



Síntesis de fucosil-oligosacáridos, evaluación de sus propiedades bioactivas y caracterización de sus rutas metabólicas en *Lactobacillus*

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

JIMMY EVERTH BECERRA ENRIQUEZ

Dirigida por:

Dra. María Jesús Yebra Yebra

Dr. Vicente Monedero García

Tutelada por:

Dra. Rosa Aznar Novella

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Universidad de Valencia

VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2016



La Dra. **M^a Jesús Yebra Yebra** y el Dr. **Vicente Monedero García**, ambos Científicos Titulares del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos:

CERTIFICAN QUE:

Don **JIMMY EVERTH BECERRA ENRÍQUEZ**, Licenciado en Biología por la Universidad del Valle (Colombia), ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que tiene por título “**Síntesis de fucosil-oligosacáridos, evaluación de sus propiedades bioactivas y caracterización de sus rutas metabólicas en *Lactobacillus***”, que reúne los requisitos necesarios para optar el grado de Doctor en el programa de Biomedicina y Biotecnología por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Paterna (Valencia), a 20 de Septiembre de 2016.

Dra. M^a Jesús Yebra Yebra

Dr. Vicente Monedero García



La Dra. **Rosa Aznar Novella**, Catedrática de Microbiología de la Universidad de Valencia:

CERTIFICA QUE:

Don **JIMMY EVERTH BECERRA ENRÍQUEZ**, Licenciado en Biología por la Universidad del Valle (Colombia), ha realizado bajo mi tutela el trabajo que tiene por título “**Síntesis de fucosil-oligosacáridos, evaluación de sus propiedades bioactivas y caracterización de sus rutas metabólicas en *Lactobacillus***”, que reúne los requisitos necesarios para optar el grado de Doctor en el programa de Biomedicina y Biotecnología por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Paterna (Valencia), a 20 de Septiembre de 2016.

Dra. Rosa Aznar Novella

A mis padres y hermanos

“Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida.”

Arthur Scnitzler.

AGRADECIMIENTOS

Después de una larga trayectoria en el recorrido de esta importante etapa de mi vida, ha llegado el momento de expresar mis más sinceros agradecimientos. En todo este tiempo tuve la oportunidad de compartir con personas maravillosas y de vivir experiencias inolvidables. Por todo ello y antes que todo quiero dar las gracias a Dios, que desde siempre me ha proporcionado un crecimiento espiritual y personal, lo cual me ha permitido lograr cada meta a la que me he propuesto.

Al programa de becas SANTIAGO GRISOLIA por haberme concedido la beca que me permitió el sostenimiento durante gran parte de mi estancia aquí en España para la realización de mis estudios de Doctorado.

A la Dra. M^a Jesús Yebra, por la oportunidad que me brindó de pertenecer a su magnífico grupo de investigación y dirigir mi Tesis Doctoral, por sus enseñanzas y orientaciones científicas, por su disponibilidad total para atender cualquier duda o inquietud sobre los experimentos que llevaba entre manos, por contribuir enormemente en mi formación personal y profesional; por todo su apoyo... infinitas gracias.

Al Dr. Vicente Monedero, quien también dirigió mi Tesis Doctoral. Gracias por toda su entrega y disposición para trasmitirme sus conocimientos científicos, por sus claras explicaciones, porque de forma muy sencilla era capaz de hacerme entender muchos de los mecanismos moleculares principalmente en bacterias lácticas. Gracias Vicente, porque además de que eres un gran científico eres una gran persona, gracias por pensar en este extranjero, por preocuparte en que necesitaba sobrevivir desde el tiempo en que se me terminó la beca. Gracias por TODO.

A la Dra. Rosa Aznar, por ser mi tutora y estar siempre dispuesta a firmar los documentos requeridos por la Universidad y por ayudarme con los trámites necesarios.

A los demás investigadores del laboratorio de bacterias lácticas: Gaspar, Manolo y M^a Carmen, que de una u otra forma durante mi larga estancia en este magnífico grupo de investigación realizaron aportes valiosos a mi formación profesional.

A Gonzalo, mi compañero de lab, con quien compartí bancada durante estos 4 años, por las mutuas ayudas en los experimentos, por los viajes que realizamos juntos a los congresos, por las paellas, el volley y por todo lo vivido aquí en Valencia.

