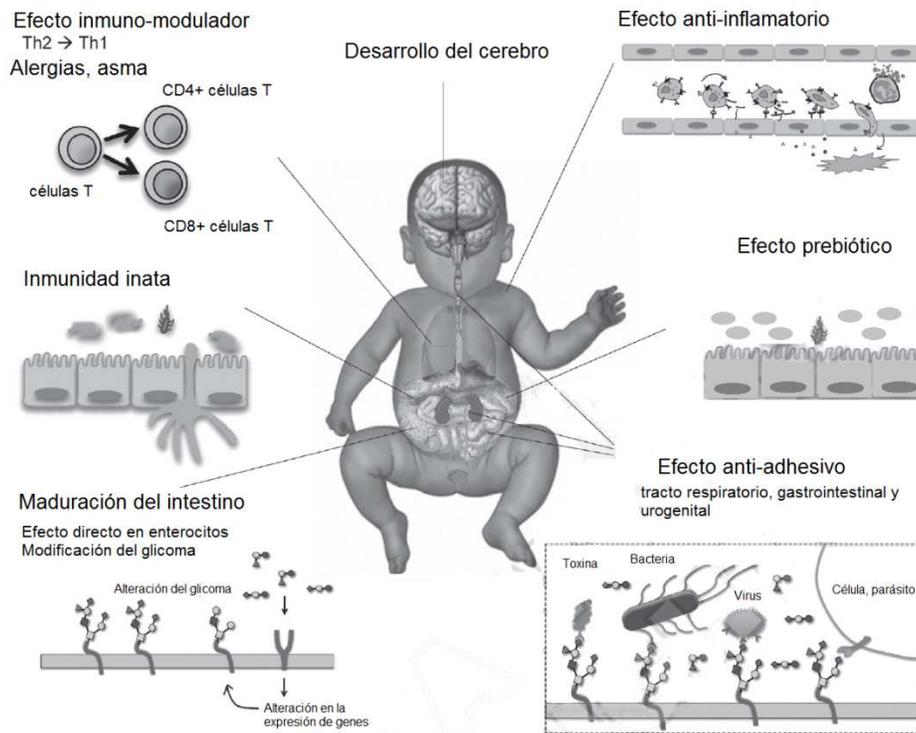
**Tabla 1.** Acontecimientos y contribuciones más importantes en el estudio de los oligosacáridos de la leche humana.

Fecha	Acontecimiento
Finales del Siglo XIX	Alta mortalidad infantil (30%). Los lactantes alimentados con leche materna tenían más probabilidad de sobrevivir que los alimentados con biberón.
1886	Escherich descubrió la relación entre las bacterias intestinales y la digestión en lactantes.
1888	Eschbach señaló que la leche humana contenía una “lactosa” diferente a la encontrada en leche de vaca. Deniges comprobó que la lactosa es la misma pero que la leche humana contenía una fracción adicional de carbohidratos desconocidos.
1900	Moro y Tissier encontraron que la composición bacteriana de las heces depende del tipo de alimentación.
1926	Schönfeld descubrió que una fracción del suero de leche contiene un factor que promueve el crecimiento de <i>Lactobacillus bifidum</i> (posteriormente reclasificado como <i>Bifidobacterium bifidum</i> ).
1930	Polonowski y Lespagnol caracterizaron la fracción de carbohidratos de la leche humana y la llamaron "ginolactosa".
1954	Kuhn y György confirmaron que el "factor bifidus" eran los oligosacáridos.
1956-1960	Montreuil y Richard Kuhn descubrieron y caracterizaron más de una docena de OLH.
1967-1970	Grollman y Ginsburg encontraron que algunos OLH tenían estructuras iguales al antígeno H y grupos Lewis, lo que condujo al desarrollo de nuevas herramientas para caracterizarlos.
1983	Egge empleó espectrofotometría de masas para caracterizar los OLH.
1996-2009	Kunz, Rudloff, Gnoth y Bode estudiaron las propiedades nutricionales y biológicas de los OLH.

Desde los años 90's los científicos se han centrado en estudiar las propiedades nutricionales y biológicas de los OLH. Actualmente, se ha comprobado que los OLH son responsables de efectos benéficos como: promover la colonización saludable en el intestino del neonato, prevenir infecciones y apoyar la maduración del sistema inmune con lo que la madre protege a su bebé de algunos patógenos a los que está expuesto (Bode, 2012).

El efecto prebiótico de estos oligosacáridos probablemente sea el más estudiado; sin embargo, aproximadamente el 90% de todos los OLH no son metabolizados por la microbiota intestinal. Es por ello que se han propuesto hipótesis sobre otras funciones en el organismo (Bode, 2009). En la **Figura 2** se muestran los efectos atribuidos a los OLH, tales como: propiedades anti-inflamatorias, inmuno-moduladoras, efecto prebiótico y antimicrobiano. Por otro lado, estos

favorecen la maduración del intestino y están relacionados con el desarrollo del sistema inmune innato (Jantscher-Krenn y Bode, 2012).



**Figura 2.** Efectos que proporcionan los oligosacáridos de leche humana

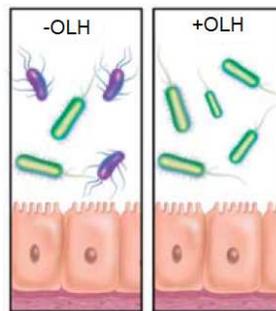
### 2.3.1 Efecto prebiótico de los OLH

En 1954 György *et al.* descubrieron que una mezcla de OLH promovía el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum*. Estudios posteriores revelaron que hay una correlación entre la preferencia de las bifidobacterias a consumir “oligosacáridos de cadena corta” o complejos, con respecto a la expresión de enzimas bacterianas capaces de hidrolizarlos. Lo anterior sugiere que el efecto prebiótico y bifidogénico varía dependiendo de la composición de OLH entre diferentes madres y en el transcurso de la lactancia (Bode, 2009).

Para que los OLH sean considerados prebióticos deben cumplir las siguientes características: ser resistentes a los ácidos gástricos, a la hidrólisis por enzimas presentes en el tracto gastrointestinal y a la absorción, ser fermentables por la microbiota intestinal benéfica

(Bifidobacterias y Lactobacilos) y estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales asociadas a la salud y el bienestar (Gibson *et al.*, 2004).

Como se muestra en la **Figura 3** las bacterias “deseables” o benéficas a la salud humana y las bacterias “indeseables” o perjudiciales causantes de enfermedades gastrointestinales tienen diferentes capacidades de metabolizar los OLH (Bode, 2009). Se encontró que los niños alimentados con leche materna tienen cuentas bajas de Clostridio y Enterococos y alto número de estafilococos.



**Figura 3.** Efecto prebiótico de los OLH. Se observa en el cuadro derecho que aquellos microorganismos capaces de metabolizar los OLH son quienes prosperan. Se observa en color verde las bacterias probióticas y en color morado las patógenas.

El efecto prebiótico de la leche humana se ha investigado intensamente en el último siglo. Se sabe que el intestino humano no expresa enzimas capaces de hidrolizar enlaces  $\alpha$ -glucosídicos a residuos de fucosa y ácido siálico ni enzimas capaces de hidrolizar enlaces  $\beta$ -glucosídico en las moléculas “core” de los OLH por los que presentan baja digestibilidad. Los datos hasta ahora disponibles en estudios de OLH, se han centrado principalmente en su papel como factores de crecimiento y de mejora de la proliferación de bifidobacterias. En este sentido, Ward *et al.* (2007) demostraron en estudios *in vitro* que los OLH son utilizados como única fuente de carbono por *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium infantis* mostrando mayor crecimiento en comparación con *Escherichia coli* (Ward *et al.*, 2007).

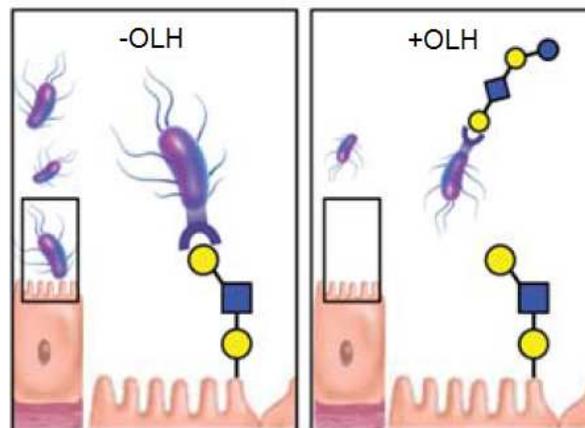
### 2.3.2 Efecto anti-infeccioso de los oligosacáridos de la leche humana

La virulencia de patógenos como *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholera* y algunas cepas de *Shigella* y *Salmonella* dependen de su habilidad de adherirse. Estas bacterias

con frecuencia emplean lectinas que son proteínas que se unen a carbohidratos con una alta especificidad, de esta manera son capaces de adherirse a los oligosacáridos de la superficie epitelial (Thomas and Brooks, 2004; Chirico *et al.*, 2008; Shoaf-Sweeney y Hutkins, 2009; Domínguez-Vergara *et al.*, 2009). El principio se basa en el reconocimiento proteína-carbohidrato que se establece entre las lectinas microbianas y los glicoconjugados de la superficie celular. Lo anterior permite a la bacteria adherirse y posteriormente colonizar e invadir al epitelio intestinal (Bode, 2012).

Algunos de los glicanos receptores también son parte de los OLH lo que refuerza la idea de que actúan como ligandos análogos y protegen a los lactantes contra infecciones. Ruiz-Palacios *et al.* (2003) demostraron que los sacáridos fucosilados son capaces de inhibir a *Campylobacter jejuni*, una de las principales causas de diarrea en el mundo. La incidencia de diarrea causada por este patógeno se relaciona inversamente con el contenido de 2'fucosil-lactosa en la leche materna.

En la **Figura 4** se muestra la forma en la que los OLH participan ejerciendo su efecto anti-infeccioso. Las adhesinas bacterianas reconocen a los carbohidratos receptores en las células del epitelio intestinal, pero si los receptores bacterianos se encuentran bloqueados por los OLH, se evita la unión al huésped y se detiene el proceso de infección (Domínguez-Vergara *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Efecto anti-infeccioso de los OLH.

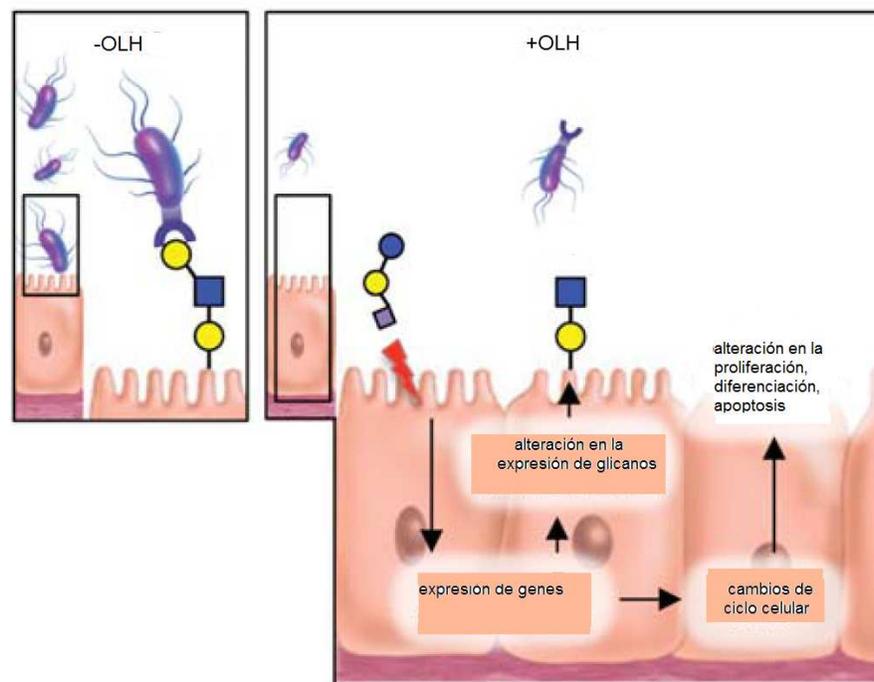
Estudios recientes han mostrado que los OLH podrían reducir la transmisión de VIH de madres a hijos. Se estima que 2.3 millones de niños en el mundo están infectados de VIH, de los cuales,

el 40% ha sido transmitido de madre a hijo. Se piensa que la lactancia materna es una ruta posnatal de transmisión, sin embargo, observaciones realizadas en bebés de madres infectadas con VIH, los cuales se encuentran en constante exposición al virus durante el periodo de lactancia, no se han infectado de VIH. Esto puede deberse a los mecanismos de protección que los OLH ejercen en el metabolismo (Bode, 2009).

### 2.3.4 Oligosacáridos de leche materna y la modificación del glicoma

Los OLH también pueden alterar la maquinaria de glicosilación del epitelio intestinal y modificar el glicoma de la superficie celular (“glicocalix”) afectando la adhesión, la proliferación y la colonización (**Figura 5**) (Bode, 2009).

Angeloni *et al.* (2005) demostraron que las células Caco-2 cambian su perfil de glicanos en la superficie celular al ser expuestas a 3´ sialil-lactosa; además, ellos evaluaron la adhesión de *Escherichia coli* enteropatógena y observaron una reducción del 90% como respuesta a los cambios inducidos por la presencia de 3´ sialil-lactosa; este estudio fue el primero en reportar que los glicanos exógenos regulan la expresión génica (Angeloni *et al.*, 2005; Bode, 2009; Bode, 2012).



**Figura 5.** Modificación del glicoma por efecto de los OLH.

### 2.3.5. Efectos sistémicos de los oligosacáridos de la leche humana

Existe evidencia de que los OLH pueden absorberse parcialmente permaneciendo en el torrente sanguíneo e induciendo algunos efectos sistémicos (Gnoth *et al.*, 2000). Algunos de estos carbohidratos pueden ser reconocidos por selectinas relacionadas con procesos inflamatorios; Mediante este reconocimiento del tipo lectina-carbohidrato son capaces de modular la adhesión de leucocitos, monocitos, linfocitos y neutrófilos. Estos carbohidratos, ejercen un efecto anti-inflamatorio que posiblemente contribuye a la disminución de la incidencia de enfermedades inflamatorias en el infante (Kunz *et al.*, 2014).

## 2.4 Fucosidasas

Las fucosidasas catalizan la reacción de hidrólisis de enlaces glicosídicos de fuco-oligosacáridos con un alto grado de estereoespecificidad. En la mayoría de los casos, la hidrólisis del enlace glicosídico es catalizada por dos residuos de aminoácidos de la enzima. Dependiendo de la posición espacial de estos residuos catalíticos, la hidrólisis se produce a través de la conservación o inversión de la configuración del carbono anomérico (Carbohydrate-Active Enzyme).

El mecanismo de inversión se realiza a través de una catálisis ácido base. En este proceso, las enzimas utilizan dos residuos carboxílicos que actúan uno como un ácido y el otro como una base. Por otro lado, el mecanismo de conservación es llevado a cabo por una catálisis electrostática. Las enzimas actúan mediante un mecanismo de dos etapas, en el primer paso el nucleófilo ataca el centro anómico, dando como resultado la formación de un intermediario con un carácter ácido provisto por el carboxilato. En el segundo paso el ahora desprotonado carboxilato actúa como base y se une a una molécula de agua nucleofílica para hidrolizar la enzima intermedia, dando el producto hidrolizado.

En la naturaleza existen fucosidasas con diferentes especificidades. Según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, “E.C.” (Enzyme Clasification) que está basada en las reacciones que las enzimas catalizan, las  $\alpha$ -L-fucosidasas pertenecen a la clasificación E.C.3.2.1.51 ya que son capaces de hidrolizar los enlaces  $\alpha$  (1-2/3/4/6) de los fucosídicos tanto en sustratos naturales como sustratos sintéticos (ej. pNP-F).

Estas enzimas son exo-glicosidasas capaces de hidrolizar el residuo L-fucosil del extremo no reductor de fucosil-oligosacáridos (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011). Como se muestra en la **Tabla 2**, existen además otras fucosidasas como las E.C.3.2.1.63 que son muy específicas en el tipo de enlace que hidrolizan. Las diferencias en las especificidades de las enzimas se debe a las diferencias estructurales en los sitios catalíticos (Ashida *et al.*, 2009).

**Tabla 2.** Clasificación de las  $\alpha$ -L-fucosidasas según la IUBMB

E.C.	Enzima	Fuente de enzima
3.2.1.51	$\alpha$ -L-fucosidasa	<i>Penicillium multicolor</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> , <i>Sus scrofa</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus fulminans</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Bos taurus</i> , <i>canis lupus familiaris</i> , <i>Chamelea gallina</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Cricetulus griseus</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Drosophila ananassae</i> , <i>Drosophila erecta</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Haliothis gigantea</i> , <i>Macaca mulatta</i> , <i>Macaca fascicularis</i> , <i>Pecten maximus</i> , <i>Pomacea canaliculata</i> , <i>Prunus dulcis</i> , <i>Rattus sp.</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptomyces sp.</i> , <i>Thermotoga marítima</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i>
3.2.1.63	$\alpha$ (1-2)-L-fucosidasa	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus fulminans</i> , <i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Prunus dulcis</i> , <i>Ruminococcus gnavus</i> , <i>Ruminococcus torques</i> , <i>Chamelea gallina</i>
3.2.1.111	$\alpha$ (1-3/4)-L-fucosidasa	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Prunus dulcis</i>
3.2.1.127	$\alpha$ (1-6)-L-fucosidasa	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> .

E.C.: Número de clasificación de la comisión de enzimas

IUBMB: Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.

Por otro lado la clasificación CAZy (Carbohydrate-Active Enzyme) ubica a las fucosidasas en base a la similitud en las secuencias de aminoácidos y las características estructurales de la enzima, ya que existe una relación directa entre la secuencia y el plegamiento de la proteína. Las fucosidasas son clasificadas en dos familias de glicosil-hidrolasas: la familia de glicosil

hidrolasas GH29 y la familia GH95. La especificidad de sustratos en la familia GH29 es muy amplia, mientras que para la familia GH95 es estricta a compuestos fucosilados que presenten enlace  $\alpha$  (1-2) (Ashida *et al.*, 2009).

Las enzimas que pertenecen a la familia GH29 obedecen un mecanismo de conservación, suelen tener dos ácidos carboxílicos catalíticos en sus sitios activos y realizar un doble desplazamiento en el que un intermediario  $\alpha$ -L-fucosil se forma y luego es hidrolizado (Berteau *et al.*, 2002; Cobucci-Ponzano *et al.*, 2003).

#### 2.4.1 Fuentes de fucosidasas

Existen cuatro fuentes de  $\alpha$ -fucosidasa en la naturaleza: microorganismos, moluscos, plantas y mamíferos (Bahl, 1970; Scudderj *et al.*, 1990; Berteau *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2005; Liu, 2009). Sin embargo, no todas se encuentran disponibles comercialmente o sus costos son muy elevados.

El empleo de fuentes comerciales de fucosidasa para realizar trabajos de investigación resulta más rápido y fácil en comparación con trabajar con enzimas extraídas y purificadas en el laboratorio, ya que el proceso de obtención y purificación de proteínas puede ser un procedimiento largo y complicado, en especial cuando el porcentaje de recuperación es bajo. Sin embargo, el depender de la existencia de la enzima comercial, advierte una desventaja si la enzima saliera del mercado. Ejemplo de lo anterior es el caso de la fucosidasa de *Bos taurus* empleada por nuestro equipo de trabajo en investigaciones previas y que salió del mercado en el 2010, dejando incompleto este estudio. En la **Tabla 3** se muestra los proveedores de  $\alpha$ -L-fucosidasa en México.

**Tabla 3.** Fucosidasas comerciales.

Proveedor	Fuente	Enlace que hidroliza	Sustrato
<i>Sigma Aldrich</i> (E. U. A)	<i>Bos taurus</i>	$\alpha$ (1-2/3/4/6)	Glicoconjugados pNP-F
Bio Lab (E. U. A) Química Valaner	<i>Xantomonas</i>	$\alpha$ (1-2)	Sin actividad sobre pNP-F
Takara Bio Inc (Japón)	<i>Streptomyces sp. 142</i>	$\alpha$ (1-3/4)	LNFP II, LNFP III

Takara Bio Inc (Japón)	<i>Corynebacterium sp.</i>	$\alpha$ (1-2)	2 FL, PGM, pNP-F
ProZyme Inc (E. U. A)	<i>Bos taurus</i>	$\alpha$ (1-2/3/4/6)	NR
ProZyme Inc (E. U. A)	<i>Xanthomonas manihotis</i>	$\alpha$ (1-2)	NR
ProZyme Inc (E. U. A)	Almendra	$\alpha$ (1-3/4)	LNFP II, N-glicanos (ND-PNP-F)
CPC Biotech s.r.l (Italia)	Microbiana	$\alpha$ (1-2/3/4/6)	PNP-F
Megazyme (Irlanda)	<i>Thermotoga maritima</i> recombinante	$\alpha$ (1-2/3/4/6)	PNP-F

pNP-F: para nitro fenil fucósido, LNFP: Lacto N fucopentaosa, 2 FL: 2-fucosil-lactosa, PGM: mucina gástrica porcina, NR: no reportado

En la mayoría de los casos, los trabajos que requieren el uso de fucosidasas como el análisis de OLH y glicoconjugados incluyen el proceso, tanto de producción como de purificación de la enzima. La **Tabla 4** muestra fucosidasas de varias fuentes que se han empleado para analizar tanto carbohidratos como moléculas de interés biológico.

Los procesos de purificación de enzimas, normalmente empleados son: precipitación con sales, separación por microfiltración o ultrafiltración y cromatografía de afinidad. En el caso de enzimas recombinantes (como la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *L. casei*), estas son más fácilmente purificadas ya que normalmente presentan un marcador o “cola de histidinas” que ayuda a su separación por cromatografía.

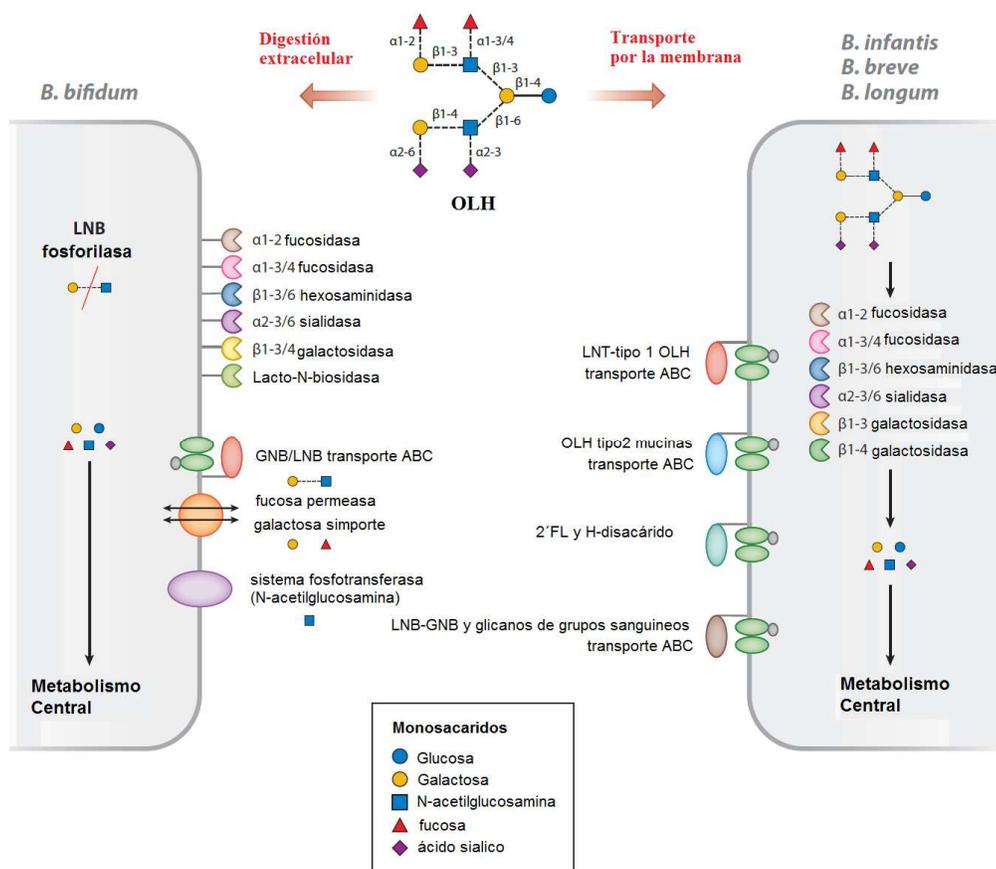
**Tabla 4.** Fucosidasas purificadas

Fuente	Enlace hidrolizado	Sustrato	Autor
<b>PLANTAS</b>			
Almendra	$\alpha$ (1-3)	Asialoorosomucoide Lactoferrina	33
Almendra	$\alpha$ (1-3/4)	3 FL, LNFP II y LNFP III	66
<b>HONGOS</b>			
<i>Streptomyces</i>	$\alpha$ (1-3/4)	Oligosacáridos, no hidroliza pNP-F	62
<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ (1-6)	asialoagalactofetuin	86
<i>Penicillium multicolor</i>		pNP-F	
<b>MOLUSCOS</b>			
<i>Pecten maximus</i> (almeja)		pNP-F, fucoidan	64

<b>AMEBA</b>			
<i>Dyctyostelium discoideum</i>	$\alpha$ (1-/2/3/4/6)	pNP-F, 2 FL, 3 FL, LNFP (I, II Y III)	64
<b>ARQUEA</b>			
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		pNP-F	18
<b>ANIMAL</b>			
<i>Bos taurus</i> (bovino)	$\alpha$ (1-2/3/4)	pNP-F	73
<b>BACTERIA</b>			
<i>Bacillus circulans</i> M28	$\alpha$ (1-2/3/4)	PGM, pNP-F	79
<i>Bacillus</i> sp. K40T	$\alpha$ (1-2)	LNFP I, PGM, PSM	42
<i>Bacillus fulminas</i>	$\alpha$ (1-2)	LNFP (II y III)	39
<i>Bacillus cereus</i>	$\alpha$ (1-2)	2 FL, LNFP I, PGM	48
<i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10557	$\alpha$ (1-2)	PSM, glicoproteínas de la saliva	70
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	$\alpha$ (1-2), $\alpha$ (1-3/4)	OLH	6
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	$\alpha$ (1-2/3/4/6)	pNP-F, OLH	34

#### 2.4.2 Fucosidasas de Bifidobacterias

La secuencia del genoma de *Bifidobacterium longum sub. infantis*, reveló la existencia de cuatro posibles fucosidasas: tres que pertenecen a la familia GH29 y una que pertenece a la familia GH95 todas ellas intracelulares. Estas enzimas le proveen la capacidad de adaptación al consumo de OLH como fuente de carbono (Sela *et al.*, 2008; Ashida *et al.*, 2009). Por otro lado, *Bifidobacterium bifidum* JCM1254 es capaz de producir dos fucosidasas: la  $\alpha$  (1-2)-L-fucosidasa (GH95) y una  $\alpha$ -L-fucosidasa (GH29). Dichas enzimas son proteínas transmembranales ancladas a la membrana con una región extracelular a diferencia de las fucosidasas de *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* que se encuentran en el interior de la célula como se muestra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Ruta metabólica de OLH por parte de *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* (Smilowitz *et al.*, 2014).

GNB: Galacto-N-biosa; LNB: lacto-N-biosa

En la **Tabla 5** se enlistan bifidobacterias que en su genoma se codifica la secuencia para la  $\alpha$ -L-fucosidasa (<http://www.cazy.org/>).

**Tabla 5.** Fucosidasas en bifidobacterias

Microorganismo	Cepa	Referencia
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	PR12010	51
	S17	58
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Bd 1	54
<i>Bifidobacterium longum sub. infantis</i>	ATCC 15697	42
	JCM 1222	14
<i>Bifidobacterium longum sub. longum</i>	JDM301	56

### 2.4.3 Fucosidasas de Lactobacilos

Hasta el momento, las fucosidasas de lactobacilos han sido poco estudiadas, solo existe un reporte de  $\alpha$ -L-fucosidasas en estos microorganismos, que es otro grupo importante de bacterias probióticas que habitan el intestino humano. Sin embargo, los análisis realizados del genoma de 25 especies de Lactobacilos reveló que *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* codifican posibles fucosidasas. La capacidad de estos microorganismos para producir enzimas como las fucosidasas capaces de hidrolizar fucosil-oligosacáridos presentes en los OLH, juega un papel importante en la adaptación a nichos particulares como es el intestino humano (Morita *et al.*, 2009; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011).

La secuencia de los genomas de lactobacilos depositada en la base de datos de CAZy muestra que las cepas reportadas en la **Tabla 6** codifican posibles fucosidasas (<http://www.cazy.org/>).

**Tabla 6.** Cepas de Lactobacilos que en su genoma codifican posibles fucosidasas

<b>Microorganismo</b>	<b>Cepa</b>	<b>Referencia</b>
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	28
	BD-11	1
	BL-23	28
	Zhang	58
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 8530	28
	GG	31
	LC 705	21

### 2.4.4 Fucosidasa de *T. marítima*

*Thermotoga marítima* es una bacteria termófila que produce una amplia gama de carbohidrasas incluyendo una  $\alpha$ -L-fucosidasa (52 kDa) que tiene 56% de similitud con las fucosidasas humanas. En el sitio activo de esta enzima existe un nucleófilo que es la Asp-224 el cual está en la secuencia peptídica <sup>222</sup>WNDMGWPE- KGKEDL<sup>235</sup> (Tarling *et al.*, 2003).

## 2.5 Uso de las fucosidasas

Las fucosidasas son usadas principalmente para estudiar la estructura de oligosacáridos (tanto libres como conjugados) presentes en la superficie celular, que juegan un papel muy importante

en procesos de reconocimiento. Estos carbohidratos están involucrados en interacciones célula-proteína, célula-célula, mecanismos de adhesión, interacciones huésped-microorganismo, etc. Un ejemplo de lo anterior, es el empleo de la  $\alpha$  (1-2)-L-fucosidasa de *Bacillus cereus*, que es utilizada como herramienta para investigar los mecanismos de adhesión de *Helicobacter pylori*. El antígeno Lewis b expresado en la mucosa gástrica humana que es usado como ligando para que este microorganismo se adhiera a la superficie epitelial como primer paso para el proceso de infección (Miura *et al.*, 2005). Otro ejemplo, es la fucosidasa humana, que tiene aplicación en el estudio de mecanismos de eliminación de los residuos L-fucosil presentes en glicoconjugados. La deficiencia de la enzima causa una enfermedad degenerativa conocida como fucosidosis que presenta severas condiciones patológicas como inflamación, cáncer y fibrosis quística (Liu, 2009).

El análisis de OLH, es otro campo donde las fucosidasas pueden ser empleadas. Los OLH son factor de crecimiento para las Bifidobacterias que habitan el tracto gastrointestinal de bebés amamantados con leche materna. Recientemente se ha descubierto que dos fucosidasas de *Bifidobacterium bifidum* son esenciales para que puedan utilizar a los fucosil-oligosacáridos como sustrato y así convertirse en el microorganismo de mayor predominio en la microbiota gastrointestinal (Ashida *et al.*, 2009).

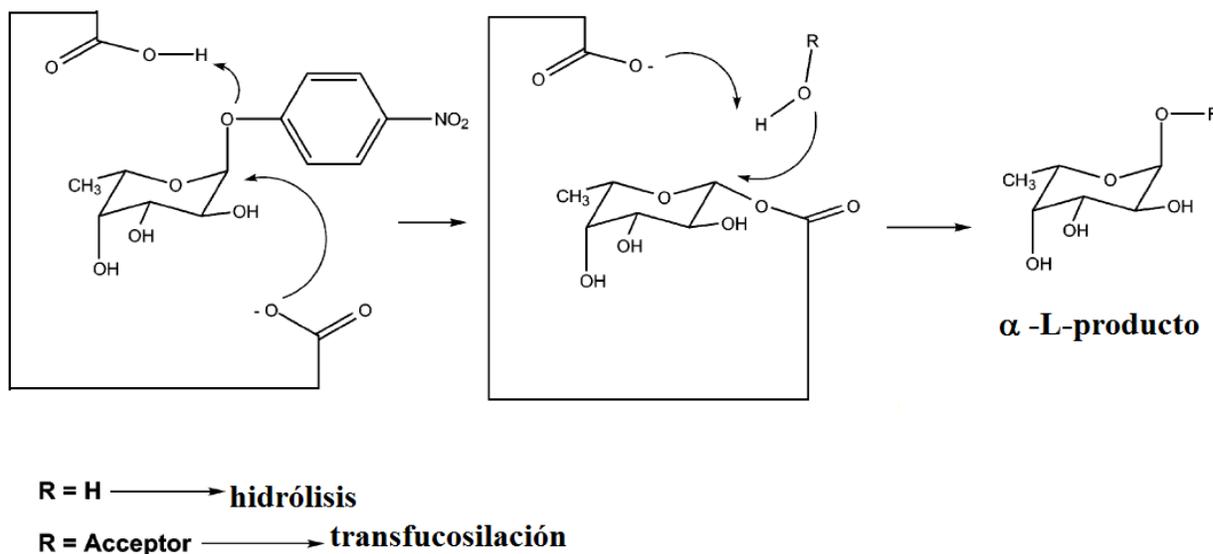
## **2.6 Empleo de fucosidasa en la síntesis de oligosacáridos con estructura similar a los OLH**

En la actualidad, es ampliamente aceptado que los carbohidratos presentes en las glicoproteínas son estructuras importantes que actúan como receptores específicos de proteínas y de células, como por ejemplo: en la metástasis del cáncer, la respuesta inmune, el ataque de patógenos al sistema respiratorio y gastrointestinal (Nilsson *et al.*, 1995).

La L-fucosa es el monosacárido más común presente en el extremo no reductor de los glicanos de mamíferos, mucinas intestinales, antígenos de grupos sanguíneos y OLH (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011). Además, los oligosacáridos presentes en los glicoconjugados poseen enlaces fucosil  $\alpha$  (1-2), (1-3), (1-4) y (1-6) a residuos D-galactosil.

El interés por estudiar la participación de los oligosacáridos en los procesos biológicos, ha fomentado la búsqueda de alternativas para su síntesis. Una alternativa ha sido la síntesis

enzimática mediante reacciones de transglucosilación empleando glicosil-hidrolasas con capacidad transferasa. Un ejemplo de este proceso, es la  $\alpha$ -L-fucosidasa de la arquea *Sulfolobus solfataricus*. Esta enzima tiene especificidad sobre el pNP-F en reacciones de transfucosilación siguiendo un mecanismo de reacción en la que los productos obtenidos conservan la configuración anomérica. Como se muestra en la **Figura 7**, la enzima tienen dos ácidos carboxílicos catalíticos en su sitio activo y utiliza un mecanismo de doble desplazamiento en el que se forma un intermediario  $\beta$ -L-fucosil que posteriormente es hidrolizado. Un ácido carboxílico en el sitio activo actúa como el nucleófilo lo que lleva a la formación del intermedio covalente, mientras que el otro juega el papel de catalizador ácido en la primera etapa y el catalizador de base en la segunda (Cobucci-Ponzano *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Mecanismo de acción de la  $\alpha$ -L-fucosidasa para la síntesis de oligosacáridos

El uso de diferentes grupos aceptores y fuentes de fucosidasa ha generado una variable mezcla de oligosacáridos que pueden ser sintetizados regio-selectivamente. En la **Tabla 7** se muestran los oligosacáridos que se han sintetizado por reacciones enzimáticas con el uso de fucosidasas de diversas fuentes.

**Tabla 7.** Oligosacáridos sintetizados por reacciones de transfucosilación empleando  $\alpha$ -L-fucosidasas

Oligosacárido sintetizado	Donador	Aceptor	Fuente de fucosidasa	Enlaces	Autor
Metil-2-O-fucopiranosil- $\beta$ -D-galactopiranosido	$\alpha$ -L-pNP-F	$\beta$ -D-GalOMe	Hígado porcino	$\alpha$ (1-2) $\alpha$ (1-6)	75
Metil-6-O-fucopiranosil- $\beta$ -D-galactopiranosido	$\alpha$ -L-FucpF	$\beta$ -D-GalOMe	Hígado porcino	$\alpha$ (1-6)	
Metil-2-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil- $\beta$ -D-galactopiranosido	$\alpha$ -L-pNP-F	$\beta$ -D-GalOMe	<i>Corynebacterium sp.</i>	$\alpha$ (1-2)	2
2-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil-D-galactosa	$\alpha$ -L-pNP-F	D-Gal	<i>Corynebacterium sp.</i>	$\alpha$ (1-2)	
3-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil-D-glucosa	$\alpha$ -L-pNP-F	D-Glc	<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ (1-3)	23
2-acetamido-2-deoxi-3-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil-D-glucosa	$\alpha$ -L-pNP-F	D-GlcNAc	<i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ (1-3)	
Metil-6-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil- $\beta$ -D-galactopiranosido	$\alpha$ -L-pNP-F	$\beta$ -D-GalOMe	Ampullaria	$\alpha$ (1-6)	
Fuc- $\alpha$ - (1-4)(6-OBn)GlcNH <sub>2</sub> $\beta$ SEt	$\alpha$ -L-pNP-F	(6-OBn)GlcNH <sub>2</sub> $\beta$ SEt	<i>Bos Taurus</i>	$\alpha$ (1-4)	53
$\alpha$ -L-Fuc (1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAcOMe	$\alpha$ -L-pNP-F	GlcNAc- $\alpha$ -OMe	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	23
$\alpha$ -L-Fuc (1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAcOAll	$\alpha$ -L-pNP-F	GlcNAc- $\alpha$ -OAll	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	
$\alpha$ -L-Fuc (1-3)- $\beta$ -D-GlcNAcOAll	$\alpha$ -L-pNP-F	GlcNAc- $\alpha$ -OAll	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	
$\alpha$ -L-Fuc (1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAcOMe	$\alpha$ -L-FucpF	GlcNAc- $\alpha$ -OMe	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	
$\alpha$ -L-Fuc (1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAcOAll	$\alpha$ -L-FucpF	GlcNAc- $\alpha$ -OAll	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	
$\alpha$ -L-Fuc (1-3)- $\beta$ -D-GlcNAcOAll	$\alpha$ -L-FucpF	GlcNAc- $\alpha$ -OAll	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	
$\alpha$ -L-Fuc (1-3)-D-GlcNAc	$\alpha$ -L-FucpF	GlcNAc	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	

$\alpha$ -L-Fuc (1-3)-D-Glc	$\alpha$ -L-Fucp F	Glc	<i>Penicillium multicolor</i>	$\alpha$ (1-3)	
$\alpha$ -L-pNP-F: para-nitro-fenil-fucopiranosido; $\alpha$ -L-Fucp F: fucopiranosil-fluorida; $\beta$ -D-GalOMe: Metil $\beta$ -D-galactopiranosido; D-Gal: D-galactosa; D-Glu: D-glucosa; D-GlcNAc: 2-Acetamido-2 desoxi-D-glucosa; NPht: grupo Ftalimido; Bn: grupo bencil; Set: grupo tioetil.					

Por otro lado, la síntesis natural de OLH se lleva a cabo en la glándula mamaria durante el periodo de lactancia, lo que hace difícil estudiar su ruta biosintética. Además, la gran diferencia con los oligosacáridos de otras especies ha limitado el uso de modelos animales para los estudios de síntesis, metabolismo y absorción de los OLH (Bode, 2006). La aplicación de métodos enzimáticos, en especial, el uso de reacciones de transglicosilación para su producción es un procedimiento que aún requiere mucho estudio ya que es un proceso que depende de un balance entre la reacción de hidrólisis y la reacción de transferencia para la formación de oligosacáridos (Ajisaka y Shirakabe, 1992).

Hasta ahora, solo existe un reporte de síntesis de oligosacáridos similares a los encontrados en la leche humana, empleando  $\alpha$ -L-fucosidasas de lactobacilos. Los trabajos realizados por Rodríguez-Díaz *et al.* (2013) mostraron la capacidad de las  $\alpha$ -L-fucosidasas recombinantes de *L. casei* BL23 de sintetizar fucosil-oligosacáridos, la AlfB sintetizó el fucosil- $\alpha$ -(1,3)-N-acetilglucosamina con un rendimiento de 23% y la AlfC sintetizó la fucosil- $\alpha$ -(1,6)-N-acetilglucosamina con un rendimiento de 56%. El empleo de  $\alpha$ -fucosidasas de bacterias probióticas se ha planteado como una estrategia para la producción de fucosil-oligosacáridos con actividades biológicas similares a las que presentan los OLH.

### 3. HIPÓTESIS

**3.1.** Las bacterias lácticas son capaces de consumir oligosacáridos fucosilados presentes en la leche humana, por tanto, es posible usarlas para la producción de fucosidasa.

**3.2.** Las fucosidasas microbianas estudiadas son capaces de sintetizar fucosil-oligosacáridos bajo condiciones específicas de reacción.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. General

Establecer una metodología integral, que permita la obtención de oligosacáridos fucosilados con posible actividad biológica, sintetizados por vía enzimática.

#### 4.2. Específicos

- 4.2.1. Seleccionar bacterias productoras de fucosidasas (*Lactobacilos* y *Thermotoga marítima*).
- 4.2.2. Producir y purificar fucosidasas microbianas.
- 4.2.3. Seleccionar las enzimas capaces de sintetizar fucosil-oligosacáridos.

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 ESTUDIO DE FUCOSIDASAS DE LACTOBACILOS

#### 5.1.1 Cepas de Lactobacilos

Se emplearon seis cepas de lactobacilos, cinco de ellas aisladas previamente de productos comerciales por Cruz-Guerrero *et al.*, (2014): *Lactobacillus casei* IMAU60214 aislada de Bio4<sup>®</sup> de Grupo Lala S. A. (GenBank GU550098), *Lactobacillus casei* Shirota aislado de Yakult<sup>®</sup> de Yakult S. A de C. V (GenBank GU550103), *Lactobacillus rhamnosus* GG aislado de cápsulas de Culturelle<sup>®</sup> (GenBank GU550100), *Lactobacillus rhamnosus* KLDS aislado de fórmula láctea de NAN<sup>®</sup> de Nestlé S. A. (Gen Bank GU550102), *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 aislado de Chamito<sup>®</sup> de Nestlé S. A. (GenBank GU550099) y *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus* NCFB-2772 (Colección Nacional de Bacterias en Alimentos, Reino Unido).

#### 5.1.2 Prueba preliminar para la identificación de lactobacilos productores de fucosidasa

Las seis cepas de lactobacilos fueron crecidas en tubos con 8 mL de caldo MRS (Fluka, Sigma-Aldrich, E.U.A.) a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de fermentación, se tomaron alícuotas de 50 µL de cada tubo y se inoculó en tubos que contenían: 0.3 % de extracto de levadura (Bioxon, México), 0.5 % de peptona de caseína (Bioxon, México) y 1 % de p-nitrofenil  $\alpha$ -L-fucopiranosido (pNP-F) (Sigma-Aldrich, E.U.A.). Se incubó a 37 °C durante 12 h y se observó el cambio de color en el medio de fermentación. El pNP-F es un compuesto sintético que en solución es incoloro, pero al ser hidrolizado genera una coloración amarilla este cambio de color indica la presencia de la fucosidasa.

#### 5.1.3 Crecimiento de Lactobacilos con diferentes fuentes de carbono

Las seis cepas de lactobacilos fueron crecidos en tubos con 8 mL de medio de cultivo que contenía: 0.5 % de extracto de levadura (Bioxon, México), 1 % de peptona de caseína (Bioxon, México) y 1 % de alguna de las siguientes fuentes de carbono: D-glucosa, D-galactosa, L-fucosa ó pNP-F. La fermentación se realizó a 37 °C durante 24 h, y se inoculó con 1mL de un cultivo que tenía una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. Se usó como control un

medio de cultivo sin fuente de carbono (SFC). El crecimiento se midió por espectrofotometría (Shimadzu UV160A, Japón) a una longitud de onda de 600 nm.

#### 5.1.4 Consumo de las fuentes de carbono

Para cada microorganismo se determinó la fuente de carbono residual a las 24 h de fermentación. El consumo de D-glucosa, D-galactosa y L-fucosa se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una bomba LAB Alliance (HiTech Trader, New Jersey, E. U. A) y detector Light Scattering PL-ELS1000 (Polymer Laboratories, Varian, Inc., Massachusetts, E. U. A.). Se utilizó una columna Rezex RHM-monosacáridos 300 x 7.8, 8  $\mu\text{m}$  (Phenomenex Inc., California, E.U.A.); la columna se mantuvo a 75 °C y se empleó como fase móvil agua desionizada con un flujo de 0.3 mL/min. La cuantificación de carbohidratos se realizó mediante una curva patrón (**Anexo 1**)

#### 5.1.5 Cuantificación de actividad de fucosidasas

Los caldos de fermentación con diferentes fuentes de carbono fueron centrifugados a 5000 rpm durante 20 minutos a 4 °C (Beckman J2-MI, Coulter Inc. E. U. A). El sobrenadante fue filtrado (Membrana Millipore®, 0.22  $\mu\text{m}$ ) en condiciones de esterilidad y se determinó la actividad de fucosidasa extracelular. Los paquetes celulares se utilizaron para cuantificar la fucosidasa asociada a la célula.

La actividad de fucosidasa extracelular se realizó directamente en celdas espectrofotométricas. La mezcla de reacción contenía 800  $\mu\text{L}$  de solución 3.5 mM de pNP-F preparada en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7) y 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante, fue incubada a 37 °C durante 10 minutos. Se registró el cambio de absorbancia cada 10 segundos a una longitud de onda de 410 nm (Espectrofotómetro Perkin Elmer DU 640, Beckman Coulter Inc. E.U.A). La concentración del 4-nitrofenol (pNP) liberado fue cuantificada mediante una curva patrón (**Anexo 2**).

La fucosidasa asociada a la célula se determinó empleando el paquete celular. La mezcla de reacción contenía 800  $\mu\text{L}$  de solución 3.5 mM de pNP-F preparada en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7) y 200  $\mu\text{L}$  del paquete celular resuspendido en el buffer de fosfatos, fue incubada a 37 °C durante dos horas. Se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  cada media hora. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para eliminar las células. La

presencia del pNP fue cuantificada en un lector de microplacas Elx 808IU (BioTeck Instruments, Inc. E.U.A) a 415nm. La concentración del 4-nitrofenol (pNP) liberado fue cuantificada mediante una curva patrón (**Anexo 3**).

Una unidad de fucosidasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1nmol de fucosa del pNP-F por minuto a pH 7 y 37 ° C. La actividad enzimática fue expresada como U/mL.

La actividad específica (U) fue definida como actividad enzimática por mg de biomasa. Para cuantificar la biomasa se empleó una curva estándar de peso seco de células (**Anexo 4**).