A mis otros compañeros del lab: Christine, Pepe, Cristina, Álvaro, Izaskun. De cada uno de ellos he aprendido muchas cosas no solo académicas sino también de sus experiencias de vida. Ah... no se me olvida! Amalia, Ainhoa, Jesús y Antonio aunque ya no están en el lab, ellos también hacen parte de esta historia.

A todos los estudiantes de prácticas que han pasado por el lab, especialmente a quienes tuve la oportunidad de enseñarles algo de mi poca experiencia científica porque de ellos también pude aprender mucho.

A los de lab de enzimas: Julia, Lola, David, Mery, Antonio...Gracias por todos los momentos compartidos, principalmente en la hora de la comida.

A todos con quien coincidí mi estancia en Valencia y principalmente con los que construí lazos de amistad. A Edel, mi gran amigo, que siempre ha estado en las buenas y en las malas, quien te ha ayudado a salir de los momentos difíciles y te ha dicho “ánimo, esto tiene solución”. Gracias por tantos favores, por las largas charlas con o sin birras, por los viajes juntos a Berlín, Amsterdam, Praga y otros cuantos aquí en España, gracias por tanto, gracias por ser mi AMIGO. A Emanuel, por los momentos compartidos, por el buen sentido del humor, por los favores, por los viajes dentro y fuera de España, por tu amistad... Gracias. A los demás... Daniel, Bruno, Javi, Miguel y todos los del fútbol, por los gratos momentos.

A mis viejos amigos...Principalmente a William, Tania y Alejandra, por tantas experiencias vividas, porque a pesar de las distancias, la amistad sigue intacta.

A Luz Adriana, a quien tuve la oportunidad de conocer mientras realizaba mi trabajo fin de carrera en el CIV (Centro Internacional de Vacunas), y a quien le debo millones de gracias por ayudarme a que este sueño ya sea una realidad. Gracias Luz Adriana por tu gran generosidad, por creer en mí y sobre todo por brindarme todo el apoyo incondicional. A tu querida madre Cristina, un agradecimiento especial por todas sus atenciones, por su preocupación en que todo me salga bien, por su espíritu humanitario, por hacerme sentir como en casa mientras estuve en Bogotá. Gracias Doña Cristina.

A mi familia, mis padres, hermanos y sobrinos. Todos han sido mi fortaleza para alcanzar cada logro al que me he propuesto. A mi madre, quien me ha entregado todo su amor, quien se ha desvelado pensando en que todo me salga bien, quien ha hecho un gran sacrificio por darme lo mejor, quien disfruta y se enorgullece por mis metas alcanzadas, quien espera con ansias mi regreso y de quien estoy inmensamente orgulloso. Mis hermanos que han estado pendientes en todo momento de mi bienestar, especialmente mi hermano Ovidio, quien desde que inicié la carrera de Biología hasta ahora siempre estuvo apoyándome, quien lo ha dado todo por verme crecer profesionalmente, por los momentos compartidos y por ser uno de los pilares fundamentales de nuestra familia.

A ti mi Linda Lore, Mil gracias por todos los momentos compartidos, por tu apoyo incondicional y por lo especial que has sido y sigues siendo en mi vida. Al igual, gracias a toda tu familia, especialmente a tu madre que siempre estuvo atenta a lo que necesitaba, por brindarme las meriendas de las tardes cuando estaba en casa, por las largas historias y anécdotas compartidas, por TODO este tiempo GRACIAS, GRACIAS Y GRACIAS.

Y finalmente, a mis demás familiares y amigos que de una u otra forma han contribuido durante este largo proceso.

Resumen

Los fucosil-oligosacáridos (FUS) son carbohidratos que contienen fucosa y constituyen más del 50% de los oligosacáridos libres presentes en la leche humana, sin embargo su función fisiológica es mayormente desconocida. Los FUS forman parte también de muchos glico-complejos presentes en las mucosas y en la superficie de células eucariotas. Se ha evidenciado que las características estructurales que presentan estos carbohidratos se relacionan con funciones biológicas importantes, entre las cuales destacan el efecto prebiótico y la actividad anti-adhesiva contra patógenos intestinales.