### 5.1.6 Localización de $\alpha$ -L-fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG

La metodología para la localización de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG se dividió en dos partes. Inicialmente se buscó un método de lisis celular que permitiera extraer la fucosidasa del interior de la célula, y se plantearon una serie de tratamientos (**Tabla 8**). Se determinó la actividad muramidasa de cada tratamiento como medida de la eficiencia para eliminar la pared celular de la bacteria. Finalmente, una vez seleccionado el tratamiento de lisis celular, se realizaron separaciones consecutivas de fracciones celulares en combinación con observaciones en el microscopio de contraste de fases para lograr identificar la fracción con actividad de fucosidasa.

Primera parte: *Lactobacillus rhamnosus* GG fue propagado en caldo MRS (Fluka, Sigma-Aldrich, E.U.A.) durante 16 h (fase exponencial) y cosechada por centrifugación a 6500 rpm durante 10 min y 4 °C (Beckman J2-MI, Coulter Inc., E. U. A). Las células fueron lavadas dos veces con solución isotónica y se centrifugaron nuevamente. El sobrenadante fue desechado y las células limpias fueron resuspendidas en solución amortiguadora (**Tabla 8**) hasta obtener una  $D.O_{450}=1$ . Para cada tratamiento se colocaron 800  $\mu$ L de suspensión celular, 100  $\mu$ L de lisozima y 100  $\mu$ L de alguna de las siguientes enzimas: tripsina, proteinasa-K o mutanolisina. Se incubó durante 3 h a 37 ° C y se cuantificó la disminución en la densidad óptica a  $\lambda=450$  nm cada 30 minutos.

Se determinó la actividad muramidasa como parámetro para elegir el mejor tratamiento de eliminación de la pared celular y se definió una unidad enzimática como aquella que produciría

una disminución de densidad óptica de 0.001 ( $DO_{=450}$ ) por minuto usando una suspensión celular de *L. rhamnosus* GG.

**Tabla 8.** Condiciones empleadas en los tratamientos para lisis celular de *L. rhamnosus* GG.

Tratamiento	Solución amortiguadora	Lisozima (U)	Tripsina (U)	Proteínasa-K (U)	Mutanolisina (U)
1	A	4	2	0	0
2	A	40	20	0	0
3	A	200	200	0	0
4	B	200	0	0	0
5	C	200	0	0	0
6*	C	20	0	0	0
7	A	200	20	0	0
8	B	200	0	15	0
9	D	20	0	0	1

A: Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM  
 B: Tris-HCl 50 mM M pH 8, CaCl<sub>2</sub> 1 mM  
 C: Fosfatos 0.66M pH 6.8  
 D: Tris-HCl 20 mM pH 8  
 \*EDTA (0.3 mg/mL)

Segunda parte: *Lactobacillus rhamnosus* GG fue propagado en 8 mL de caldo MRS durante 16 h y cosechado por centrifugación a 6500 rpm durante 10 min y 4 °C. Las células fueron lavadas dos veces con solución isotónica. El paquete celular limpio fue resuspendido en 200 µL de mutanolisina (1 mg/mL) y 200 µL de lisozima (20 mg/mL) (Sigma-Aldrich, E.U.A.) y se incubó a 37 °C hasta observar la formación de esferoplastos en el microscopio de contraste de fases (Olympus BX 50, Japón). Los esferoplastos fueron centrifugados a 7000 g durante 20 min a 5 °C y el sobrenadante fue reservado en un tubo limpio (sobrenadante 1). La fracción que contenía los esferoplastos se sometió a un choque hipotónico adicionando 2 mL de agua desionizada estéril. Tanto el sobrenadante 1 como la solución obtenida por el choque hipotónico fueron ultracentrifugados a 40 000 g durante 30 min a 5 °C. Del procedimiento anterior se obtuvieron cuatro fracciones. Se tomaron 50 µL de cada fracción y se adicionaron a tubos que contenían 500 µL de solución de pNP-F (3.5 mM), los tubos fueron incubados a 37 °C hasta observar la aparición de color amarillo en alguna de las fracciones. La actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa fue evaluada cualitativamente como positiva (+) o negativa (-).

### 5.1.7 Liberación de fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG

*Lactobacillus rhamnosus* GG fue activado en caldo MRS (Fluka, Sigma-Aldrich, E. U. A.) durante 24 h y 37 °C, posteriormente se tomó 1 mL del caldo fermentado y se inoculó en un matraz con 100 mL de caldo MRS, se fermentó en las condiciones anteriores. El medio fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos y la biomasa fue lavada dos veces con 10 mL de solución isotónica. Las células lavadas fueron transferidas a un matraz con 10 mL de medio mínimo-pNP-F que contenía: 0.5% de extracto de caseína, 1% de peptona de caseína y 2 mL de solución al 0.5 % de pNP-F esterilizada por filtración, se empleó el medio sin pNP-F como control. Se incubó 48 h a 37 °C con agitación constante de 200 rpm. Una vez concluido el tiempo de fermentación, el medio fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante en un tubo estéril y las células fueron resuspendidas en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH 7) a una concentración de final de 150 mg/mL. Se determinó actividad fucosidasa y lactasa a ambas fracciones.

La actividad fucosidasa en el sobrenadante fue determinado directamente en las celdas del espectrofotómetro, se colocaron 950  $\mu$ L de pNP-F 0.35 mM y 50  $\mu$ L de extracto enzimático. Como blanco se empleó 950  $\mu$ L de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7) y 50  $\mu$ L de extracto enzimático debido a que este posee color. La determinación se realizó a 37 °C, se registró la densidad óptica a  $\lambda=410$  nm cada 30 segundos durante 5 minutos.

La actividad lactasa en el sobrenadante fue determinada directamente en las celdas del espectrofotómetro, se colocaron 950  $\mu$ L de oNP-G 0.35 mM y 50  $\mu$ L de extracto enzimático. Como blanco se emplearon 950  $\mu$ L de buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7) y 50  $\mu$ L de extracto enzimático debido a que este posee color. La determinación se realizó a 37 °C, se registró la densidad óptica a  $\lambda=410$  nm cada 30 segundos durante 5 minutos.

Para la actividad fucosidasa en el paquete celular se colocaron 6 tubos con 400  $\mu$ L de solución 0.3 mM de pNP-F en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH 7) y se adicionaron 50  $\mu$ L de suspensión celular a una concentración de 150 mg/mL (al blanco se le adicionó amortiguador). Los tubos fueron colocados a 37 °C en baño de temperatura controlada. La densidad óptica fue registrada cada 30 minutos. La reacción fue detenida adicionando 50  $\mu$ L de NaOH 0.5.

### 5.1.8 Síntesis de fucosil-oligosacáridos empleando $\alpha$ -L- fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG

La síntesis de fucosil-oligosacáridos se llevó a cabo a 37 °C. La mezcla de reacción contenía 1mg de pNP-F como sustrato donador y 200 mg de sustrato aceptor (lactosa, lactulosa, galactosa ó sacarosa) disueltos en 1mL de agua con pH ajustado a 7. Se adicionaron 100  $\mu$ L de extracto enzimático de *Lb. rhamnosus* GG (6 U/mL). La reacción fue monitoreada cada tres horas durante 24 h. El análisis de productos de reacción se realizó mediante HPLC con una bomba LAB Alliance (HiTech Trader, New Jersey, E. U. A) y detector Light Scattering Model 300S (Softa Corporation, Westminster Colorado, E. U. A.). Se utilizó una columna Hamilton HC 75H+, 305 x 7.75, 9  $\mu$ m (Hamilton Company, Reno Nevada, E.U.A.); la columna se mantuvo a 75 °C, y se empleó como fase móvil agua desionizada con un flujo de 0.3 mL/min. Para cuantificar se emplearon curvas patrón (**Anexo 5**)

## 5.2 ESTUDIO DE FUCOSIDASA DE *Thermotoga marítima* RECOMBINANTE

### 5.2.1 Clonación del gen TM306 en *Escherichia coli*

El gen TM306 que codifica la  $\alpha$ -fucosidasa de *Thermotoga marítima* fue clonado empleando el vector pET 22b *amp*<sup>R</sup> (Novagen, E.U.A.), se utilizaron dos enzimas de restricción: HindIII y SacI.

Las características del vector se muestran en el **Anexo 6**

### 5.2.2 Activación de cepas de *Escherichia coli*

Para la clonación del gen TM306 se empleó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y para la expresión de la fucosidasa de *T. marítima* se utilizó *Escherichia coli* BL21, C43 y C43P-rare todas fueron crecidas en caldo LB (Fluka, Sigma-Aldrich, E.U.A.) el medio contenía: triptona 10 g/L, extracto de carne 5 g/L y cloruro de sodio 10 g/L, se incubó a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche. Las cepas fueron conservadas en glicerol en alícuotas de 100  $\mu$ L y congeladas a -20 °C.

### 5.2.3 Preparación de células electrocompetentes

*Escherichia coli* (BL21, C43 y C43P-rare) fue crecida en 50 mL de caldo LB (Fluka de Sigma-Aldrich, E.U.A.) durante toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Se tomó un alícuota de 100  $\mu$ L del

cultivo y se transfirió a medio fresco, se incubó en las mismas condiciones hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a  $\lambda = 600$  nm. Las células fueron centrifugadas a 5000 rpm a 4°C durante 5 minutos (Beckman J2-MI, Coulter Inc. E. U. A) y el sobrenadante fue desechado. El paquete celular fue resuspendido con 5 mL de agua MilliQ fría, una vez resuspendido, se adicionó 20 mL más de agua para lavar las células. Se centrifugó nuevamente a 5000 rpm y 4 °C durante 5 minutos, se decantó cuidadosamente el sobrenadante. Se realizaron dos enjuagues más. Las células obtenidas fueron empleadas para la transformación.

**IMPORTANTE:** Las células electrocompetentes se mantuvieron todo el tiempo en hielo antes de ser transformadas o de ser conservadas en glicerol (a una concentración final de 10% glicerol) en viales con 50  $\mu$ L de células y se congelaron a -70 °C.

#### 5.2.4 Transformación de las células electrocompetentes

Las células electrocompetentes fueron descongeladas en refrigeración. Una vez descongeladas se colocaron 50  $\mu$ L de células y 2  $\mu$ L del plásmido que contenían el gen de la  $\alpha$ -fucosidasa (pet22/ $\alpha$ -fuc) en un vial eppendorf de 1.5 mL. Se mezcló con suavidad dando pequeños golpecitos con la yema del dedo en el vial. Posteriormente la mezcla fue transferida a una celda de electroporador de 0.1 cm previamente enfriada en hielo. Las células electrocompetentes fueron electroporadas (Micropulser, BioRad, E.U.A.) a 1 pulso de 1.8 kV. Se verificó que la lectura fuera cercana a 5. Las células transformadas fueron recuperadas adicionando 500  $\mu$ L de medio LB<sup>antibiótico</sup> estéril a la celda, el medio fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 mL e incubadas sin agitación durante una hora. Se tomaron alícuotas de 50 y 100  $\mu$ L de las células transformadas y se sembró por extensión con perlas en placas de agar LB<sup>antibiótico</sup> (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Antibiótico empleado para cada cepa de expresión de *E. coli*

Cepa	Antibiótico
<i>E. coli</i> BL21	ampicilina <sup>200 <math>\mu</math>g/mL</sup>
<i>E. coli</i> C43	ampicilina <sup>200 <math>\mu</math>g/mL</sup>
<i>E.coli</i> C43 P-rare	ampicilina <sup>200 <math>\mu</math>g/mL</sup> /cloranfenicol

Las placas fueron incubadas a 37 °C durante toda la noche (se deben obtener colonias aisladas). Las colonias que crecieron fueron las que contenían el plásmido y por ende la resistencia al antibiótico.

### 5.2.5 Expresión de la fucosidasa de *T. maritima* en *Escherichia coli*

Se tomaron de 2 a 3 colonias de *E. coli* transformada (BL21/pet22/ $\alpha$ -fuc, C43/pet22/ $\alpha$ -fuc ó C43 P-rare/pet22/ $\alpha$ -fuc) y se inoculó en un matraz de 50 mL de medio LB<sup>antibiótico</sup> (Tabla 9). Se incubó a 37 °C durante 24 h y 200 rpm. Se transfirieron 15 mL del caldo de cultivo a 1L de medio 2YT<sup>antibiótico</sup> que contenía: 10 g/L de extracto de levadura, 16 g/L de triptona y 5 g/L de cloruro de sodio, en un Fernbach de 2.8 L. Se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a  $\lambda=600$  nm. Una vez alcanzada esa densidad óptica, se adicionaron 200  $\mu$ L de IPTG 1M para tener una concentración final de 0.2 mM de IPTG y se incubó a 18 °C durante 20 h a 100 rpm. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 4000 rpm por 20 min y enjuagadas dos veces con 25 mL de solución amortiguadora de fosfatos-citratos (50 mM-100 mM) a pH 5. Se centrifugó y desechó el sobrenadante. Al paquete celular se le adicionaron 5 mL de lisozima en concentración de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, E. U.A.) preparada en la misma solución amortiguadora y se resuspendió el paquete celular. Se congeló y descongeló en tres ocasiones y se sonicó en hielo durante cuatro ciclos de 10 segundos con 30 segundos de descanso entre cada ciclo, se empleó una amplitud de 70 % (Ultrasonic Processor, Cole Parmer,). Las células sonicadas fueron centrifugadas a 13 000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue calentado a 70 °C por 5 minutos para precipitar las proteínas termolábiles propias de *E. coli*. Se centrifugó el sobrenadante a 15000 g por 10 minutos. Se determinó actividad fucosidasa tanto en sobrenadante como en los restos celulares.

### 5.2.6 Gel de electroforesis SDS-page

Se prepararon los siguientes reactivos:

Buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8: Se preparó Tris 1.5 M y se ajustó el pH a 8.8 con HCl.

Buffer Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8.

Acrilamida al 30 % : Acrilamida 29.2% y Bis-acrilamida 0.8%.

Persulfato de amonio (PSA): 10%

Buffer de corrida: 12 g de Trisma base, 57.6 g de glicina y 4 g de dodecil sulfato sódico (SDS). En un vial eppendor de 1.5 mL se colocó 20  $\mu$ L de extracto enzimático con una concentración aproximada de 50  $\mu$ g de proteína y 20  $\mu$ L de buffer de corrida con mercaptoetanol al 10%, se calentó a ebullición durante 5 minutos. Se tomaron 10  $\mu$ L de la mezcla anterior y se corrió en un gel de poliacrilamida (10 %) a 15 mA hasta llegar al gel de separación y subir a 20 mA. El gel se enjuagó en agua durante 5 minutos, y se reveló en azul de Coomassie durante 1 h con agitación suave.

### 5.2.7 Cuantificación de actividad enzimática de *T. marítima* recombinante

La determinación de actividad enzimática se realizó directamente en las celdas espectrofotométricas. Para la actividad  $\alpha$ -fucosidasa, se preparó una solución 3.5 mM de pNP-F en solución amortiguadora de citratos-fosfatos (50 mM/100 mM) a pH 5 y para la actividad lactasa se preparó una solución 3.5 mM de oNP-G en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7. Se tomaron 450  $\mu$ L de alguna de las dos soluciones anteriores y se adicionaron 50  $\mu$ L de extracto enzimático. Las cinéticas fueron realizadas a 60 °C, se registró la densidad óptica a  $\lambda=410$  nm cada minuto durante 1 hora. Se cuantificó la cantidad de 4-nitrofenol ó 2-nitrofenol mediante una curva patrón (**Anexo 7**).

Una unidad de fucosidasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 $\mu$ mol de fucosa del pNP-F por minuto a pH 5 y 60 °C.

Una unidad de lactasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 $\mu$ mol de galactosa del oNP-G por minuto a pH 7 y 60 °C

La actividad específica (U) fue definida como actividad enzimática por mg de proteína. La proteína fue cuantificada por el método de Bradford.

### 5.2.8 Determinación de proteína por el Método de Bradford

Para la cuantificación de proteína en el extracto enzimático, éste fue diluido 1:100 (5  $\mu$ L extracto + 495  $\mu$ L de agua destilada), se mezcló 400  $\mu$ L del extracto diluido con 100  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Se esperó de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente y se determinó la densidad óptica

a  $\lambda=595$  nm. Se elaboró una curva patrón de seroalbúmina en concentración de 0.1 a 1 mg /ml (**Anexo 8**).

### **5.2.9 Síntesis de fucosil-oligosacáridos empleando $\alpha$ -L- fucosidasa recombinante de *T. marítima***

La síntesis de fucosil-oligosacáridos se llevó a cabo a 60 °C. La mezcla de reacción contenía 1mg de pNP-F y 100, 200 ó 300 mg de lactosa disueltos en 1 mL de agua con pH ajustado a 7. Se adicionaron 50  $\mu$ L de fucosidasa de *T. marítima* (0.2 U/mL). La reacción fue monitoreada cada tres horas durante 12 h. El análisis de productos de reacción se realizó mediante HPLC con una bomba LAB Alliance (HiTech Trader, New Jersey, E. U. A) y detector Light Scattering Model 300S (Softa Corporation, Westminster Colorado, E. U. A.). Se utilizó una columna Hamilton HC 75H+, 305 x 7.75, 8  $\mu$ m (Hamilton Company, Reno Nevada, E.U.A.); la columna se mantuvo a 75 °C, y se empleó como fase móvil agua desionizada con un flujo de 0.3 mL/min. Para la identificación y cuantificación de carbohidratos se emplearon estándares externos y se determinaron los tiempos de retención. Se elaboraron curvas patrón de lactosa, glucosa, galactosa y fucosa (**Anexo 5**).

### **5.2.10 Análisis del oligosacárido mediante hidrólisis ácida**

El oligosacárido sintetizado fue purificado parcialmente mediante colectas empleando un equipo de HPLC. La muestra colectada (aproximadamente 5 mL) fue concentrado con una liofilizadora Freezone 4.5 (Labconco) y resuspendida en 500  $\mu$ L de agua desionizada.

Se tomaron 200  $\mu$ L del concentrado anterior y se ajustó el pH a 2 con la adición de ácido clorhídrico 0.5 M, posteriormente se calentó a ebullición durante 2 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla fue neutralizada con la adición de NaOH 2 M y filtrada (0.22  $\mu$ m).

Los carbohidratos obtenidos después de la hidrólisis ácida fueron identificados por HPLC.

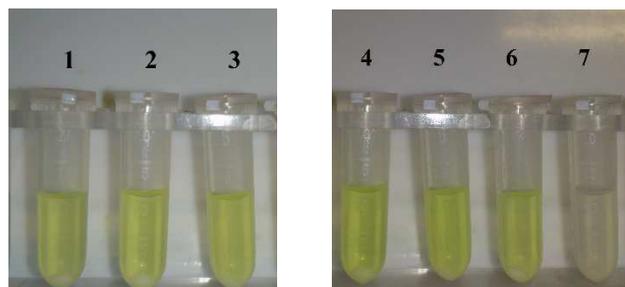
## 6 RESULTADOS

### 6.1 ESTUDIO DE FUCOSIDASAS DE LACTOBACILOS

#### 6.1.1 Prueba preliminar para la identificación de lactobacilos productores de fucosidasa

En este estudio se empleó p-nitrofenil-fucopiranososa (pNP-F) para evaluar la actividad  $\alpha$ -L-fucosidasa en diferentes bacterias. Los glucósidos de p-nitrofenol (pNP) se han empleado frecuentemente como sustratos en el estudio de actividad glicosidasa y metabolismo de carbohidratos, dado que la liberación de nitrofenol por hidrólisis enzimática es fácilmente detectada por espectrofotometría (Chadwick *et al.*, 1995; Berteau *et al.*, 2002). El pNP-F es un compuesto incoloro en solución que al ser hidrolizado por acción de la  $\alpha$ -L-fucosidasa se torna amarillo por la liberación de pNP.

En la **Figura 8** se observa que los lactobacilos estudiados dieron un resultado positivo en la prueba de identificación rápida de cepas productoras de  $\alpha$ -L-fucosidasa, ya que fueron capaces de hidrolizar el pNP-F presente en el medio de cultivo, observándose un color amarillo característico que indica la presencia de la enzima.



**Figura 8.** Prueba rápida para la identificación de cepas productoras de fucosidasa. Los tubos contienen medio mínimo y pNP-F como indicador de actividad fucosidasa, se inocularon con: *L. casei* IMAU60214 (1); *L. casei* Shirota (2), *L. rhamnosus* KLDS (3), *L. rhamnosus* GG (4), *L. helveticus* IMAU129 (5) y *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* NCFB-2772 (6), control medio sin microorganismo (7).

La prueba rápida para identificación de las cepas productoras de fucosidasa es una manera fácil de selección que permite discriminar entre varios microorganismos. Dado que en este estudio

todos los lactobacilos son productores de fucosidasa, no fue necesario eliminar ninguna cepa y se continuó con el estudio de consumo de diferentes fuentes de carbono.

Schwab y Gänzle (2001) emplearon glucósidos de o-nitrofenol (oNP) y p- nitrofenol (pNP) para estudiar la capacidad que poseen algunos lactobacilos de fermentar componentes que forman parte de los OLH, y encontraron que *Lactobacillus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri* y *Leuconostoc mesenteroides* son capaces de hidrolizar oNP-galactosa y pNP-galactosa; *L. plantarum* y *L. acidophilus* hidrolizan con mayor eficiencia pNP-fucosa. Por último, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. reuteri* exhiben mayor actividad relativa con pNP-glucosamina como sustrato. Sin embargo, la capacidad hidrolítica sobre estos sustratos no está totalmente relacionado con la asimilación de los OLH ya que su metabolismo depende de otros factores como los sistemas de transporte de carbohidratos.

### 6.1.2 Crecimiento de lactobacilos en diferentes fuentes de carbono

Como se muestra en las **Figura 9** las seis cepas de lactobacilos crecieron en los medios que contenían glucosa o galactosa como fuente de carbono. Se observó que para todas las bacterias, el crecimiento en el medio con galactosa fue significativamente menor que en el medio con glucosa ( $\alpha=0.05$ ). Por otro lado, en los medios que contenían pNP-F, L-fucosa y SFC no presentaron una diferencia significativa entre ellos ( $\alpha=0.05$ ), lo que indicó que el crecimiento en los medios con fucosa y pNP-F se debió al consumo de los sustratos presentes en el medio control (SFC) y no a las fuentes de carbono adicionadas.

El crecimiento de bacterias requiere el uso de energía proveniente del catabolismo de azúcares a ácido láctico, por lo que es necesario transportar el carbohidrato al interior de la célula. Existe tres sistemas de transporte en bacterias: el sistema de transporte fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP), el sistema de transporte primario (que acopla la translocación del azúcar a la hidrólisis de ATP) y el sistema de transporte secundario (que incluye difusión facilitada uniporte, simporte y antiporte).

El PTS es el sistema de transporte de carbohidratos más eficiente. Las tres bacterias homofermentativas estudiadas *L. casei* IMAU60214, *L. helveticus* IMAU129 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 son capaces de metabolizar glucosa dado que poseen dicho sistema para su catabolismo (PEP-glucosa-fosfotransferasa) de este modo la glucosa es

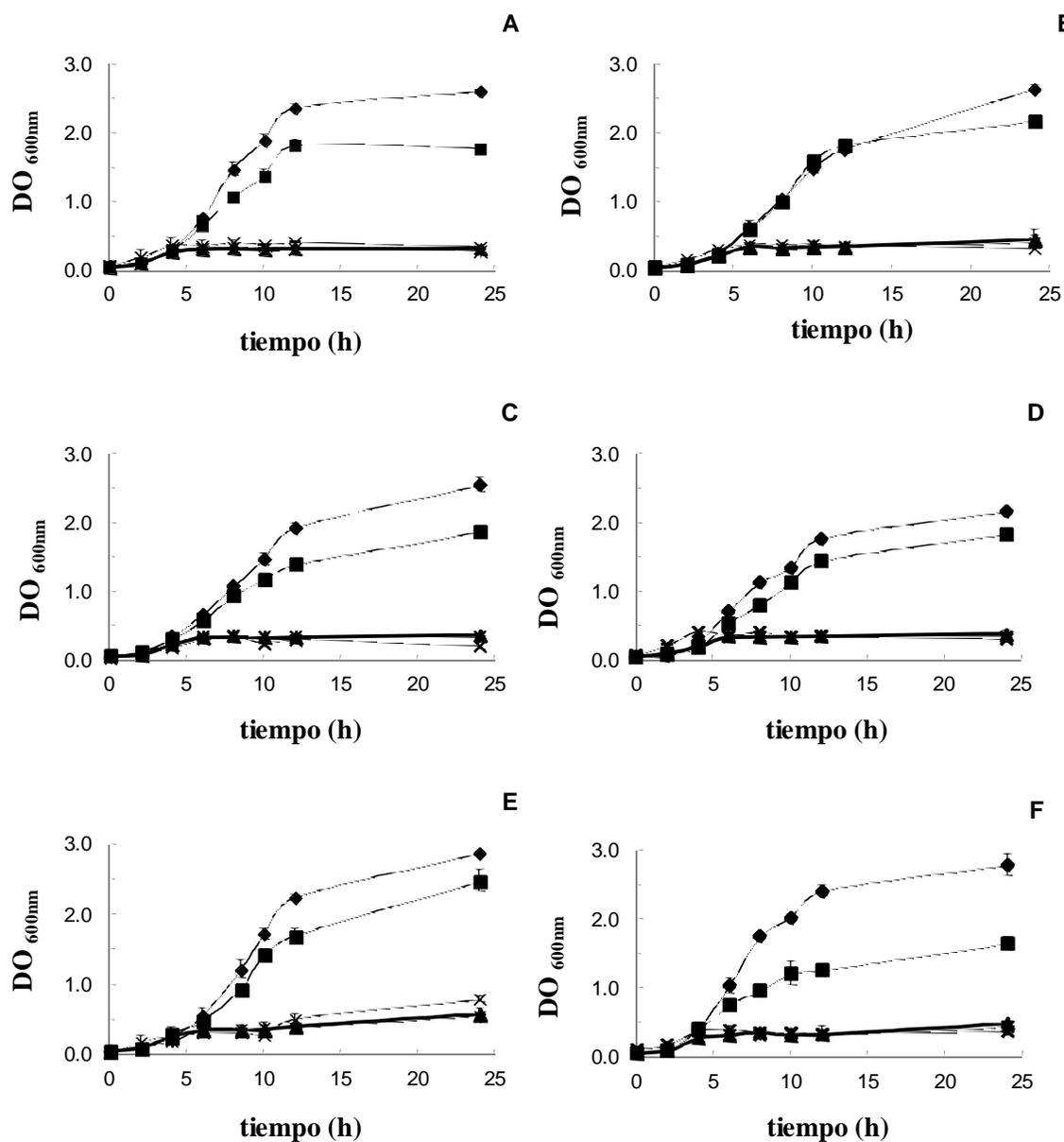
introducida al interior del microorganismo y es metabolizada obteniendo así la energía necesaria para el crecimiento (Romano *et al.*, 1979; Hickey *et al.*, 1986).

Como se muestra en las **Figuras 9A, 9B y 9F**, el crecimiento en medio con glucosa para *L. casei* IMAU 60214 presentó un incremento en la densidad óptica (D.O<sub>600</sub>) de 0.05 hasta 2.62, *L. casei* Shirota, hasta 2.65 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 hasta 2.88.

En el caso del metabolismo de galactosa, Hickey *et al.* (1986) reportaron que *L. helveticus* tiene la capacidad de metabolizar la fracción galactosa de la lactosa cuando está en exceso. En este estudio se observó que *L. helveticus* IMAU129 fué capaz de crecer a expensas de galactosa libre (**Figura 9E**) ya que después de 24 h de incubación el caldo de fermentación alcanzó una D.O<sub>600</sub> de 2.4. En este tiempo se encontró el máximo crecimiento con respecto a los demás microorganismos estudiados.

Zourari *et al.* (1992), reportaron que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es capaz de consumir galactosa únicamente cuando el medio está limitado en fuente de carbono y transporta la galactosa mediante permeasas empleando la vía Leloir para metabolizarla, dichos resultados coinciden con lo obtenido con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 en este trabajo (**Figura. 9F**). Por otra parte, se ha reportado que *L. casei* y *L. rhamnosus* poseen la capacidad de metabolizar galactosa, sin embargo, estas bacterias pueden emplear tanto la vía D-tagatosa-6-fosfato como la vía Leloir (Chassy y Thompson, 1983; Tsai y Lin, 2006).

Las **Figuras 9C y 9D** muestran que tanto *L. rhamnosus* KLDS como *L. rhamnosus* GG presentaron un crecimiento similar en medio con galactosa. Estas alcanzaron una D.O<sub>600</sub> de 1.8, mientras que *L. casei* IMAU60214 mostró un valor de D.O<sub>600</sub> de 1.7 a esta mismo longitud de onda. Por otro lado *L. casei* Shirota tuvo el mayor crecimiento con una D. O<sub>600</sub> de 2.1 unidades de absorbancia.



**Figura 9.** Curvas de crecimiento de lactobacilos en diferentes fuentes de carbono: D-glucosa (◆); D-galactosa (■); L-fucosa (▲); pNP-F (×); SFC (\*).

*L. casei* IMAU 60214 (A); *L. casei* Shirota (B); *L. rhamnosus* GG (C); *L. rhamnosus* KLDS (D); *L. helveticus* IMAU70129 (E); *L. delbruekii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 (F).

En contraste Schwab y Gänzle (2011) estudiaron la capacidad de seis bacterias ácido lácticas (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Streptococcus thermophilus* y *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*) para crecer en medios adicionados con

carbohidratos que forman parte de los OLH (lactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y fucosa). Ellos encontraron que tanto las bacterias heterofermentativas como las homofermentativas utilizan la N-acetilglucosamina a través de la vía de Embden-Meyerhof, mientras que la glucosa se metaboliza a través de la vía fosfocetolasa en las bacterias heterofermentativas. Además, reportaron que la lactosa y la glucosa son los carbohidratos que prefieren utilizar las bacterias para crecer. Por otro lado no observaron crecimiento en los medios que contenían fucosa como sustrato para ninguna bacteria.

Estas observaciones coinciden con lo obtenido en este estudio para las seis cepas de lactobacilos estudiadas, es decir todas las cepas presentaron un mayor crecimiento en el medio que contenía glucosa como sustrato y ninguna de ellas presentó habilidad de crecer en el medio con fucosa. En general los lactobacilos presentan una baja capacidad hidrolítica que les limita el consumo de OLH de mayor tamaño, probablemente se deba a que los oligosacáridos, no pueden ser transportados al citoplasma para ser metabolizados ya que normalmente no cuentan con sistema de transporte para oligosacáridos (Schwab y Gänzle, 2011).

### 6.1.3 Consumo de fuentes de carbono

Los resultados de los estudios sobre el consumo de fuentes de carbono, indicaron que las seis cepas de lactobacilos estudiadas tuvieron una asimilación total de glucosa y galactosa a las 24 horas de fermentación. Estos resultados fueron similares a lo observado por Schwab y Gänzle (2011) quienes encontraron que algunos lactobacilos intestinales tienen la capacidad de consumir parcialmente o completamente glucosa (40-100%).

Por otro lado, se observó que el medio que contenía pNP-F presentaba L-fucosa libre después de 24 h (ver tabla \*), liberada como consecuencia de la acción enzimática. Y se comprobó por cromatografía (HPLC) que toda la fucosa liberada permaneció en el medio de fermentación sin ser consumida. De la misma manera, el medio que contenía L-fucosa como fuente de carbono, no sufrió cambio en su concentración. Estos resultados, comprueban que los lactobacilos estudiados no metabolizan la L-fucosa bajo las condiciones de crecimiento empleadas (**Tabla 10**). Adicionalmente, estos datos coinciden con lo reportado por Rodríguez-Díaz *et al.* (2012) quienes observaron que *L. casei* BL23 no asimila la L-fucosa liberada como producto del

metabolismo de fucosil  $\alpha$  (1-3)-N-acetilglucosamina si no que la excreta al medio de fermentación.

Sin embargo, algunas bacterias lácticas como *L. plantarum* y *L. acidophilus* tienen la capacidad de metabolizar hasta un 5% de fucosa cuando esta es empleada como fuente de carbono (Schwab y Gänzle, 2011).

Por otro lado, los lactobacilos presentan capacidad selectiva sobre los sustratos. Se ha reportado que *L. casei* BL23 no tiene la capacidad de metabolizar los siguientes fucosil-oligosacáridos: el disacárido antígeno H, el trisacárido antígeno H tipo II, 2' fucosil-lactosa, 3' fucosil-lactosa, trisacárido Lewis X, trisacárido Lewis a, trisacárido Lewis b, fucosil  $\alpha$  (1-3)-N-acetilglucosamina, fucosil  $\alpha$  (1-4)-N-acetilglucosamina, fucosil  $\alpha$  (1-6)-N-acetilglucosamina y fucosil  $\alpha$  (1-4) galactosa (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012).

**Tabla 10.** Consumo de glucosa, galactosa, fucosa (todas a 10 g/L) y pNP-F (5 g/ L) durante el crecimiento de BAL a 37 °C por 24 h.

Bacterias	Glucosa (g/L)	Galactosa (g/L)	Fucosa (g/L)	pNP-F* (g/L)
<i>L. casei</i> IMAU 60214	10	10	0	0.22
<i>L. casei</i> Shirota	10	10	0	0.15
<i>L. rhamnosus</i> GG	10	10	0	0.17
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	10	10	0	0
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	10	10	0	0.41
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> NCFB-2772	10	10	0	NC

(\*) fucosa liberada durante la fermentación; NC: no cuantificada

Ward *et al.* (2007) estudiaron el catabolismo y la fermentación de OLH de diferentes bifidobacterias, las cuales también son bacterias colónicas. Ellos demostraron que estos microorganismos también son capaces de metabolizar glucosa y galactosa. Adicionalmente se ha reportado que *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *Bifidobacterium breve* pueden fermentar glucosamina, L- fucosa y ácido siálico. Esto puede representar algunas ventajas sobre cepas intestinales que carecen de esta misma habilidad (Ward *et al.*, 2007).

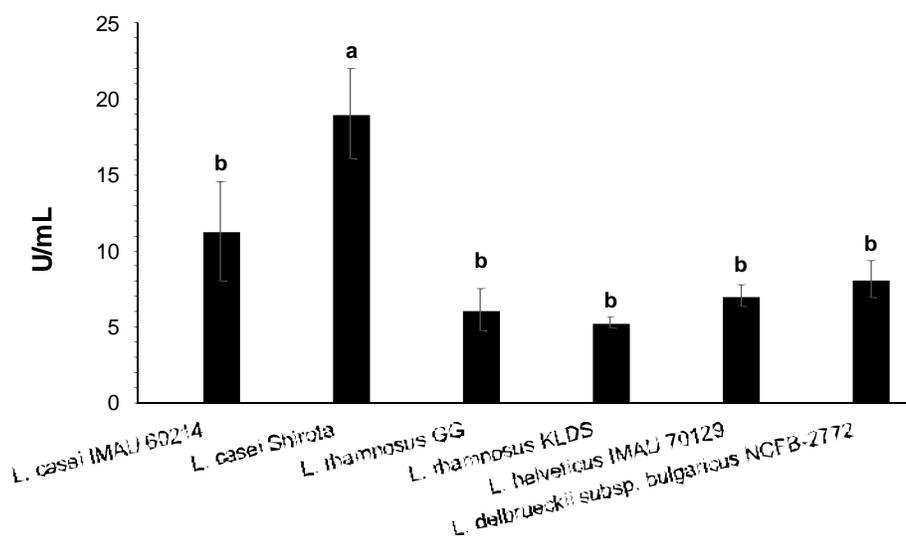
En contraste, el metabolismo de carbohidratos complejos refleja que ciertas bacterias colónicas tienen la capacidad de sintetizar enzimas como las  $\alpha$ -L-fucosidasas, las cuales a su vez ayudan

a la liberación y asimilación de sustratos más simples como los monosacáridos (Pokusaeva *et al.*, 2011).

#### 6.1.4 Cuantificación de actividad fucosidasa en lactobacilos

La fucosidasa extracelular fue cuantificada en los sobrenadantes obtenidos de las fermentaciones de las seis cepas de lactobacilos. Solamente los medios con pNP-F mostraron actividad de fucosidasa (**Figura 10**), siendo *L. casei* Shirota la que presentó la actividad significativamente más grande ( $\alpha=0.05$ ). Sin embargo, estudios posteriores de conteo de células viables mostraron que la actividad cuantificada se debió a la liberación de la fucosidasa por el proceso de lisis por muerte celular (datos no mostrados).

Hasta el momento no existen estudios previos que reporten síntesis de fucosidasas extracelulares en lactobacilos, pero los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Rodríguez-Díaz *et al.* (2011). Estos autores observaron que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *L. casei* BL23 no es una enzima extracelular porque carece de una secuencia N-terminal que permita que la enzima sea secretada como en el caso de bifidobacterias. Katayama *et al.* (2004) reportaron que *B. infantis* y *B. bifidum* son capaces de producir L-fucosidasas que se encuentran ancladas a su membrana celular con una región extracelular.



**Figura 10.** Fucosidasa extracelular producida en medio con pNP-F por diferentes lactobacilos

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa

Los lactobacilos estudiados produjeron  $\alpha$ -L-fucosidasa asociada a la célula (**Figura 11**). Cuando las bacterias ácido lácticas son crecidas en el medio con glucosa (**Figura 11A**) se observa que cinco de los lactobacilos no presentaron diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) en la actividad fucosidasa entre ellos, mientras que para *L. casei* Shirota se obtuvo la menor actividad enzimática (21 mU/mg). Por otro lado, cuando los lactobacilos fueron propagados en medio con galactosa (**Figura 11B**), no hubo diferencia significativa entre las actividades cuantificadas de los seis lactobacilos.

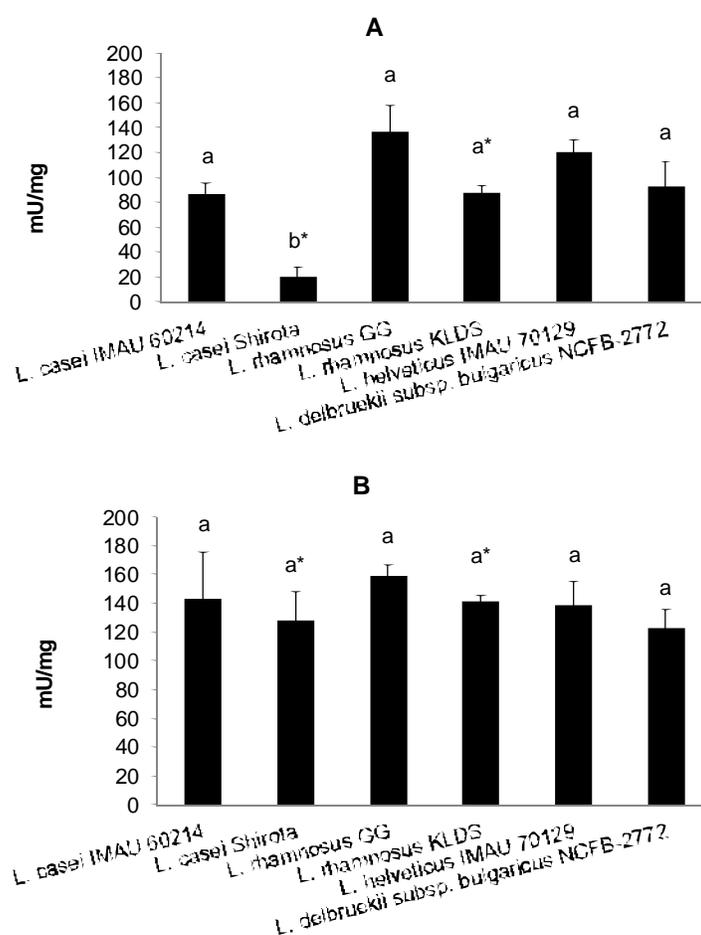
Al realizar la comparación para cada bacteria en ambos medios de cultivo (**Figura 11A y 11B**), se observó que *L. casei* Shirota y *L. rhamnosus* KLDS expresaron mayor actividad fucosidasa cuando eran propagadas en medios con galactosa (129 mU/mg y 142 mU/mg respectivamente) que en aquellos con glucosa (21 mU/mg y 88 mU/mg respectivamente). Estos resultados muestran que las enzimas producidas pueden ser constitutivas, por el hecho de que se encontró actividad en ambos medios enriquecidos con las dos fuentes de carbono.

En otro sentido, la habilidad de algunas bacterias intestinales para hidrolizar residuos de L-fucosa asociados a los fucooligosacáridos, juega un rol muy importante en su adaptación y sobrevivencia. Sin embargo, hasta ahora solo existía un reporte sobre  $\alpha$ -L-fucosidasas en lactobacilos, dado que el análisis del genoma de 25 especies de *Lactobacillus* revelaba que únicamente *L. casei* y *L. rhamnosus* codifican posibles  $\alpha$ -L-fucosidasas (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011). Por el contrario, los resultados obtenidos en nuestro estudio revelan que existe un número mayor de lactobacilos que presentan actividad fucosidasa. Además queda demostrado que esta actividad fucosidasa es expresada durante la fermentación. Esta última acción provee, a los lactobacilos estudiados, de herramientas necesarias para utilizar los OLH como sustrato fermentable, lo cual le confiere una ventaja sobre otras bacterias colónicas y pone aún más en evidencia la capacidad prebiótica de estos componentes de la leche.

Como ya se mencionó anteriormente, las bacterias ácido lácticas estudiadas no fueron capaces de metabolizar la fucosa liberada del pNP-F, sabemos que al encontrarse este carbohidrato en la parte “más expuesta” de los OLH, es indispensable el uso de fucosidasas para acceder a los carbohidratos que si son metabolizados por los lactobacilos. Por lo tanto, es probable que estas bacterias necesiten hidrolizar los fucosil-oligosacáridos al interior de la célula para

metabolizarlos, lo que concuerda con la preferencia de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *L. casei* BL23 de hidrolizar oligosacáridos pequeños (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011).

Tal vez la baja capacidad hidrolítica que se encontró se debe a que existe una cooperación (comensalismo) con otras bacterias colónicas, que también presenten actividad fucosidasa además de otras actividades y esto probablemente facilite metabolizar los oligosacáridos más complejos. Además los pocos sistemas de transporte para oligosacáridos que se conocen en lactobacilos limitan el número y tamaño de OLH que pueden atravesar la pared celular para poder ser metabolizado.



**Figura 11.** Fucosidasa asociada a la célula producida por lactobacilos empleando glucosa (A) y galactosa (B) como fuente de carbono.

Letras diferentes indican que existe diferencia significativa en la misma fuente de carbono.

(\*) Significa diferencia significativa de un mismo lactobacilo entre fuentes de carbono.

Hasta ahora, dentro del género lactobacilos, únicamente se han identificado tres posibles  $\alpha$ -L-fucosidasas (AlfA, AlfB y AlfC) que están codificadas en el genoma de *L. casei* BL23. Estas fueron clonadas y caracterizadas cinéticamente. Las fucosidasas presentan diferentes especificidades para hidrolizar fucosil-oligosacáridos: la AlfA hidroliza únicamente 6'fucosil-glucosamina, la AlfB hidroliza el antígeno H disacárido (fucosa  $\alpha$  (1-2) galactosa), el antígeno H tipo II trisacárido (fucosa  $\alpha$  (1-2) galactosa  $\beta$  (1-4) glucosamina), 2'fucosil-lactosa, 3'fucosil-glucosamina, 4'fucosil-glucosamina, la AlfC hidroliza 6'fucosil-glucosamina, 3'fucosil-glucosamina y 4'fucosil-glucosamina. Además, la carencia de una secuencia N-terminal reconocible para la secreción, indica que estas enzimas son intracelulares (Rodríguez-Díaz *et al.* 2011). Similar a lo que ocurren en *Bifidobacterium longum sp. infantis* que posee cuatro posibles  $\alpha$ -fucosidasas, 3 del grupo de las GH29 y una del grupo de las GH95, todas intracelulares (Sela *et al.*, 2008).

Por otro lado, la  $\alpha$ -L-fucosidasasa de *L. casei* IMAU 60214, *L. casei* Shirota, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* KLDS, *L. helveticus* IMAU70129 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* así como las tres enzimas de *L. casei* BL23 tienen la capacidad de hidrolizar el sustrato sintético pNP-F, capacidad que algunas fucosidasas de otros géneros de bacterias intestinales como: la  $\alpha$  (1-2) y  $\alpha$  (1-3/4) fucosidasa de *B. bifidum* y la  $\alpha$  (1-2) fucosidasa de *Clostridium perfringens* no poseen (Aminoff and Furukawa, 1970; Katayama *et al.*, 2004; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2011).

Dado que la fucosidasa producida por los seis lactobacilos estudiados tiene la capacidad de hidrolizar el pNP-F, probablemente estas enzimas pertenezcan al grupo E.C.3.2.1.51 y por tanto a la familia de las glicosil hidrolasa GH29. Esto, relacionado en base a que enzimas como,  $\alpha$  (1-3/4) fucosidasa de *Streptomyces sp.*,  $\alpha$  (1-4) fucosidasa de *Arabidopsis thaliana*,  $\alpha$  (1-2) fucosidasa de *Aspergillus niger*,  $\alpha$  (1-2) fucosidasa de *Streptococcus sanguis*,  $\alpha$  (1-6) fucosidasa de *Aspergillus niger*,  $\alpha$  (1-2/3/4) fucosidasa de *Bacillus circulans*,  $\alpha$  (1-2) fucosidasa de *Bacillus sp.*,  $\alpha$  (1-2) fucosidasa de *Bacillus cereus*,  $\alpha$  (1-2) fucosidasa de *Bacillus fulminans*, pertenecientes a los grupos E.C.3.2.1.63, E.C.3.2.1.111 y E.C.3.2.1.127 no poseen esta capacidad (Bahl, 1970; Shizukuishi *et al.*, 1978; Sano *et al.*, 1992; Miura *et al.*, 2005; Tsuji and Yamamoto, 1990).

En otro sentido, la actividad hidrolítica sobre pNP-F ha sido empleada en la cuantificación de fucosidasas del grupo E.C.3.2.1.51. Ejemplo de ellas es la fucosidasa de *Bacteroides fragilis*,

*Bacillus circulans*, *Pectern maximus*, *Solfolobus solfataricus*, *Bus taurus*, *Dietyostelium discoideum*, *Pomace canaliculata* y *Thermotoga marítima* (Cobucci-Ponzano *et al.*, 2003; Berteau *et al.*, 2002; Tsuji and Yamamoto, 1990; Schopohl *et al.*, 1992; Tarling *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 1980).

### 6.1.5 Localización de $\alpha$ -L-fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

En la sección anterior se encontró que las seis bacterias analizadas poseen  $\alpha$ -L-fucosidasa asociada a la célula, sin embargo, para el estudio de localización de la enzima, se eligió a *L. rhamnosus* GG ya que es el microorganismo que presentó la máxima actividad cuando fue crecido en el medio que contenía glucosa (137  $\mu$ U/mg).

*L. rhamnosus* GG fue sometido a diferentes tratamientos enzimáticos para eliminar la pared celular bacteriana como primer paso en la localización de  $\alpha$ -L-fucosidasa. En todos los tratamientos se empleó lisozima (EC3.2.1.17) también conocida como muramidasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$  (1-4) entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina de la pared celular de las bacterias.