A pesar de que la participación de los FUS en muchas funciones biológicas es esencial, éstos permanecen relativamente inaccesibles a la investigación científica y farmacéutica debido a las dificultades inherentes a su síntesis. Por lo tanto, los objetivos generales que se abordan en este trabajo son la producción y purificación de FUS a escala semi-preparativa mediante síntesis enzimática, la determinación de sus propiedades bioactivas (efecto prebiótico y actividad anti-adhesina) y el estudio de las rutas metabólicas implicadas en la utilización de estos carbohidratos y sus monosacáridos constituyentes (L-fucosa) en microorganismos probióticos.

Las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC aisladas de *Lactobacillus casei* se han utilizado previamente en reacciones de transfucosilación para sintetizar los disacáridos fucosil- α 1,3-*N*-acetilglucosamina (Fuc- α 1,3-GlcNAc) y fucosil- α 1,6-*N*-acetilglucosamina (Fuc- α 1,6-GlcNAc), que forman parte de glicanos presentes en la leche humana. En esta Tesis Doctoral se han escalado esas reacciones y se han purificado los disacáridos mediante cromatografía semi-preparativa, obteniéndose unos rendimientos del 30% para el Fuc- α 1,3-GlcNAc y del 65% para el Fuc- α 1,6-GlcNAc. AlfC se ha utilizado además en reacciones de transfucosilación con azúcares aceptores diferentes a la GlcNAc, obteniéndose los siguientes FUS: el glicoaminoácido fucosil- α 1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina (Fuc- GlcNAc-Asn), los disacáridos fucosil-glucosa, fucosil-galactosa y el trisacárido fucosil-*N,N'*-diacetilquitobiosa. Por otro lado, mediante mutagénesis aleatoria y dirigida se obtuvieron 18 variantes de la enzima AlfB. Cuatro de ellas, los mutantes M58, M75, M78 y M79, presentaron un rendimiento de transfucosilación superior al 50% para la síntesis de Fuc- α 1,3-GlcNAc, destacando la variante M58 con la cual se logró obtener el máximo rendimiento posible (cerca al 100%), representando

una mejora del 70% con respecto a la enzima silvestre. Los dos fucosil-GlcNAc disacáridos sintetizados se utilizaron para evaluar el potencial efecto prebiótico en diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Se observó que 6 de las 11 cepas ensayadas de *Lactobacillus casei*, y 2 de las 6 cepas ensayadas de *Lactobacillus rhamnosus* fueron capaces de fermentar el disacárido Fuc- α 1,3-GlcNAc. Además, la cepas BL87 de *L. casei* y BL327 de *L. rhamnosus* fermentaron Fuc- α 1,6-GlcNAc. Las especies *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* también metabolizaron el disacárido Fuc- α 1,3-GlcNAc. A su vez, ambos fucosil-disacáridos se ensayaron por su potencial anti-adhesivo frente a cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* (EPEC) aisladas de niños con gastroenteritis. Se observó que ambos disacáridos inhiben la adhesión en diferentes niveles de algunas cepas EPEC a células epiteliales humanas (línea HT-29).

La cepa probiótica *L. rhamnosus* GG (LGG) es capaz de utilizar la L-fucosa como fuente de carbono y en su metabolismo está implicado el operon *fuc*, que contiene genes que codifican para una permeasa de L-fucosa (*fucP*), para la ruta catabólica de esta hexosa (*fucI*, *fucK*, *fucU* y *fucA*) y para un regulador transcripcional (*fucR*). Análisis transcripcionales demostraron que el operon *fuc* está inducido por L-fucosa a través de FucR, que actúa como un activador transcripcional. LGG metaboliza el disacárido Fuc- α 1,3-GlcNAc y a diferencia de otros lactobacilos que excretan la L-fucosa al medio, la presencia del operon *fuc* le permite utilizar la L-fucosa que forma parte de ese disacárido. Por último, se ha demostrado que la cepa *L. casei* BL23 es capaz de utilizar el glicoaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn sintetizado aquí y que el operón *alf2* está implicado en su metabolismo. Este operón contiene los genes *alfHC*, que codifican para una permeasa y para la α -L-fucosidasa AlfC mencionada arriba, respectivamente, y en dirección opuesta se encuentran los genes anotados como *asdA*, *alfR2*, *pepV*, *asnA2* y *sugK* que codifican para las siguientes proteínas hipotéticas: una aspartato descarboxilasa/aminotransferasa, un regulador transcripcional, una peptidasa V, una glicosilasparaginasa y una azúcar quinasa, respectivamente. Análisis fenotípicos de mutantes para esos genes y análisis transcripcionales sugirieron que ambos *clusters* de genes están inducidos por el Fuc-GlcNAc-Asn a través de la inactivación del represor AlfR2.