En los tratamientos T1, T2, T3 y T7 se empleó lisozima en combinación con tripsina, una enzima capaz de romper la cadena de pentapéptidos de la pared celular en el lado carboxilo del aminoácido lisina. Esto se realizó debido a que en trabajos previos se ha reportado que la pared celular de bacterias resistentes a lisozima pueden ser susceptibles a la acción de esta enzima cuando se encuentran en el medio, lisozima y tripsina (Neujahr *et al.*, 1973).

En el tratamiento T6\* se empleó el EDTA como inhibidor de proteasas con la finalidad de evitar que la  $\alpha$ -L-fucosidasa fuera degradada una vez que la bacterias fueron lisadas.

En el tratamiento T9 se empleó mutanolisina ya que a pesar de que las células Gram-positivas como *L. rhamnosus* GG son bastante susceptibles a la lisozima por su alta proporción de peptidoglicano, algunas pueden ser resistente a causa de una estructura de peptidoglicano modificado. Sin embargo, estas bacterias frecuentemente son sensibles a la acción de la mutanolisina (una muramidasa de *Streptomyces globisporus*) que rompe enlaces N-acetilmuramil- $\beta$ -(1-4)-N-acetilglucosamina. La mutanolisina y la lisozima se han utilizado ocasionalmente juntas para la lisis de *Listeria* y otras bacterias Gram-positivas tales como *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

Los resultados mostrados en la **Tabla 11** indican que el tratamiento T4 fue el que presentó mayor actividad muramidasa (6.75 U), en contraste con el T1 que fue el de menor actividad muramidasa. Además, se encontró que la mayoría de los tratamientos líticos eliminan en un periodo de 3 h la pared celular bacteriana, lo cual se observa como una disminución en la densidad óptica de la suspensión celular.

**Tabla 11.** Determinación de actividad muramidasa (3 h) para evaluar la lisis de la pared celular de *L. rhamnosus* GG.

Tratamientos	Enzima empleadas**	Vo -(D.O <sub>450</sub> /min)	Actividad muramidasa (U)
T1	Lisozima, Tripsina	0.0005	0.4
T2	Lisozima, Tripsina	0.0011	1.12
T3	Lisozima, Tripsina	0.0038	3.84
T4	Lisozima	0.0068	<b>6.75</b>
T5	Lisozima	0.0018	1.81
T6*	Lisozima	0.0049	4.9
T7	Lisozima, Tripsina	0.0038	3.84
T8	Lisozima, Proteinase K	0.0059	5.91
T9	Lisozima, Mutanolisina	0.0029	2.86

Vo; Velocidad inicial; \*ácido etildiaminotetraacético (EDTA); \*\* Las condiciones se describen en metodología.

Ahora bien, otro parámetro que se consideró para la selección del tratamiento lítico fue la actividad lactasa en las células lisadas (restos celulares) y en el sobrenadante. Esto se determinó como prueba del rompimiento celular ya que la lactasa es intracelular en bacterias como, *L. acidophilus* JCM1132, *L. casei* JCM1134, *L. crispatus* MEP181R55, *L. fermentum* MEP181R57, *L. mucosae* OLL2848, *L. plantarum* MEP181R86, *L. delbrueckii sp. bulgaricus* NIAI B-6 y *B. bifidum* (Moller *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2006; Honda *et al.*, 2007).

Como se muestra en la **Tabla 12** los tratamientos T1, T2, T4, T5 y T7 mostraron actividad lactasa únicamente en la fracción que contenía restos celulares. En el caso del tratamiento T6\* no se encontró actividad en ninguna fracción lo que indica que el EDTA empleado en el tratamiento inhibió la actividad de la lactasa. Esto coincide con lo reportado para *L. reuteri* L461, *L. plantarum* WCFS1 y *L. delbrueckii* en donde la enzima se inhibe (Nguyen *et al.*, 2006; Rhimi *et al.*, 2009; Iqbal *et al.*, 2010).

No obstante, en el tratamiento T8 donde se empleó proteínasa K (E.C.3.4.21.64), se observó una menor actividad de lactasa en los restos celulares comparado con el control, lo que indica que la proteínasa K hidrolizó parte de la lactasa de *L. rhamnosus* GG. Esta enzima es una serin proteasa de amplio espectro capaz de romper enlaces peptídicos adyacentes al grupo carboxilo en aminoácidos alifáticos y aromáticos.

En el caso de los tratamientos T3 y T9, estos presentaron actividad de lactasa en sus sobrenadantes, sin embargo, se observó una mayor actividad enzimática en los restos celulares.

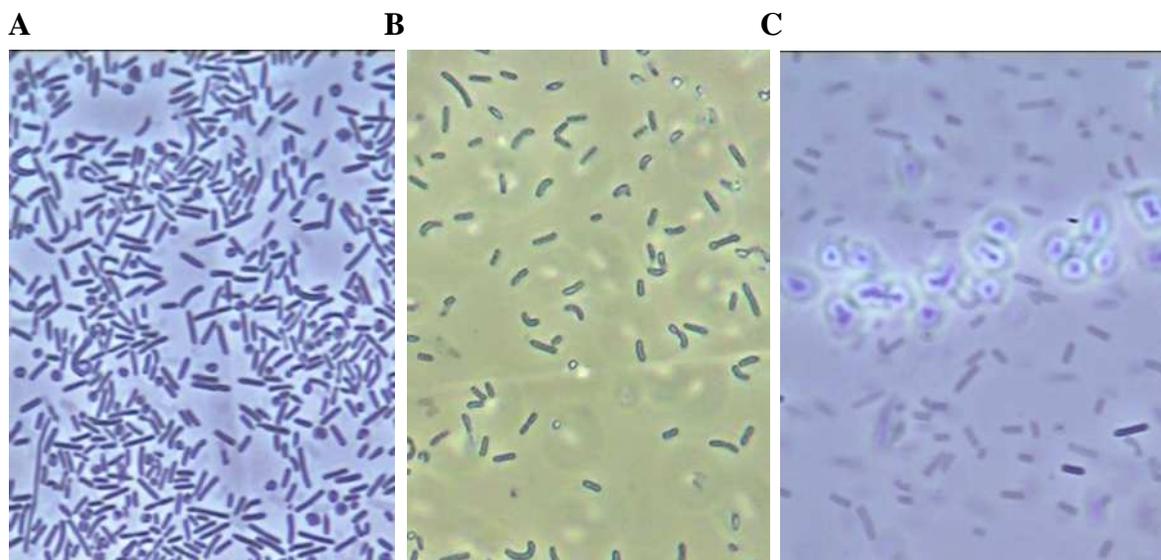
**Tabla 12.** Actividad lactasa como medida de la eficiencia de la lisis de la pared celular de *L. rhamnosus* GG con diferentes tratamientos.

Fracción	Actividad lactasa		Actividad lactasa en células tratadas con enzimas líticas								
			T1	T2	T3	T4	T5	T6*	T7	T8	T9
	Control										
Células enteras	++	Restos celulares	++	++	++	++	++	-	++	+	++
Sobrenadante	-	sobrenadante	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Con estos resultados, se eligió el T9 para continuar con el estudio de la localización de la fucosidasa en *L. rhamnosus* GG. Esta decisión fue debido a que en este se emplearon menores concentraciones de las enzimas líticas. Además se combinó con una serie de separaciones progresivas y observaciones en el microscopio de contraste de fases (Cort *et al.*, 1994; Mahajan *et al.*, 2012).

En la **Figura 12** se muestra el cambio en la fisiología de *L. rhamnosus* GG al someterse al tratamiento T9. Antes de ser sometida a la acción de las enzimas líticas, la bacteria se observa como bastones cortos con un color oscuro uniforme en toda la superficie (**Figura 12A**). Una vez que se ha expuesto a la acción combinada de lisozima y mutanolisina, la pared celular ha sido degradada, lo que permite mayor paso de la luz en el microscopio de contraste de fases. La bacteria se observa con un contorno oscuro definido, pero el centro se ve mucho más claro (**Figura 12B**). Después del choque hipotónico la bacteria “estalla” por la presión osmótica, pierde la forma redondeada de los extremos y se observa con una forma rectangular, al dejar salir el material contenido en el interior, permite mayor paso de la luz del microscopio de contraste de fases y se ven mucho más claras (**Figura 12C**).

**Figura 12.** Fotos tomadas en el microscopio de contraste de fases: (A) células sin tratamiento; (B) células tratadas con enzimas líticas (lisozima y mutanolisina); (C) células rotas por choque hipotónico (C).



**Figura 13.** Fotos tomadas en el microscopio de contraste de fases: (A) células sin tratamiento; (B) células tratadas con enzimas líticas (lisozima y mutanolisina); (C) células rotas por choque hipotónico (C).

En la **Tabla 13** se reporta la actividad fucosidasa de las fracciones celulares obtenidas en el proceso de lisis de *L. rhamnosus* GG con el tratamiento lítico. Como se puede observar solo se obtuvo actividad fucosidasa en la fracción que contenía las membranas celulares. Lo que nos sugiere que la fucosidasa de *L. rhamnosus* GG está unida a la membrana, similar a lo observado para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *B. bifidum* (Katayama *et al.*, 2004).

**Tabla 13. Localización de la fucosidasa de *L. rhamnosus* GG**

Actividad fucosidasa en las fracciones celulares				
Espacio periplásmico	Pared celular	Membrana celular	Citoplasma	Control
-	-	+	-	-

(-) no detectada; (+) detectada.

Los resultados anteriores coinciden con los trabajos realizados en este equipo de trabajo, donde se ha intentado extraer la fucosidasa de *Lactobacillus* por métodos mecánicos de disrupción celular. Se ha encontrado que la fracción que posee actividad fucosidasa es la fracción que contiene restos celulares y no la fracción con sobrenadante (Barrón-Álvarez, 2013).

#### 6.1.6 Liberación de fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG

Experimentos previos durante esta investigación, mostraron que *L. rhamnosus* GG es capaz de liberar la fucosidasa al medio cuando se propaga en presencia de pNP-F.

En la **Tabla 14** se muestra que en el medio MRS y en el medio mínimo, no hubo actividad fucosidasa en el sobrenadante después de 48 h de fermentación, sin embargo, si hubo actividad de fucosidasa asociada a la célula. Sin embargo, si al medio se le adiciona pNP-F (medio mínimo-pNP-F) observamos que se detecta actividad fucosidasa tanto en el sobrenadante como asociada a la célula. Estos resultados son muy interesantes porque nos indican que el pNP-F debe estar cubriendo alguna función que ayuda a la liberación de la enzima.

**Tabla 14.** Fucosidasa de *L. rhamnosus* GG en diferentes medios a 48 h de crecimiento

Medio de cultivo	Actividad fucosidasa	
	Sobrenadante (mU/mL)	Asociada a célula (mU/mg)
MRS	0	150
Mínimo	0	180
Mínimo-pNP-F	30	120

La actividad  $\beta$ -galactosidasa también fue cuantificada en el sobrenadante del medio mínimo-pNP-F para determinar la presencia de esta enzima. Se observó una actividad de lactasa de 100 mU/mL. Estos resultados son importantes ya que se debe considerar que, cuando se emplee el extracto enzimático para las reacciones de síntesis, la lactasa puede hidrolizar la lactosa así como sintetizar galactooligosacáridos (Splechna *et al.*, 2001; Splechna *et al.*, 2007).

El sobrenadante obtenido de la fermentación en el medio mínimo- pNP-F, se reservó para usarlo como extracto enzimático en la síntesis de fucosil-oligosacáridos.

### 6.1.7 Síntesis de fucosil-oligosacáridos empleando $\alpha$ -L- fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG

Una vez obtenido un extracto enzimático con fucosidasa, este se empleó para buscar las condiciones cinéticas que permitieran la síntesis de fucosil-oligosacáridos.

Se estudió el empleo de diferentes sustratos que sirvieran como aceptores en la reacciones de transfucosilación. Como se muestra en la **Tabla 15**, de las reacciones enzimáticas ensayadas únicamente se llevó a cabo la transglicosilación en las reacciones que contenían lactosa o lactulosa como sustrato aceptor. El rendimiento obtenido para estas reacciones fue de 21 y 25 % respectivamente. Los rendimientos son comparables con los reportados previamente Ajisaka and Shirakabe (1992) para la fucosidasa de *Corynebacterium* sp. cuando se emplearon  $\beta$ -D-GalOMe (25 %) y D-Gal (18%) como sustrato aceptor.

**Tabla 15.** Concentración y rendimiento de oligosacáridos obtenidos en la reacción de transfucosilación empleando el extracto enzimático de *L. rhamnosus* GG

Sustrato Aceptor	Concentración de oligosacárido sintetizado ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Rendimiento* (%)
Lactosa	0.75	21
Lactulosa	1.16	25
Galactosa	0	0
Sacarosa	0	0

Condiciones de reacción: 1 mg/mL de pNP-F como donador y 200 mg/mL de cada sustrato aceptor a 37 ° C y 24 h de reacción.

Por otra parte, la capacidad transferasa de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *L. casei* BL23 fue reportada recientemente por Rodríguez-Díaz *et al.* (2013). Ellos encontraron que la  $\alpha$ -L fucosidasa AlfB de *L. casei* BL23, es capaz de sintetizar fucosil- $\alpha$ -(1-3)-N-acetilglucosamina con un rendimiento de 23 % y un 56% de rendimiento para la  $\alpha$ -L-fucosidasas AlfC que sintetiza fucosil- $\alpha$ - (1-6)-N-acetilglucosamina. En ambos casos únicamente se obtuvieron los disacáridos junto con los productos de hidrólisis sin que se obtuvieran subproductos de reacción.

Los estudios realizados por Farkas *et al.* (2000) muestran la capacidad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Penicillium multicolor* para transferir la L-fucosa de los sustratos donadores pNP-F y  $\alpha$ -L-fucopiranosil fluorida a diferentes aceptores y obtuvieron que la enzima sintetizó oligosacáridos con enlace  $\alpha$  (1-3), el máximo rendimiento fue de 34 %. Además Ajisaka y Shirakabe (1992)

reportaron la síntesis regioselectiva de disacáridos con enlaces fucosil  $\alpha$  (1-2),  $\alpha$  (1-3) y  $\alpha$  (1-6) cuando se emplean  $\alpha$ -L-fucosidasas de diferentes orígenes. Ellos sintetizaron 3-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil-D-glucosa usando  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Aspergillus niger* con un rendimiento de 61%; 2-Acetamido-2-deoxy-3-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil-D-glucosa empleando  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Aspergillus niger* con un rendimiento de 58%; Metil-2-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil-D-glucosa usando  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Corynebacterium sp.* con un rendimiento de 25%; 2-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil-D-galactosa con un rendimiento de 18 % y Metil-6-O- $\alpha$ -L-fucopiranosil- $\beta$ -D-galactopiranosido empleando  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Ampullaria* con un rendimiento de 14 %.

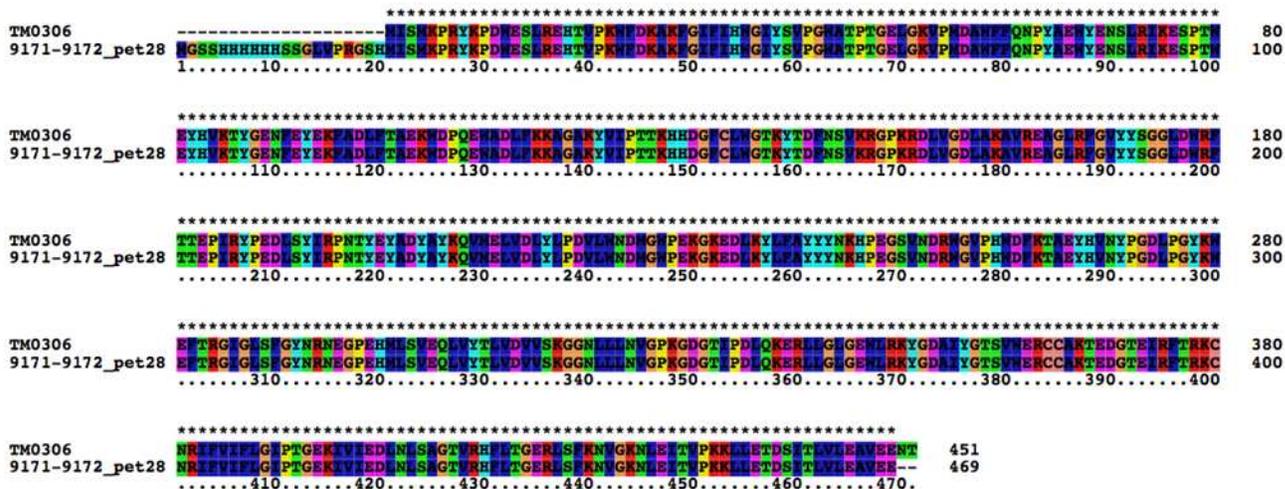
Por otro lado, cuando se emplea galactosa como sustrato donador, no hubo reacción de transfucosilación ni de hidrólisis. Se observó que al final de la incubación la mezcla de reacción permaneció incolora al no liberarse el pNP por acción enzimática. Los únicos reportes que indican la capacidad inhibitoria de la galactosa para fucosidasa (E.C.3.2.1.51) son para la fucosidasa de jabalí y de molusco (Reglero y Cabezas, 1976; Grove y Serif, 1981).

En el caso del empleo de sacarosa como sustrato aceptor no generó formación de oligosacáridos, lo que indica la preferencia de la  $\alpha$ -L-fucosidasa por el sustrato aceptor. Algunas fucosidasas se comportan de manera similar a las de este estudio, como muestra la investigación realizada por Ajisaka y Shirakabe (1992), donde la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Aspergillus niger* presenta actividad transferasa sobre glucosa y glucosamina como sustratos aceptores, pero no transfiere fucosa si se cambia el aceptor por metil- $\beta$ -D-galactopiranosido. De igual manera, en este mismo reporte, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Corynebacterium sp.* no mostró actividad de transglicosilación cuando se utilizó D-glucosa o glucosamina como un aceptor. Caso contrario se observa cuando se al usar galactosa, lo que indica que cada enzima tiene una especificidad por el sustrato aceptor.

## 6.2 ESTUDIO DE $\alpha$ -L-FUCOSIDASA DE *Thermotoga marítima* RECOMBINANTE

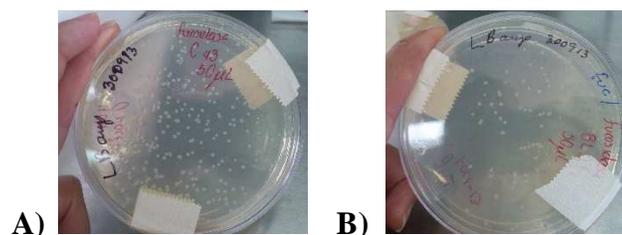
### 6.2.1 Clonación de fucosidasa de *T. marítima* en *E. coli*

En la **Figura 13** se muestra el alineamiento de aminoácidos de la fucosidasa de *T. marítima* (TM0306) y la fucosidasa obtenida con el plásmido pET 28. Se puede observar que la secuencia de aminoácidos para ambas enzimas es idéntica.



**Figura 14.** Alineamiento de aminoácidos del gen de la  $\alpha$ -L fucosidasa de *T. marítima* (TM306) y la  $\alpha$ -L fucosidasa recombinante.

En la **Figura 14** se muestran las colonias de *E. coli* transformada. Como se puede observar tanto *E. coli* C43 (**Figura 14A**) como *E. coli* BL21 (**Figura 14B**) presentaron colonias bien definidas y diferenciadas lo cual indica que estas bacterias poseen resistencia a la penicilina que es parte de la construcción del plásmido junto con el gen TM306 (fucosidasa).

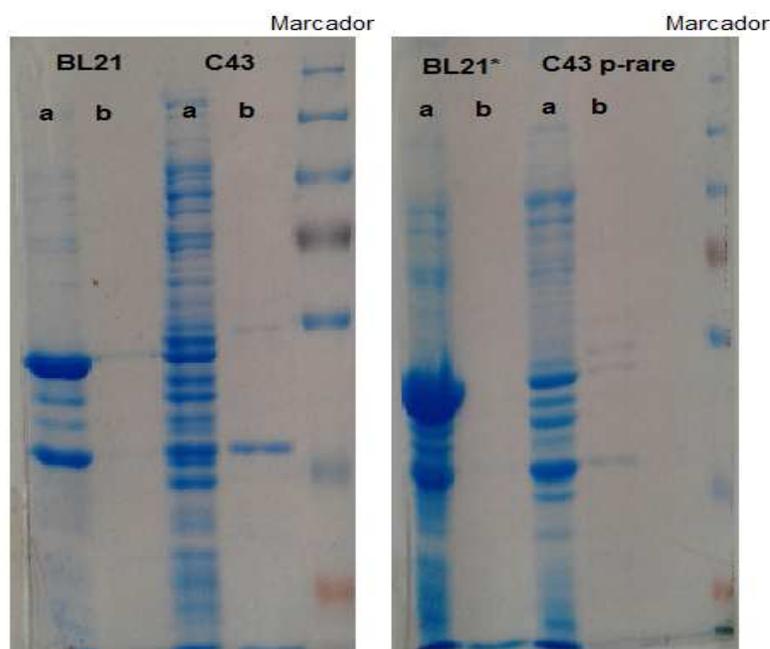


**Figura 15.** Células transformadas de *E. coli* C43 (A) y *E. coli* BL21 (B).

### 6.2.2 Expresión de la fucosidasa de *T. marítima* en *Escherichia coli*.

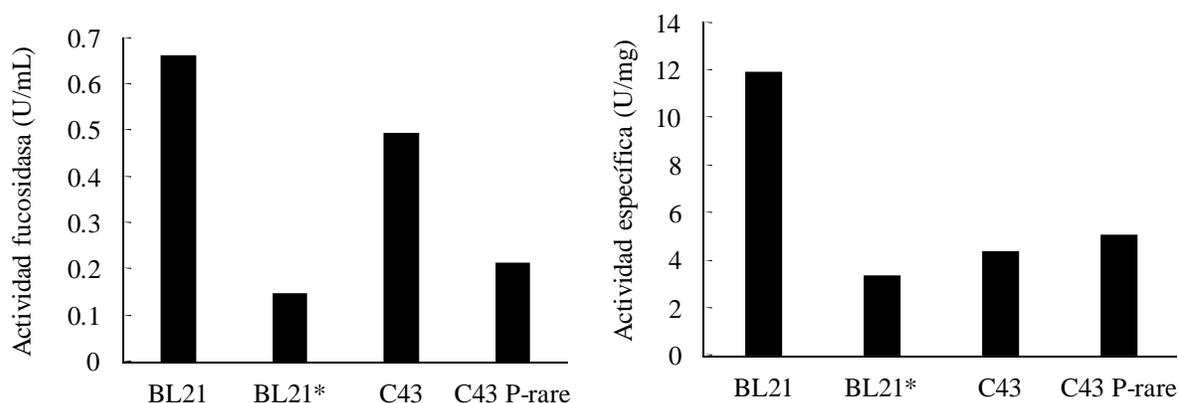
Se emplearon tres cepas de *E. coli* para expresar la fucosidasa de *T. marítima*, en la **Figura 15** se muestran los extractos enzimáticos obtenidos en cada caso. De las tres cepas empleadas, *E. coli* BL21\* fue la que expresó mejor la  $\alpha$ -L-fucosidasa. Sin embargo, se observa que la mayor cantidad de la enzima está en el paquete celular y se acumulan intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión como agregados insolubles de proteínas incorrectamente renaturalizadas.

Para aumentar la solubilidad la proteína esta debe replegarse, por tanto se propone como alternativa disolver el agregado con agentes caotrópicos, detergentes o alcalinizar. Manipulando correctamente el estado de oxidación-reducción de la solución, es posible promover tanto el plegamiento correcto como la formación de los puentes disulfuro (Lara, 2011; García *et al.*, 2013).



**Figura 16.** Geles de electroforesis SDS-PAGE de la fucosidasa de *T. marítima* expresada en las diferentes cepas de *E. coli*: a) paquete celular; b) sobrenadante.

Posteriormente se determinó la actividad de  $\alpha$ -L-fucosidasa en los sobrenadantes obtenidos para cada cepa de *E. coli* (**Figura 16**) y se observó que *E. coli* BL21\* presentó la menor actividad específica (3.3 U/mg) y *E. coli* BL21 la mayor (11.9 U/mg). Por ello se decidió emplear este extracto enzimático para el estudio de síntesis de fucosil-oligosacáridos.



**Figura 17.** Actividad de fucosidasa en diferentes cepas de expresión de *E. coli*.

### 6.2.3 Determinación de fucosidasa y lactasa en el extracto enzimático de *T. maritima*

El extracto enzimático obtenido a partir de *E. coli* BL21 que contenía la fucosidasa de *T. maritima* fue evaluado para determinar si presentaba actividad de lactasa. Esto se realizó, debido a que en este estudio se planteó el uso de lactosa como sustrato aceptor para la reacción de transfucosilación. La presencia de lactasa sería un inconveniente al ser capaz de hidrolizar al sustrato aceptor. Las actividades enzimáticas de lactasa y  $\alpha$ -fucosidasa, fueron evaluadas a pH 5 y pH 7, debido a que se ha reportado que la  $\alpha$ -fucosidasa de *T. maritima* presente un pH óptimo de 5 y la lactasa presenta un pH óptimo de 7 (Sulzenbacher *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004).

En la **Tabla 16** se observa que el extracto enzimático evaluado no presentó actividad de lactasa, además se encontró que la  $\alpha$ -L-fucosidasa tiene mayor actividad en pH 7. Por lo tanto se eligió realizar la reacción de síntesis de oligosacáridos a este pH.

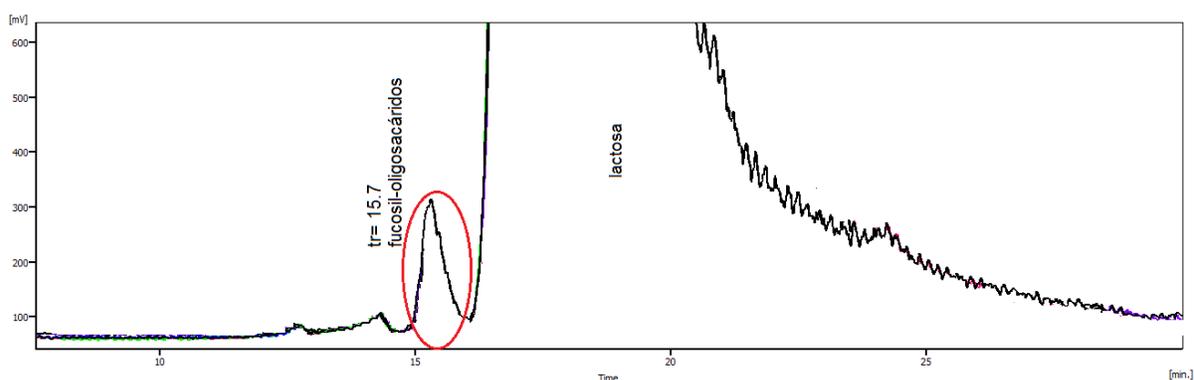
**Tabla 16.** Determinación de actividades enzimáticas empleando diferentes sustratos.

Sustrato	pH	Enzima	Método	Actividad enzimática U/mL
oNP-G	7	lactasa	espectrofotométrico	0
Lactosa	7	lactasa	HPLC	0
pNP-F	5	fucosidasa	espectrofotométrico	0.20
pNP-F	7	fucosidasa	espectrofotométrico	0.27

### 6.2.4 Síntesis de fucosil-oligosacáridos empleando $\alpha$ -L- fucosidasa recombinante de *T. marítima*

Una vez que se comprobó que el extracto enzimático no presentaba actividad de lactasa se realizó la síntesis de fucosil-oligosacáridos. Para ello, se emplearon diferentes condiciones en la reacción tales como: tiempo de reacción, concentración de enzima y concentración de aceptor y donador. Con esto se buscaron las mejores condiciones para llevar a cabo la reacción de transfucosilación.

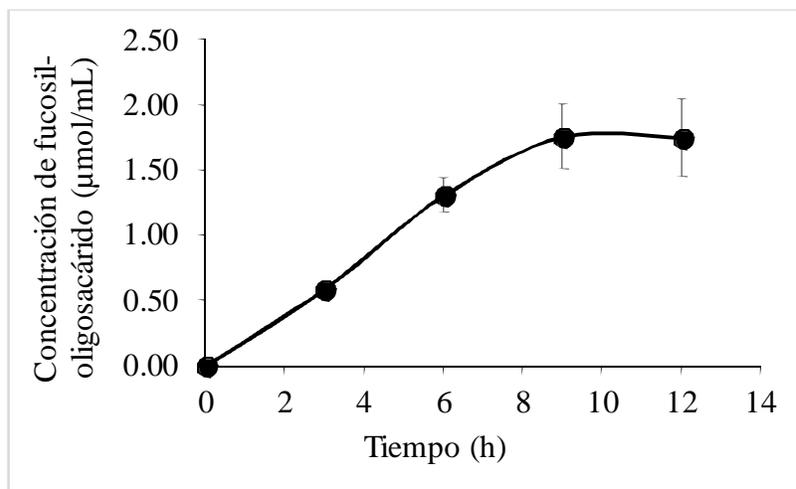
En la **Figura 17** se muestra el perfil típico de los productos obtenidos en la reacción de transfucosilación, y se observó que el tiempo de retención ( $t_r$ ) del fucosil-oligosacárido sintetizado fue 15.7 min.



**Figura 18.** Cromatograma de los productos de la reacción de síntesis de fucosil-oligosacárido, empleando  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. marítima*.

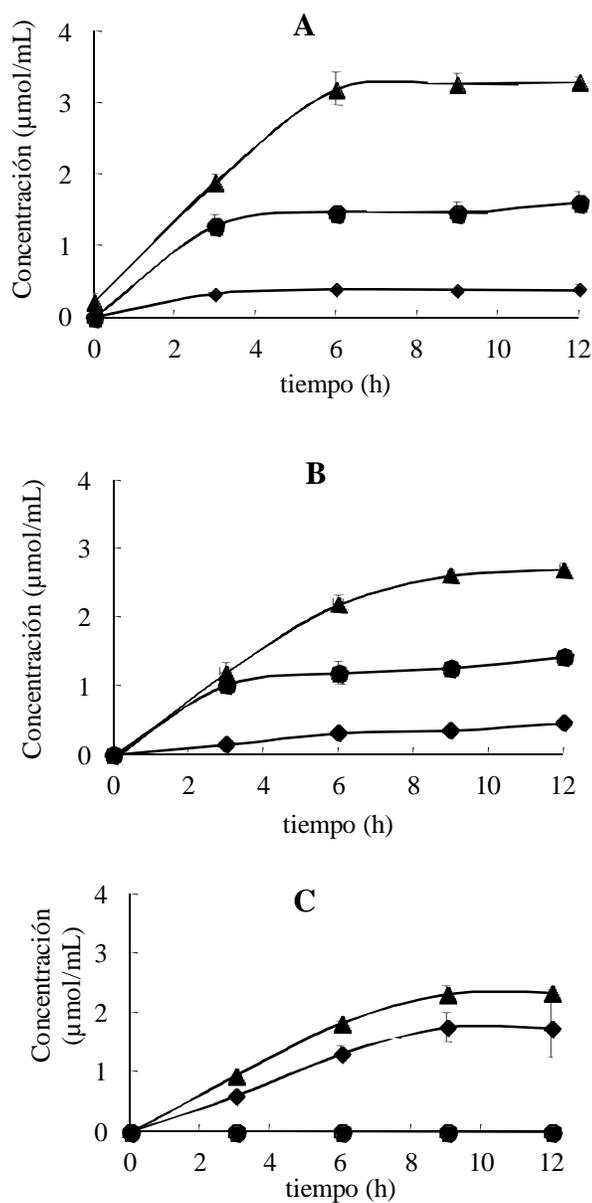
La reacción se llevó a cabo a 60 ° C durante 12 h y se empleó como sustrato 1 mg de pNP-F y 300 mg de lactosa

En la **Figura 18** se observa la cinética de reacción para la síntesis de fucosil-oligosacáridos. La reacción fue monitoreada cada 3 h y se obtuvo la mayor concentración de oligosacárido a las 12 h de reacción.



**Figura 19.** Cinética de reacción de transfucosilación para la síntesis de fucosil-oligosacáridos empleando 1 mg/mL de pNP-F, 300 mg/mL de lactosa a 60 °C.

Se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato aceptor y se encontró que a 100, 200 y 300 mg/mL de lactosa, se logró la transferencia de fucosa a lactosa dando como resultado la formación de fucosil-oligosacárido. En la **Figura 19** se muestra el efecto de la concentración del sustrato aceptor en la síntesis del fucosil-oligosacárido, y como se puede observar conforme se incrementa la concentración de lactosa inicial de 100 a 300 mg/mL, la reacción de síntesis se ve favorecida sobre la de hidrólisis. Esto es más evidente en la reacción con 300 mg/mL de lactosa (**Figura 19C**) ya que se obtuvo la mayor cantidad de fucosil-oligosacárido (2.02 µmol/mL). Los rendimientos de síntesis del fucosil-oligosacárido fueron de 11.4, 13.1 y 49.9 % para las reacciones con 100, 200 y 300 mg/mL de lactosa inicial respectivamente.



**Figura 20.** Productos obtenidos en las reacciones de transfucosilación empleando diferentes concentraciones de lactosa como sustrato aceptor.

A) 100 mg/mL de lactosa; B) 200 mg/mL de lactosa; C) 300 mg/mL de lactosa.

Fucosa (●); pNP (▲); fucósido (◆).

Previamente Osanjo *et al.* (2007) han reportado la capacidad de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* para catalizar la síntesis de oligosacáridos por transferencia de un residuo fucosil de pNP-F a

otra molécula de pNP-F en una reacción de auto-condensación con regioselectividad para sintetizar enlaces  $\alpha$  (1-3) y la transferencia a pNP-galactósido en reacción de transglicosilación con una regioselectividad para formar enlaces  $\alpha$  (1-2) obteniendo rendimientos muy bajos (10 % y 7% respectivamente). En dicho estudio la enzima silvestre fue mutada para mejorar la actividad transferasa y se logró incrementar la síntesis de pNP-Gal- $\alpha$ -(1-2)-Fuc en un 60% con respecto a la cepa silvestre. La enzima fue evaluada con diferentes monosacáridos y disacáridos aceptores, sin embargo, los rendimientos no excedieron el 30% incluso con altas concentraciones de aceptor (Osanjo *et al.*, 2007).

Por otro lado, Eneyskaya *et al.* (2001) reportaron que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermus sp.* presentó capacidad transferasa usando metil- $\alpha$ -L-fucopiranosas (Fuc- $\alpha$ -OMe) como donador y N-acetilglucosamina ó N-acetilgalactosamina como aceptores. Ellos no observaron productos de transglicosilación en la reacción con pNP-F. La enzima puede ser clasificada en la familia GH 29.

### 6.2.5 Purificación del fucosil-oligosacárido

Al final de la reacción de síntesis se obtuvo una mezcla que contenía lactosa, fucosa y fucosil-oligosacárido, por lo que fue necesario purificar el oligosacárido para su análisis posterior. La purificación de una mezcla de carbohidratos no es una tarea fácil, las técnicas empleadas incluyen: diafiltración, carbón activado, cromatografía de exclusión y tratamiento con levaduras (Sangwan *et al.*, 2014).

Al final de la reacción de síntesis se obtuvo una mezcla que contenía lactosa, fucosa y fucosil-oligosacárido. La mezcla de carbohidratos obtenida en el proceso de síntesis, fue sometida a dos tratamientos para la purificación del fucosil-oligosacárido.

En el primer tratamiento, a la mezcla de reacción se le adicionó  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* con el objetivo de hidrolizar la lactosa. Como se observa en la **Tabla 17** fue posible reducir la cantidad de lactosa de 300 mg/ mL a 3.56 mg/mL que representó una eliminación del 98 %.

El segundo tratamiento consistió en una fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* para la eliminación de monosacáridos (producto de la reacción de hidrólisis de la lactosa), consiguiéndose el 100% de eliminación.

Con el proceso de purificación planteado en esta investigación, se logró una recuperación de 77 % del fucosil-oligosacárido sintetizado. Estos resultados son comparables con lo obtenido por Sangwan *et al.* (2014) quienes lograron la purificación de una mezcla de galactooligosacáridos (GOS) producidos a partir del extracto enzimático de *Streptococcus thermophilus*. El proceso de purificación que emplearon consistió en el uso de *Saccharomyces cerevisiae* NCDC 50 para la remoción de monosacáridos, posteriormente emplearon *Kluyveromyces lactis* NCDC 115 para remover la lactosa y por último emplearon *Lactobacillus helveticus* NCDC 288 para retirar la galactosa residual del tratamiento anterior. Tanto los monosacáridos como disacáridos fueron reducidos considerablemente en 90 y 80 % respectivamente.

**Tabla 17.** Concentraciones de los carbohidratos durante el proceso de purificación

Proceso	Lactosa (mg/mL)	Monosacáridos (mg/mL)	Fucosil-OS (mg/mL)
<b>Transfucosilación</b>			
Síntesis de fucosil-OS	~300	0	0.998
<b>Purificación</b>			
Eliminación de lactosa por hidrólisis con $\beta$ -galactosidasa de <i>A. oryzae</i>	3.56	~300	0.996
Eliminación de monosacáridos por fermentación con <i>S. cerevisiae</i> )	0	0	0.770

### 6.2.6 Análisis de fucosil-oligosacárido mediante hidrólisis ácida

Una vez que el producto de transfucosilación fue purificado, se sometió a una hidrólisis ácida para determinar los monosacáridos que lo conforman. Los carbohidratos liberados por la hidrólisis ácida fueron identificados y cuantificados mediante HPLC. Como se observa en la **Tabla 18** el oligosacárido sintetizado es un trisacárido conformado equimolarmente por glucosa, galactosa y fucosa, con lo que se comprueba la síntesis de un fucosil-oligosacárido. Además, dado que la síntesis fue realizada con una fucosidasa E.C.3.2.1.51 perteneciente a la familia de las GH29 nos indica que el oligosacárido sintetizado debe poseer un enlace  $\alpha$ -fucosa,

debido a que las enzimas de esta familia se caracterizan por que en su mecanismo de reacción se conserva la configuración del carbono anomérico. Lo cual debe ser corroborado por un análisis en resonancia magnética nuclear.

**Tabla 18.** Concentración de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis ácida del fucosil-oligosacárido purificado.

Carbohidrato	Concentración (μmol/mL)
Glucosa	0.8
Galactosa	0.8
Fucosa	1

Por otro lado, la presencia de fucosa en el trisacárido sintetizado utilizando lactosa como sustrato acceptor nos lleva a suponer que puede presentar características anti-infecciosas ya que los fucosil-oligosacáridos en especial los que poseen enlaces  $\alpha$  (1-2) son capaces de inhibir agentes microbianos (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003).

## 7 Conclusiones

En este estudio se comprobó que las seis cepas de lactobacilos estudiadas, son capaces de producir  $\alpha$ -L-fucosidasa cuando se crecen en medios con glucosa o galactosa como fuente de carbono. Al mismo tiempo, se comprobó que esta enzima es constitutiva.

Además, la presencia pNP-F es un factor importante para que los lactobacilos estudiados liberen la enzima al medio de fermentación. Por otro lado, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *L. rhamnosus* GG es una proteína que se encuentra asociada a la célula, por lo que fue difícil su purificación.

Se comprobó que fue posible sintetizar fucosil-oligosacáridos empleando la  $\alpha$ -fucosidasa de *L. rhamnosus* GG, sin embargo, durante la reacción enzimática también se obtuvieron galactooligosacáridos como producto de transgalactosilación por la presencia de lactasa en el extracto, por lo que se sugiere buscar nuevas alternativas de purificación para la  $\alpha$ -fucosidasa de *L. rhamnosus* GG.

Se produjo  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. marítima*, sin embargo, para estudios posteriores, se sugiere mejorar las condiciones de expresión para obtener mayor cantidad de enzima soluble y evitar que la proteína se acumule en cuerpos de inclusión.

La  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. marítima* tiene capacidad transferasa en presencia de pNP-F como sustrato donador y altas concentraciones de lactosa como sustrato aceptor. Así también tiene altos rendimientos en la síntesis de fucosil-lactosa.

El procedimiento propuesto para la purificación de fucosil-lactosa logró eliminar el total de los disacáridos y monosacáridos residuales en la mezcla de reacción y se obtuvo una alta recuperación del fucosil-oligosacárido.

Estos resultados muestran que el empleo de  $\alpha$ -L-fucosidasa microbianas, son una buena alternativa para la síntesis de oligosacáridos similares a los encontrados en la leche humana.

## 8 Referencias.

- 1) Ai, L., Chen, Ch., Zhou, F., Wang, L., Zhang, H., Chen, W and Guo B., 2011. Complete genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus casei* BD-II. *Journal of Bacteriology*, 193(12), pp. 3160-3161.
- 2) Ajisaka, K. and Shirakabe, M., 1992. Regioselective synthesis of  $\alpha$ -L-fucosyl-containing disaccharides by use of  $\alpha$ -L-fucosidases of various origins. *Carbohydrate Research*, 224, pp. 291-299.
- 3) Albermann, C., Piepersberg, W. and Wehmeier, U.F., 2001. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydrate Research*, 334(2), pp 97-103.
- 4) Aminoff, D. and Furukawa, K. 1970. Enzymes that destroy blood group specificity. *The Journal of Biological Chemistry*. 245 (7), pp. 1659-1669.
- 5) Angeloni, S., Ridet, J., L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S., Kochhar, S., Sigrist, H. and Sprenger, N. *Glycobiology*, 15(1), pp.31-41.
- 6) Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T. and Yamamoto, K., 2009. Two distinct  $\alpha$ -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology*, 19(9), pp. 1010-1017.
- 7) Bahl, O., P. 1970. Glycosidase of *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*. 245(2), pp. 299-304.
- 8) Barrón-Alvarez. 2013. Estudio de la producción de fucosidasas intracelulares de bacterias ácido láctica. Tesis de Especialidad. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D. F.
- 9) Berteau, O., McCort, I., Goasdoué, N., Tissot, B. and Daniel, R. 2002. Characterization of a new  $\alpha$ -L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis  $\alpha$ -L-fucose from algal fucoidan. *Glycobiology*, 12 (4), pp. 273-282.
- 10) Bode, L. and Jantscher-krenn, E., 2012. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(3), pp. 383-391.
- 11) Bode, L. 2006. Recent Advances on Structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *The Journal of Nutrition*. 136, pp. 2127-2130.
- 12) Bode, L., 2009. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*, 67 Suppl 2, pp. S183-91.

- 13) Bode, L., 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), pp. 1147-1162.
- 14) Chadwick, R., Allison, J., Talley, D. and George, E. 1995. Possible errors in assay for b- glycosidase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), pp. 820-822.
- 15) Chassy, B. and Thompson, T. 1983. Regulation and characterization of the galactose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. *Journal of Bacteriology*. 154 (3), pp.1204-1214.
- 16) Chen, Ch., Ai, L., Zhou, F., Wang, L., Zhang, H., Chen, W. and Guo, B., 2011. Complete genome sequence of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* LC2W. *Journal of Bacteriology*, 193(13), pp. 3419-3420.
- 17) Chirico, G., Marzollo, R., Cortinovis, S., Fonte, Ch and Gasparoni A., 2008. Antiinfective properties of human milk. *The Journal of Nutrition*, 138(9), pp. 1801S-1806S.
- 18) Cobucci-Ponzano, B., Trincone, A., Giordano, A., Rossi, M. and Moracci, M., 2003. Identification of the catalytic nucleophile of the family 29  $\alpha$ -L -fucosidase from *Sulfolobus solfataricus* via chemical rescue of an inactive mutant. *Biochemistry*. 42, pp. 9525-9531.
- 19) Cort, S., Kumara, H., M. and Verachtert, H. 1994. Localization and characterization of  $\alpha$ -glucosidase activity in *Lactobacillus brevis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (9), pp. 3074-3078.
- 20) Cruz-Guerrero, A., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. and Figueron-González, I. 2014. Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94, pp. 2246-2252.
- 21) Domínguez-Vergara, A. M., Vázquez-Moreno, L. and Ramos-Clamont, G., 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59(4), pp. 358-368.
- 22) Eneyskaya, E. V, Kulminskaya, A. A., Kalkkinen, N., Nifantia, N., Arbatskii, N., Saenko, A., Chepurnaya, O., Arutyunyan, A., Shabalin, K. and Neustroev, K., 2001. An  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermus sp.* with unusually broad specificity. *Glycoconjugate Journal*, 18(10), pp. 827-834.
- 23) Farkas, E., Thiem, J. and Ajisaka, K., 2000. Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified alpha-L-fucosidase from *Penicillium multicolor*. *Carbohydrate Research*, 328(3), pp. 293-9.

- 24) Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J., Topping, D., Suzuki, T., Taylor, T., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M. and Ohno, H., 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469(7331), pp. 543-547.
- 25) García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quitana, M., González, D., Furrázola, G. and Cruz, O., 2013. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), pp. 30-39.
- 26) Gibson, G. R., Probert, H., Loo, J., Rastall, R. and Roberfroid, M., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), pp. 259-275.
- 27) Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. and Rudloff, S., 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *The Journal of Nutrition*, 130(12), pp. 3014-3020.
- 28) Grove, D., S. and Serif, G. 1981. Porcine thyroid fucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 662, pp. 246-255.
- 29) Gudiel-Urbano, M and Goñi, I., 2001. Oligosacaridos de la leche humana. Papel en la salud y desarrollo del lactante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4), pp. 332-339.
- 30) György, P., Norris, R. F. and Rose, C. S., 1954. Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 48(1), pp. 193-201.
- 31) Honda, H., Kataoka, F., Nagaoka, S., Kawai, Y., Kitazawa, H., Itoh, H., Kimura, K., Taketomo, N., Yamazaki, Y., Tateno, Y. and Saito, T. 2007. B-galactosidase, phospho-b-galactosidase and phospho-b-glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Letters in Applied Microbiology*. 45, pp. 461-466.
- 32) Hickey, M., Hillier, A. and Jago, R. 1986. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 51 (4), pp. 825-831.
- 33) Imber, M. J., Glasgow, L. R. and Pizzo, S. V., 1982. Purification of an almond emulsin fucosidase on cibacron blue-sepharose and demonstration of its activity toward fucose-containing glycoproteins. *The Journal of biological chemistry*, 257(14), pp. 8205-8210.
- 34) Iqbal, S., Nguyen, T-H., Nguyen, T., Maischberger, T., Haltrich, D., b-galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*. 345, pp. 1408-1416.

- 35) Jantscher-Krenn, E, Bode, L. 2012. Human milk oligosaccharides and their potential benefits for the breast-fed neonate. *Minerva Pediatrica*, 64, pp. 83-99.
- 36) Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A., Lebeer, S., De Keersmaecker, S., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P. and M. de Vos, W., 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), pp. 17193-17198.
- 37) Katayama, T., Sakuma, A., Kimura, T., Makimura, Y., Hiratake, J., Sakata, K., Yamanoi, T., Kumagai, H. and Yamamoto, K., 2004. Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1, 2- $\alpha$ -L-fucosidase ( AfcA ), a novel inverting glycosidase (Glycoside Hydrolase Family 95 ). *Journal of Bacteriology*, 186(15), pp. 4885-4893.
- 38) Kim, C. S., Ji, E. S. and Oh, D. K., 2004. Characterization of a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), pp. 1006-1014.
- 39) Kochibe, N., 1973. Purification and properties of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Bacillus fulminans*. *Journal of Biochemistry*, 74, pp. 1141-1149.
- 40) Kunz, C., Rudloff, S., Baie, W., Klein, N. and Strobel, S., 2000. Oligosaccharides in human milk: structural , functional , and metabolic aspects. *Immunobiology*, pp. 699-722.
- 41) Kunz, C., Kuntz, S. and Rudloff, S. Bioactivity of human milk oligosaccharides. *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*, First Edition. Published 2014 by JohnWiley & Sons, Ltd., pp.5-20.
- 42) Kurimura, Y., Tsuji, Y., Yamamoto, K., Kumagal, H. and Tochikura, T., 1995. Efficient production and purification of extracellular 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase of bacillus sp. K40T. *Bioscience and Biochemistry*, 59(4), pp. 589-594.
- 43) Lara, A., 2011. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), pp. 209-223.
- 44) Liu, S-W., Chen, Ch-S., Chang, S-S., Mong, K-K., Lin, Ch-H., Chang, Ch-W., Yi Tang, Ch. And Li, Y-K. Identification of essential residues of human  $\alpha$ -L-fucosidase and tests of its mechanism. *Biochemistry*, 48, pp. 110-120.

- 45) Mahajan, P., M., Desai, K., M. and Lele, S., S. 2012. Production of cell membrane-bound  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase by *Lactobacillus acidophilus*. *Food Bioprocess Technol.* 5, pp. 706-718.
- 46) Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M. J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beaufils, S., Poncet, S., Joyet, P., Milohanic, E., Casarégola, S., Auffray, Y., Pérez-Martínez, G., Gibrat, J-F., Zagorec, M., Francke, Ch., Hartke, A. and Deutscher, J., 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of bacteriology*, 192(10), pp. 2647-2648.
- 47) Miñana, I.V., 2007. Oligosacáridos en la leche humana. *Acta Pediátrica Española*, 65(4), pp. 175-179.
- 48) Miura, T., Okamoto, K. and Yanase, H., 2005. Purification and characterization of extracellular 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase from *Bacillus cereus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(6), pp. 629-635.
- 49) Moller, P., Jorgensen, F., Hansen, O., Madsen, S. and Stougaard, P. 2001. Intra- and extracellular  $\beta$ -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: Molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (5), pp. 2276-2283.
- 50) Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Murakami, M., Taylor, D., Igimi, S. and Hattori, M., 2009. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Journal of Bacteriology*, 191(24), pp. 7630-7631.
- 51) Neujahr, H., Börstad, B. and Logardt, I-M. 1973. Factors affecting the resistance of *Lactobacillus fermenti* to lysozyme. *Journal of Bacteriology*. 116 (2), pp. 694-698.
- 52) Nguyen, T.-H., Splecht, B., Steinbock, M., Kneifel, W., Lettner, H., Kulbe, K. and Haltrich, D. 2006. Purification and characterization of two novel  $\beta$ -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, pp. 4989-4998.
- 53) Nilsson, K. G. I., Eliasson, A. and Larsson-lorek, U., 1995. Production of glucosamine containing disaccharides of the Lewis a and X types employing glycosidases. *Biotechnology Letters*, 17(7), pp. 717-722.
- 54) Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C. and Tellier, Ch., 2007. Directed evolution of the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an  $\alpha$ -L-transfucosidase. *Biochemistry*, 46(4), pp. 1022-1033.
- 55) Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. and Sinderen, D. 2011. Carbohydrate metabolism in bifidobacteria. *Genes and Nutrition*. 6, pp. 285-306.
- 56) Reglero, A. and Cabezas, J. 1976. Glycosidases of molluscs. *European Journal of Biochemistry*. 66, pp. 379-387.

- 57) Rodríguez-Díaz, J., Carbajo, R. J., Pineda-Lucena, A., Monedero, V. and Yebra, M. J., 2013. Synthesis of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides by transglycosylation using  $\alpha$ -L-fucosidases from *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), pp. 3847-3850.
- 58) Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V. and Yebra, M. J., 2011. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), pp. 703-705.
- 59) Rodríguez-Díaz, J., Rubio-del-Campo, A. and Yebra, J. M., 2012. *Lactobacillus casei* ferments the N-acetylglucosamine moiety of fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), pp. 4613-4619.
- 60) Romano, A., Trifone, J. and Brustolon, M. Distribution of the phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 139 (1), pp. 93-97.
- 61) Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, E. L., Ramos, P., Chavez-Munguia, B. and Newburg, D., 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), pp. 14112-20.
- 62) Sano, M., Hayakawa, K. and Kato, I., 1992. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Streptomyces* species. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(3), pp. 1522-1527.
- 63) Sangwan, V., Tomar, S., Ali, B., Singh, R. R. B. and Singh, A. K., 2014. Galactooligosaccharides purification using microbial fermentation and assessment of its prebiotic potential by in vitro method. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(4), pp. 573-585.
- 64) Schopohl, D., Müller-Taubenberger, A., Orthen, B., Hess, H. and Reutter, W., 1992. Purification and properties of a secreted and developmentally regulated alpha-L-fucosidase from *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(4), pp. 2400-2405.
- 65) Schwab, C. and Gänzle, M. 2011. Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*. 315, pp. 141-148.
- 66) Scudder, P., Neville, D., Butterst, T., Fleet, G., Dwek, R., Rademacher, T. and Jacob, Gary., 1990. The Isolation by ligand affinity chromatography of a novel  $\alpha$ -L-fucosidase from almond. *Journal of Biological Chemistry*, 265(27), pp. 16472-16477.
- 67) Splechtna, B., Petzelbauer, I., Baminger, U., Haltrich, D., Kulbe, K. and Nidetzky, B. 2001. Production of a lactose-free galacto-oligosaccharide mixture by using selective

- enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 29, pp. 434-440.
- 68) Splechtna, B., Nguyen, T- H. and Haltrich, D. 2007. Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using  $\beta$ -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55, pp. 6772-6777.
- 69) Sela, D., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T., Lapidus, A., Rokhsar, D., Lebrilla, C., German, J., Price, N., Richardson, P. and Mills, D., 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), pp. 18964-18969.
- 70) Shizukuishi, S., Taniguchi, T., Shibata, S., Nakamura, R., Tsunemitsu, A. and Uesugi, Y., 1978. Purification and some properties of  $\alpha$ -L-fucosidase isolated from *Streptococcus sanguis*. *Journal of Dental Research*, 57(11), pp. 1028-1035.
- 71) Shoaf-Sweeney, K. D. and Hutkins, R. W., 2009. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host. *Advances in Food and Nutrition Research*, 55, pp. 101-161.
- 72) Smilowitz, J.T., Lebrilla, C. B., Mills, D. A., German, J. B. and Freeman, S. L., 2014. Breast milk oligosaccharides: Structure-function relationships in the neonate. *Annual Review of Nutrition*, 34(1), pp. 14.1-14.27.
- 73) Srivastava, P. N., Arbtan, K., Takei, G. H., Huang, T. T. and Yanagimachi, R., 1986.  $\alpha$ -L-fucosidase from bull seminal plasma: Its purification and acrosome reaction promoting property. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 137(3), pp.1061-1068.
- 74) Sulzenbacher, G., Bignon, Ch., Nishimura, T., Tarling, Ch., Withers, S., Henrissat, B. and Bourne, Y. 2004. Crystal structure of *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -L-fucosidase: Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), pp. 13119-13128.
- 75) Svensson, S. and Thiem, J., 1990. Purification of  $\alpha$ -L- fucosidase by C-glycosyl affinity chromatography and the enzymic synthesis of  $\alpha$ -L-fucosyl disaccharides. *Carbohydrate Research*, 200, pp. 391-402.
- 76) Tarling, Ch., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, Ch., Bourne, Y., Henrissat, B. and Withers, S. 2003. Identification of the catalytic nucleophile of the family 29  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (48), pp. 47394-47390.

- 77) Thomas, R. and Brooks, T., 2004. Common oligosaccharide moieties inhibit the adherence of typical and atypical respiratory pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 53, pp. 833-840.
- 78) Tsai, Y-K. and Lin, T-H. 2006. Sequence, organization, transcription and regulation of lactose and galactose operons in *Lactobacillus rhamnosus* TCELL-1. *Journal of Applied Microbiology*. 100, pp. 446-459.
- 79) Tsuji, Y., Yamamoto, K., Tochikura, T., Seno, T., Ohkubo, Y. and Yamaguchi, H., 1990. Purification and characterization  $\alpha$ -L-fucosidase from *Bacillus circulans* grown on porcine gastric mucin. *Journal of Biochemistry*, 107, pp. 324-330.
- 80) Turrioni, F., Bottacini, F., Foroni, E., Mulder, I., Kim, J-H., Zomer, A., Sánchez, B., Bidossi, A., Ferrarini, A., Giubellini, V., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Fitzgerald, G., Mills, D., Margolles, A., Kelly, D., Sinderen, D. and Ventura, M., 2010. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), pp. 19514-19519.
- 81) Urashima, T., Fukuda, K. and Messer, M., 2011. Evolution of milk oligosaccharides and lactose: a hypothesis. *The Animal Consortium*, 6(3), pp. 369-374.
- 82) Urashima, T., Kitaoka, S. and Messer, M., 2009. Milk oligosaccharides. *Advanced Dairy Chemistry*, 3, pp. 295-349
- 83) Ventura, M., Turrioni, F., Zomer, A., Foroni, E., Giubellini, V., Bottacini, F., Canchaya, C., Claesson, M., He, F., Mantzourani, M., Mulas, L., Ferrarini, A., Gao, B., Delledonne, M., Henrissat, B., Coutinho, P., Oggioni, M., Gupta, R., Zhang, Z., Beighton, D., Fitzgerald, G., O'Toole, P., Van Sinderen, D., 2009. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genetics*, 5(12), pp. 1-18.
- 84) Ward, R. E., Niñonuevo, M., Mills, D., Lebrilla, C. and German, J. B., 2007. In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, pp. 1398-405.
- 85) Wei, Y-X., Zhang, Z-Y., Liu, Ch., Zhu, Y-Z., Zhu, Y-Q., Zheng, H., Zhao, G-P., Wang, S. and Guo, X-K., 2010. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* JDM301. *Journal of Bacteriology*, 192(15), pp. 4076-4077.
- 86) Yazawua, S., Madiyalakan, R., Cawda, R. and Matta, K., 1996.  $\alpha$ -L-fucosidase from *Aspergillus niger*: Demonstration of novel  $\alpha$ -L-fucosidase acting on glycopeptides. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 136(2), pp. 563-569.
- 87) Zhang, W., Yu, D., Sun, Z., Wu, R., Chen, X., Chen, W., Meng, H., Hu, S. and Zhang, H., 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic

strain isolated from traditional homemade koumiss in inner Mongolia, China. *Journal of Bacteriology*, 192(19), pp. 5268-5269.

- 88) Zhurina, D., Zomer, A., Gleinser, M., Brancaccio, V. F., Auchter, M., Waidmann, M., Westermann, Ch., Sinderen, D. and Riedel, Ch., 2011. Complete genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17. *Journal of Bacteriology*, 193(1), pp. 301-302.
- 89) Zourari, A., Accolas, JP., Desmazeaud, MJ. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait*. 72, pp. 1-34.

## 9. Publicación Científica



Revista Mexicana de Ingeniería Química  
Vol. 14, No. 3 (2015) 623-629



**SYNTHESIS OF  $\alpha$ -L-FUCOSIDASE IN DIFFERENT STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA**

**SÍNTESIS DE  $\alpha$ -L-FUCOSIDASA EN DIFERENTES CEPAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Y. Escamilla-Lexano<sup>1</sup>, M. García-Garibay<sup>1,2</sup>, A. López-Munguía-Canales<sup>3</sup>,  
L. Gómez-Ruiz<sup>1</sup>, G. Rodríguez-Serrano<sup>1</sup>, and A. Cruz-Guerrero<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Izapa, Av. San Rafael Atlixo No. 186 Col. Vicentina, México D.F. C.P. 09340, México.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, C.P. 52006, Lerma de Villada, Edo. de México, México.

<sup>3</sup>Dpto. de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México

Received June 3, 2015; Accepted July 5, 2015

**Abstract**

The ability of six lactic acid bacteria to produce  $\alpha$ -L-fucosidase is reported here for the first time, opening a wide field of investigation into the metabolism and assimilation of human milk oligosaccharides by lactic acid bacteria. *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB-2772 were all able to produce  $\alpha$ -L-fucosidases. Growth kinetics and carbohydrate consumption measurements indicated that the six strains were able to metabolise D-glucose and D-galactose as a carbon source; surprisingly, they did not assimilate L-fucose. However,  $\alpha$ -L-fucosidase was a cell-associated enzyme and produced constitutively in different carbon sources. The highest cell-associated  $\alpha$ -L-fucosidase activity was observed in *L. rhamnosus* GG (0.16 U mg<sup>-1</sup>).

**Keywords:**  $\alpha$ -L-fucosidase, lactobacilli, fucose, human milk oligosaccharides.

**Resumen**

Este es el primer estudio que reporta la síntesis de  $\alpha$ -L-fucosidasa en seis bacterias ácido lácticas, lo que abre un amplio campo de investigación sobre el metabolismo y la asimilación de los oligosacáridos de la leche humana por parte de estos microorganismos. *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB-2772 fueron capaces de producir  $\alpha$ -L-fucosidasa. Las cinéticas de crecimiento y el consumo de carbohidratos indican que las seis cepas son capaces de metabolizar D-glucosa y D-galactosa como fuente de carbono; pero no asimilaron L-fucosa. Por otro lado, las  $\alpha$ -L-fucosidasas sintetizadas son enzimas asociadas a la célula y se produjeron de manera constitutiva en diferentes fuentes de carbono. La mayor actividad enzimática se observó en *L. rhamnosus* GG (0.16 U mg<sup>-1</sup>).

**Palabras clave:**  $\alpha$ -L-fucosidasa, lactobacilos, fucosa, oligosacáridos de leche humana.

\* Corresponding author. E-mail: 20081270@UNAM.mx

## 1 Introduction

During the last two decades, human milk oligosaccharides (HMOs) have been the subject of intensive research due to their prebiotic properties and other roles beneficial to human health. HMOs contain lactose at their reducing end. Galactose in lactose can be sialylated in (2-3) and/or (2-6) linkages to form 3'sialyl-lactose and 6'sialyl-lactose respectively. Lactose can also be fucosylated in  $\alpha$  (1-2) or (1-3) linkages to form 2'fucosyl-lactose and 3'fucosyl-lactose. Complex HMOs are formed by adding 1 to 15 lactosamine molecules to lactose (Bode, 2009). The most abundant HMOs are neutral and contain fucose. Interestingly, fucose is introduced to the so called fucosylated oligosaccharides (FUCOs) through  $\alpha$  (1-2) or  $\alpha$  (1-3) linkages, and their composition depends on the mother and her lactation stage (Chaturvedi *et al.*, 2001).

In particular, FUCOs have been shown to inhibit adhesion of pathogenic microorganisms, such as *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholera*, some strains of *Salmonella* and *Shigella*, and the thermostable toxin of *Escherichia coli*. In a general context, these HMOs are natural prebiotics that promote the growth of probiotics and stimulate the innate immune system (Bode, 2009; Newburg, 2009; Shoaf-Sweeney *et al.*, 2009).

The ability of some intestinal bacteria to metabolise HMOs depends on the expression of different carbohydrases, such as  $\alpha$ -fucosidase,  $\alpha$ -sialidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase, as reported by Pokusaeva *et al.* (2011). Studies in bifidobacteria have identified  $\alpha$  (1-2)-L-fucosidase,  $\alpha$  (1-3/4)-L-fucosidase and endo- $\alpha$ -N-acetylgalactosaminidase respectively; these enzymes are involved in the degradation of mucin and the consumption of HMOs (Ashida *et al.*, 2009; Sela, 2011). In contrast, the production of  $\alpha$ -L-fucosidase in lactobacilli has received little attention. The genomic analysis conducted by Morita *et al.* (2009) suggested that *L. rhamnosus* ATCC 53103 encodes putative  $\alpha$ -L-fucosidase classified in the Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZY). Rodríguez-Díaz *et al.* (2011) reported three putative  $\alpha$ -L-fucosidase (AlfA, AlfB and AlfC) encoded in the *Lactobacillus casei* BL23 genome; these  $\alpha$ -L-fucosidases are capable of hydrolysing natural fucosyl-oligosaccharides *in vitro*. In 2012, the same authors reported that *Lactobacillus casei* BL23 is able to grow on fucosyl- $\alpha$  (1-3)-N-acetylglucosamine as carbon source; however, the L-fucose moiety accumulates during growth,

indicating that only the N-acetyl-glucosamine moiety is metabolised (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012).

Therefore, this work aimed to study the availability of  $\alpha$ -L-fucosidase in lactic acid bacteria (LAB) cultures growing in different carbon sources to understand the metabolism and assimilation of HMOs.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Microorganisms

Six LAB strains were used in this study: *Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, *Lactobacillus helveticus* IMAU70129, previously isolated from commercial products by Cruz-Guerrero *et al.* (2014), and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB-2772 (National Collection of Food Bacteria from United Kingdom).

### 2.2 Growth conditions

Microorganisms were cultivated in the corresponding culture medium at 37 °C for 24 h, in a New Brunswick incubator (New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA). The culture medium contained 5 g L<sup>-1</sup> yeast extract (B. D. Bioxon, Mexico City, Mexico), 10 g L<sup>-1</sup> casein peptone (B. D. Bioxon, Mexico City, Mexico) and 10 g L<sup>-1</sup> of one of the four carbon sources studied: D-glucose, D-galactose, L-fucose or p-nitrophenyl  $\alpha$ -L-fucopyranoside (pNP-F) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA.). A culture medium without a carbon source was used as a control medium (CM). Growth was measured following the increase in absorbance at 600 nm every 2 h in a spectrophotometer (Shimadzu UV-160A, Tokyo, Japan).

Fermentation broths were centrifuged at 3110 g (Beckman J2-MI, Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA) for 20 min at 4 °C. Both, the supernatant and cellular bottom resuspended in phosphate buffer (100 mM, pH 7) were assayed for  $\alpha$ -L-fucosidase activity.

### 2.3 Enzyme activity assay

Microorganisms were cultivated in the corresponding culture medium at 37 °C for extracellular  $\alpha$ -L-fucosidase activity was determined in a reaction mixture containing 800  $\mu$ L of 3.5 mM pNP-F solution in 100 mM phosphate buffer, pH 7, and 200  $\mu$ L of the cell culture supernatant. The mixture was incubated

for 10 min at 37 °C, and the rate of formation of free p-nitrophenol (pNP) which was recorded directly in a spectrophotometric cell (Shimadzu UV-160A, Tokyo, Japan) at 410 nm and quantified through a standard curve. Cell-associated  $\alpha$ -L-fucosidase activity was determined in a reaction mixture containing 800  $\mu$ L of pNP-F solution and 200  $\mu$ L of the resuspended cell bottom, and the mixture was incubated for 2 h at 37 °C; 200  $\mu$ L samples were removed every 30 min and centrifuged at 3110 g for 20 min at 4 °C to eliminate cells. The amount of pNP released was quantified using Elx 808IU microplate reader (BioTeck Instruments, Inc. USA).

One  $\alpha$ -L-fucosidase activity unit was defined as the amount of enzyme hydrolyzing one nmol pNP-F per minute at pH 7 and 37 °C. Enzymatic activity is expressed as U mL<sup>-1</sup>.

Specific  $\alpha$ -L-fucosidase activity was defined as enzymatic activity (U) per mg of biomass, which was measured using a standard curve of dry weight cells.

#### 2.4 Carbohydrate analysis

The consumption of carbohydrates was determined in the fermentation supernatant by HPLC (LabAlliance, State College PA, USA) using a Rezex RHM 7.8 x 300 mm column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) for monosaccharides and a light-scattering detector (Polymer Laboratories, Amherst, MA, USA). Samples were eluted with deionized water at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The column temperature was maintained at 75 °C, and the detector temperature was maintained at 110 °C. The concentrations of each carbohydrate were determined from the corresponding standard curve.

#### 2.5 Statistical analysis

All experiments were carried out at least in triplicates, and results are expressed as the mean with standard deviations. To assess significant differences in the growth of microorganisms between the different carbon sources, analysis of variance (ANOVA) and Tukey's tests were performed using the NCSS statistical software using  $\alpha < 0.05$  as the threshold of statistical significance.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Lactic acid bacteria growth in different carbon sources

The progression of cell growth of the six LAB strains in different carbon sources is shown in Figure 1, where

it may be observed that all LAB cultures reached their highest growth when glucose was used as the carbon source in the culture medium, followed by growth with galactose in the medium ( $\alpha=0.05$ ). On the other hand, the culture media containing pNP-F or L-fucose did not allow any significant growth when compared to that observed in the CM ( $\alpha=0.05$ ); the limited growth observed in pNP-F or L-fucose was due to the alternative substrates present in the CM, but not to the two carbohydrates added.

Hickey *et al.* (1986) demonstrated that *L. bulgaricus* is only able to metabolize galactose in a culture medium containing low concentrations of the carbon source, which explains the low growth of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB-2772 observed here (Fig. 1F). *L. bulgaricus* transports galactose by permeases and uses the Leloir pathway to metabolize galactose (Zourari *et al.*, 1992). *L. casei* and *L. rhamnosus* have also been reported to metabolize galactose; these bacteria can use both the D-tagatose-6-phosphate pathway and the Leloir pathway (Tsai and Lin, 2006), which explains the observed growth in the other four strains (Fig. 1A, 1B, 1C, and 1D).

Glucose and galactose were completely consumed by the six LAB strains after 24 h of fermentation, whereas L-fucose was not consumed by any of the six studied strains (Table 1). In contrast, in the supernatants of media containing pNP-F, L-fucose was observed for all strains (Table 1), suggesting that none of the LAB metabolized L-fucose. However, because pNP-F was hydrolyzed during the incubation experiments, the presence of  $\alpha$ -L-fucosidase activity can be inferred. These results are in agreement with those reported by Rodríguez-Díaz *et al.* (2012), who found that *L. casei* BL23 excretes L-fucose as a product of the metabolism of fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-acetylglucosamine used as carbon source, consuming only the N-acetylglucosamine moiety.

The ability of some microorganisms to metabolize a specific set of carbohydrates is an evolutionary survival advantage, suggesting that HMOs could be a very selective prebiotic for LAB. Ward *et al.* (2007) studied the catabolism and fermentation of HMOs by strains of bifidobacteria. They reported that all studied strains were able to individually ferment the two monosaccharides present in HMOs: glucose and galactose. The ability of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and *Bifidobacterium breve* to ferment glucosamine, L-fucose and sialic, is an advantage over other colonic strains. Schwab *et al.* (2011) studied the ability of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, to digest HMOs components; reported that all

Escamilla-Lozano et al/ Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 14, No. 3 (2015) 623-629

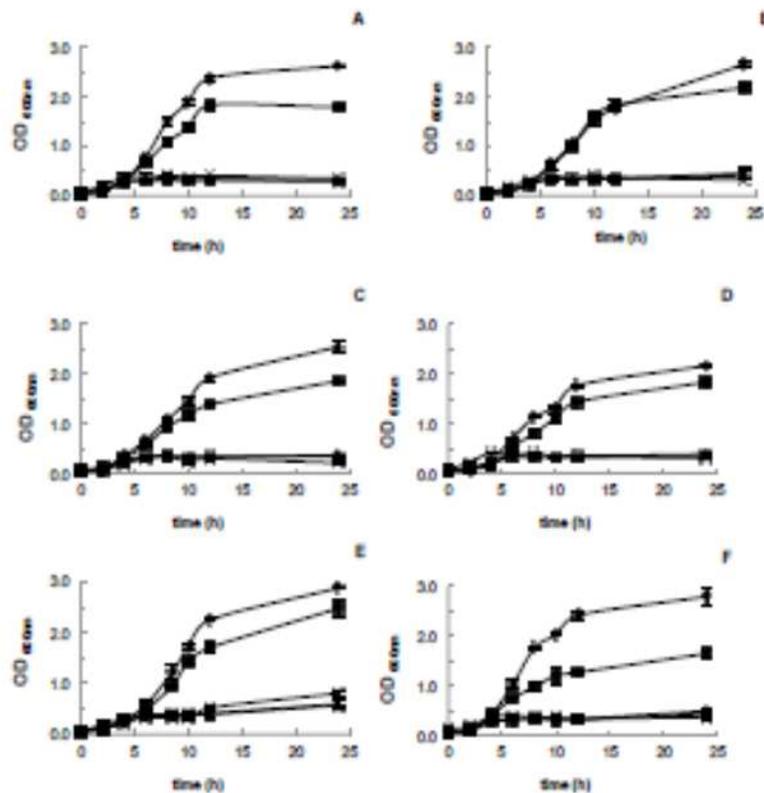


Fig. 1. Growth of *L. casei* IMAU 60214 (A), *L. casei* Shirota (B), *L. rhamnosus* GG (C), *L. rhamnosus* KLDS (D), *L. helveticus* IMAU70129 (E), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F) in media containing D-glucose (◆), D-galactose (■), L-fucose (▲), pNP-F (×), CM (●). Data represent average values from three independent experiments.

strains grew on lactose and glucose and fucose utilization was absent.

### 3.2 Determining extracellular $\alpha$ -L-fucosidase activity

Extracellular  $\alpha$ -L-fucosidase activity was determined in the supernatants obtained from the fermentations of the six strains in all of the studied carbon sources; interestingly, only the supernatants of media containing pNP-F presented  $\alpha$ -L-fucosidase activity (Fig. 2). In the supernatants of the six strains,  $\alpha$ -L-fucosidase activity were observed, and *L. casei* Shirota exhibited the highest activity ( $\alpha = 0.05$ ). Nevertheless, later studies showed that the  $\alpha$ -L-fucosidase was liberated as part of the natural process of cell death lysis; indicating that the enzymatic activity was

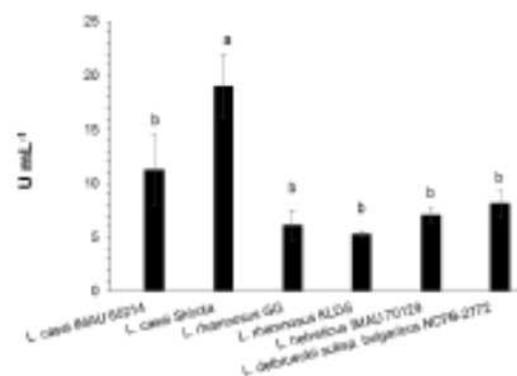


Fig. 2. Extracellular  $\alpha$ -L-fucosidase activity in media containing pNP-F with different lactic acid bacteria. The cell culture supernatant was used for extracellular activity. The reaction was carried out for 120 min at 37 °C, employing 3.5 mM pNP-F solution in 100 mM phosphate buffer, pH 7. Different letters indicate significant differences.

Table 1. Consumption of glucose, galactose, fucose (all at 10 g L<sup>-1</sup>) and pNP-F (5 g L<sup>-1</sup>) during growth at 37 °C for 24 h

BAL	Glucose (g L <sup>-1</sup> )	Galactose (g L <sup>-1</sup> )	Fucose (g L <sup>-1</sup> )	pNP-F* (g L <sup>-1</sup> )
<i>L. casei</i> IMAU 60214	10 ± 0.01	10 ± 0.02	0	0.22 ± 0.01
<i>L. casei</i> Shirota	10 ± 0.03	10 ± 0.05	0	0.15 ± 0.01
<i>L. rhamnosus</i> GG	10 ± 0.03	10 ± 0.01	0	0.17 ± 0.02
<i>L. rhamnosus</i> KLDS	10 ± 0.01	10 ± 0.01	0	0
<i>L. helveticus</i> IMAU70129	10 ± 0.02	10 ± 0.03	0	0.41 ± 0.01
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB-2772	10 ± 0.01	10 ± 0.04	0	NC

(\*): fucose released during fermentation; NC: unquantified

cell-associated. Notably, no previous studies have reported the extracellular  $\alpha$ -L-fucosidase activity of lactobacilli.

### 3.3 Determining cell-associated $\alpha$ -L-fucosidase activity

The cell-associated  $\alpha$ -L-fucosidase activity of the six LAB grown in media with glucose or galactose as carbon sources is shown in Figure 3. All LAB produced cell-associated  $\alpha$ -L-fucosidase. However, when LAB were grown in a glucose medium (Fig. 3A), no significant differences in the amount of  $\alpha$ -L-fucosidase activity for the six LAB ( $\alpha=0.05$ ) were observed, and *L. casei* Shirota exhibited the lowest enzymatic activity. LAB grown in medium containing galactose (Fig. 3B) did not exhibit significant differences in  $\alpha$ -L-fucosidase activity compared with the  $\alpha$ -L-fucosidase activities of the six strains ( $\alpha=0.05$ ). However, compared with the  $\alpha$ -L-fucosidase activities for each bacterium in both culture media, *L. casei* Shirota and *L. rhamnosus* KLDS exhibited the highest activity when grown in galactose as a carbon source. Because  $\alpha$ -L-fucosidase was produced in both media (glucose and galactose), the enzyme was produced constitutively.

These results agree with those reported by Rodríguez-Díaz *et al.* (2011), who observed that the  $\alpha$ -L-fucosidase of *L. casei* BL23 was intracellular because it lacks an N-terminal sequence that allows the enzyme to be secreted. Thus far, only three  $\alpha$ -L-fucosidases (A1fA, A1fB y A1fC) encoded in the genome of *L. casei* BL23 have been cloned and characterized. These enzymes have different abilities to hydrolyse fucosyl-HMOs: A1fA only hydrolysed 6-fucosyl-glucosamine, whereas A1fB hydrolysed antigen H disaccharide (Fuc<sub>1</sub>-2Gal), H antigen type II trisaccharide (Fuc<sub>1</sub>-2Gal<sub>1</sub>-4GlcNAc), 2'-fucosyl-lactose, 3'-fucosyl-glucosamine

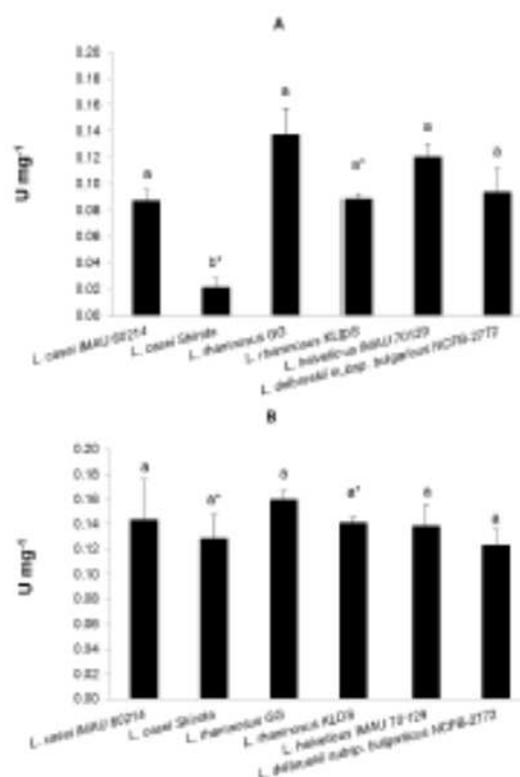


Fig. 3. Cell-associated  $\alpha$ -L-fucosidase activity produced by *Lactobacillus* using glucose (A) and galactose (B) as a carbon source. Cellular bottoms of the different fermentations were resuspended in phosphate buffer for cell-associated activity. The reaction was carried out for 120 min at 37 °C, employing 3.5 mM pNP-F solution. Different letters indicate significant differences within the same carbon source. (\*) Significant difference between specific activities produced in different carbon sources.

and 4'-fucosyl-glucosamine. A1fC hydrolysed 6'-fucosyl-glucosamine, 3'-fucosyl-glucosamine and 4'-fucosyl-glucosamine.

Escamilla-Lozano *et al.* / Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 14, No. 3 (2015) 623-629

The results obtained here and in the previous reports of Rodríguez-Díaz *et al.* (2011, 2012) suggest that LAB produce  $\alpha$ -L-fucosidases to hydrolyse HMOs containing fucose in order to use only the non-fucose moiety. This action confers advantages to LAB over other microorganisms in the gut, making FUCOs highly selective prebiotics. This same advantage occurs in bifidobacteria (Sela, 2011).

The genus *Lactobacillus* is an important part of the healthy microbiota installed in the human gastrointestinal tract. A healthy gut in infants is largely due to the presence of these microorganisms. Human milk consumption during lactation promotes the proliferation of *lactobacilli* in the gastrointestinal tract because it provides nutrients as prebiotic HMOs. The metabolism of HMOs indicates that colonic bacteria must be able to synthesize enzymes such as fucosidases that assist in the assimilation of these complex sugars.

In summary, the six *Lactobacillus* strains studied produce  $\alpha$ -L-fucosidase constitutively as a cell-associated enzyme, and all strains grew on lactose and glucose whereas that fucose utilization was absent.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge to the National Council for Science and Technology (CONACyT) of Mexico for a graduate scholarship (234678) and financial support for this project (180438).

### References

- Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H. and Katayama, T. (2009). Two distinct  $\alpha$ -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology* 19, 1010-1017.
- Bode, L. (2009). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22, 1147-1162.
- Cruz-Guerrero, A., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. and Figueroa-González, I. (2014). Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 2246-2252.
- Chaturvedi, P., Warren, C., Altaye, M., Morrow, A., Ruiz-Palacios, G., Pickering L. and Newburg, D. (2001). Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* 11, 365-372.
- Hickey, M.W., Hillier, J. and Jago, G. R. (1986). Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 825-831.
- Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Murakami, M., Taylor, T., Igimi, S. and Hattori, M. (2009). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Journal of Bacteriology* 191, 7630-7631.
- Newburg, D. S. (2009). Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *Journal of Animal Science* 87, 26-34.
- Pokusheva, K., Fitzgerald, G. F. and Van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes and Nutrition* 6, 285-306.
- Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V. and Yebra, M. J. (2011). Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel  $\alpha$ -L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 703-705.
- Rodríguez-Díaz, J., Rubio, C. A. and Yebra, M. J. (2012). *Lactobacillus casei* ferments the N-acetylglucosamine moiety of fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 4613-4619.
- Schwab, C. and Ganzle, M. (2011). Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters* 315, 141-148.
- Sela, A. D. (2011). Bifidobacterial utilization of human milk oligosaccharides. *International Journal of Food Microbiology* 149, 58-64.

*Escamilla-Lozano et al./ Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 14, No. 3 (2015) 623-629*

- Shoaf- Swaeney., K. D. and Hutkins, R. W. (2009). Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host. *Advances in Food and Nutrition Research* 55, 101-161.
- Tsai, Y. K. and Lin, T. H. (2006). Sequence, organization, transcription and regulation of lactose and galactose operons in *Lactobacillus rhamnosus* TCELL-1. *Journal of Applied Microbiology* 100, 446-59.
- Ward, R. E, Nihonuevo, M., Mills, D., Lebrilla, C. B. and German, J. B. (2007). *in vitro* fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 1398-1405.
- Zourari, A., Accolas, J. P. and Desmazeaud, M. J. (1992). Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Le Lait* 72, 1-34.

## 10. Anexos

### Anexo 1: Curvas patrón de carbohidratos

Nota: Para la cuantificación de consumo de fuente de carbono. Se empleó un HPLC con una bomba LAB Alliance y detector Light Scattering PL-ELS1000. Se utilizó una columna Rezex RHM- monosacáridos 300 x 7.8, 8  $\mu\text{m}$

Concentración de galactosa  $y = 24470x - 926.32$

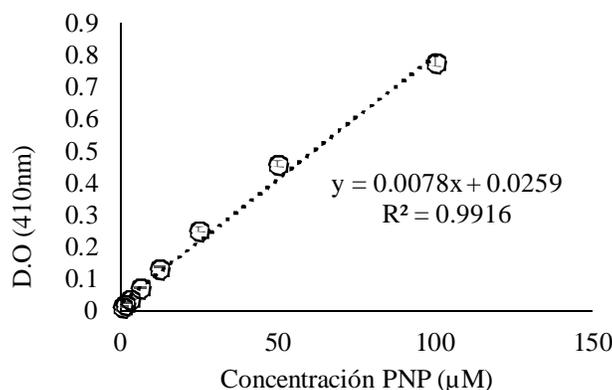
Concentración de glucosa  $y = 25043x - 1410.1$

Concentración de fucosa  $y = 10115x - 108.92$

Donde  $x$  = concentración en mg/mL;  $y$  = área en mv/s

### Anexo 2: Curva patrón de p-nitrofenol 1.

Nota: Se preparó una solución de pNP 1mM en buffer de fosfatos 0.1 M (pH7) y a partir de ella se realizaron diluciones.

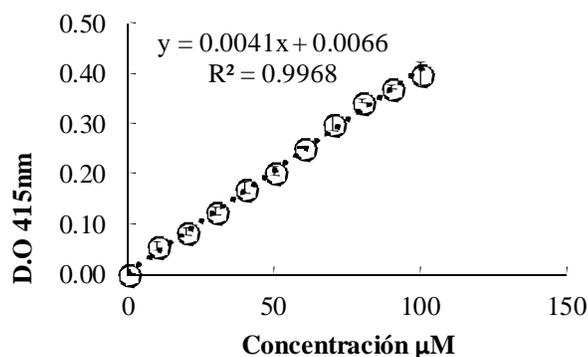


$$\text{Concentración pNP}[\mu\text{M}] = \frac{D.O_{410} - 0.0259}{0.0078}$$

$$\epsilon_{\text{pH7}} = 7.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

### Anexo 3. Curva patrón de p-nitrofenol 2.

La curva se preparó a partir de una solución madre de pNP a concentración de 1 mM (buffer de fosfatos 0.1 M y pH7) y fue alcalinizada con NaOH hasta alcanzar un pH de 9.5. La lectura de densidad óptica se realizó en un lector de microplacas Elx 808IU (BioTeck Instruments, Inc. E.U.A) a 415nm.

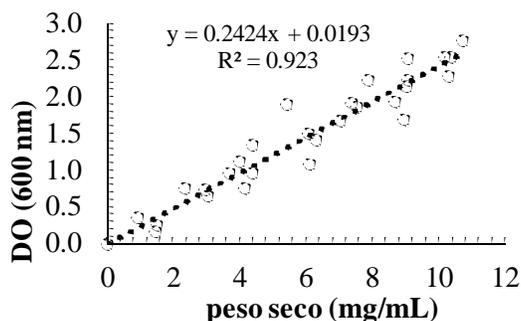


$$\text{Concentración pNP}[\text{mM}] = \frac{D.O_{410} - 0.066}{4.0618}$$

$$\epsilon_{pH9.5} = 4.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

#### Anexo 4: Curva patrón de peso seco de lactobacilos.

Nota: La curva se preparó a partir de lactobacilos crecidos durante 24 h. Se prepararon diluciones en tubos con un volumen total de 14 mL y fueron filtrados en membranas de 0.2 µm puestas previamente a peso constante (110 °C). La densidad óptica fue determinada a  $\lambda=600$  nm.



$$\text{Peso seco} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{D.O_{600} - 0.019}{0.2424}$$

#### Anexo 5: Curvas patrón de carbohidratos 2.

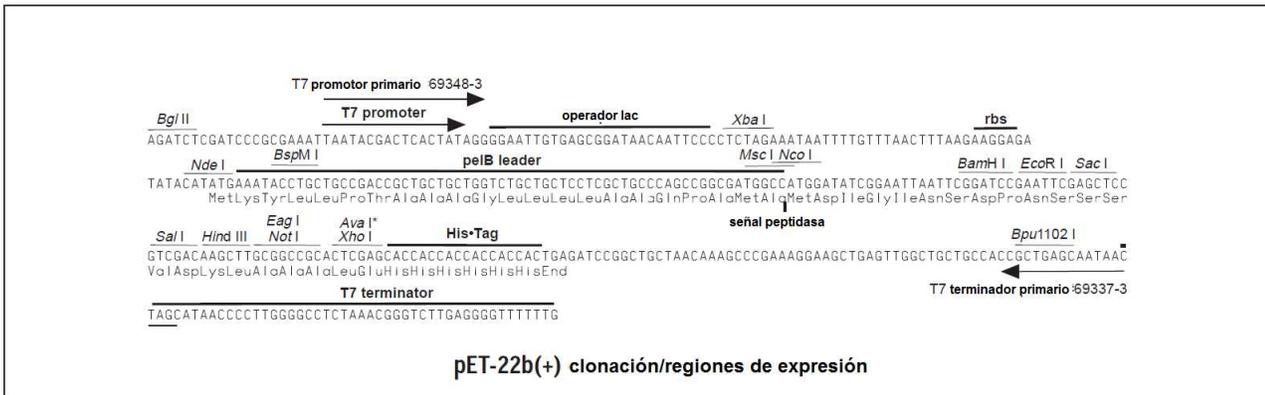
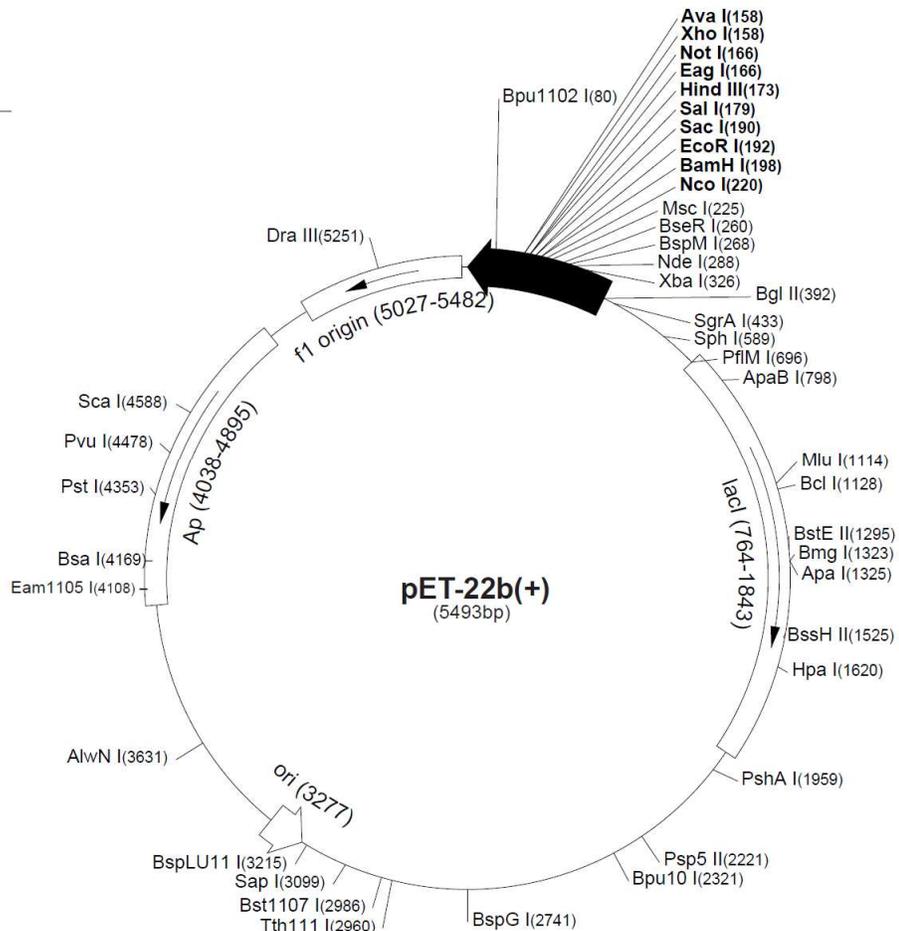
Nota: empleada para la cuantificación de productos de reacción. El análisis de productos se realizó mediante HPLC con una bomba LAB y detector Light Scattering Model 300S. Se utilizó una columna Hamilton HC 75H+, 305 x 7.75, 9 µm.

Concentración de lactosa	$y = 10699 x - 209.55$
Concentración de glucosa	$y = 17407 x - 498.63$
Concentración de galactosa	$y = 26972 x - 480.66$
Concentración de fucosa	$y = 12759 x - 192.77$
Concentración de rafinosa	$y = 11626 x - 552.13$

Donde x = concentración en mg/mL ;      y = área en mv/s

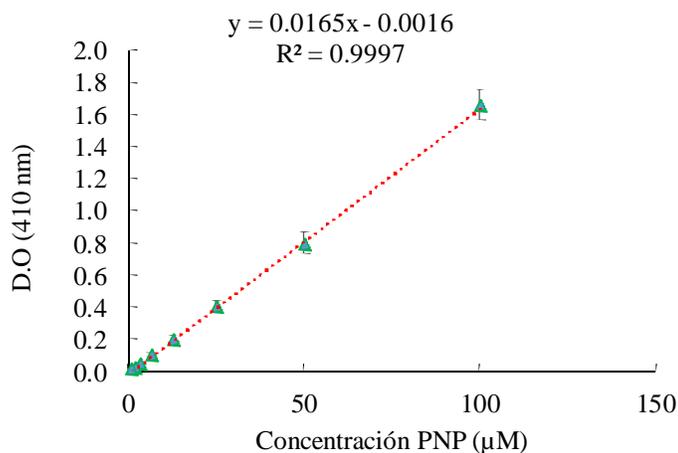
**Anexo 6:** Construcción del vector. pET-22b empleado en la clonación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. marítima*; lleva una secuencia N-terminal de señal pelB para la localización periplásmica.

pET-22b(+)	
T7 promotor	361-377
T7 inicio de transcripción	360
pelB secuencia de codificación	224-289
múltiples sitios de clonación	
(NcoI - XhoI)	158-225
His•Tag secuencia	140-157
T7 terminador	26-72
lacI secuencia	764-1843
pBR322 origen	3277
bla secuencia	4038-4895
f1 origen	5027-5482



**Anexo 7:** Curva Patrón de 4-nitrofenol 3.

Nota: para la cuantificación de actividad enzimática de *T. marítima* recombinante. Se realizó en solución amortiguadora de citrato-fosfato (pH 5)



Nota: para el empleo de la curva patrón de pNP se consideró la solución amortiguador y pH. Por tanto se emplearon los siguientes coeficientes de extinción para el pNP.

En fosfatos a pH 7	$\epsilon_{\text{pNP}} = 7.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	a
	$\epsilon_{\text{pNP}} = 17.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	b
En citrato-fosfato a pH 5	$\epsilon_{\text{pNP}} = 0.399 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	a
	$\epsilon_{\text{pNP}} = 16.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	b

a: cuando las cinéticas se realizaron directamente en las celdas del espectrofotómetro

b: cuando la reacción fue detenida adicionando NaOH

**Anexo 7:** Curva patrón de seroalbúmina elaborada por el método de Bradford.

$$\text{Concentración de proteína } (\mu\text{g/mL}) = (\text{D.O}_{595} - 0.0141)/0.044$$