El conjunto de todos estos resultados demuestra que la capacidad de algunos lactobacilos para adaptarse al tracto gastrointestinal humano se correlaciona en parte

con la presencia de genes involucrados en el transporte y catabolismo de FUS, los cuales son abundantes en este nicho particular. Además, las α -L-fucosidasas de *L.casei* BL23, responsables de la hidrólisis de estos compuestos fucosilados, también han mostrado ser altamente eficientes en su síntesis. Esto ha permitido determinar su potencial prebiótico con diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como también su actividad antiadhesiva contra patógenos intestinales.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

	<u>Pag.</u>
1 Oligosacáridos y su importancia biológica	1
2 Oligosacáridos de la leche humana (OLH)	2
2.1 Beneficios de los oligosacáridos fucosilados (FUS).....	3
2.2 FUS como anti-adhesinas.....	5
2.3 FUS como prebióticos.....	6
3 Bacterias intestinales	7
3.1 Bacterias lácticas: <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>	10
3.1.1 <i>Bifidobacterium</i>	10
3.1.2 <i>Lactobacillus</i>	11
4 <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> en la leche humana	12
5 Probióticos.....	13
6 Metabolismo de carbohidratos por bacterias intestinales.....	13
6.1 Mecanismos de transporte y utilización de carbohidratos.....	14
6.2 Metabolismo de L-fucosa.....	16
6.2.1 Metabolismo de la L-fucosa por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG)...	19
6.3 Metabolismo de fucosil-oligosacáridos (FUS).....	20
6.3.1 Transporte y metabolismo de fucosil- α -1,3-GlcNAc por <i>L. casei</i> BL23 .	21
6.4 Metabolismo de <i>N</i> -glicanos fucosilados.....	23
7 Oligosacáridos en la leche de otros mamíferos y fórmulas infantiles.....	26
8 Síntesis de compuestos fucosilados en el laboratorio	27
8.1 Glicosiltransferasas (GTs) y glicosilhidrolasas (GHs).....	28
8.2 Reacción de transglicosilación con α -L-fucosidasas.....	32
8.3 Mutagénesis de α -L-fucosidasas.....	32

OBJETIVOS

Objetivo general	37
Objetivos específicos.....	37

MATERIALES Y MÉTODOS

1	α -L-fucosidasas de <i>L. casei</i> BL23: actividad de hidrólisis y transfucosilación.....	41
1.1	Actividad de hidrólisis.....	41
1.1.1	Parámetros cinéticos.....	41
1.2	Reacciones de transfucosilación para la síntesis de FUS.....	42
1.3	Síntesis a escala semi-preparativa.....	42
1.4	Análisis por HPLC con columna analítica.....	43
1.5	Purificación de FUS por HPLC en columna semi-preparativa.....	43
1.6	Cuantificación de compuestos fucosilados.....	44
1.7	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	44
2	Medios de cultivos y condiciones de crecimiento.....	45
2.1	Cultivo de cepas en medio MRS complejo.....	45
2.2	Cultivo en medio MRS de fermentación.....	45
3	Cultivo de cepas de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> en MRS basal.....	46
3.1	Curvas de crecimiento de <i>Lactobacillus</i>	46
3.2	Cultivos de cepas de <i>Bifidobacterium</i>	48
4	Cultivo de cepas de <i>E. coli</i> para clonación.....	48
5	Cultivo de cepas de <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) para ensayos de antiadherencia.....	48
5.1	Cultivo de células HT-29.....	49
6	Análisis de azúcares y metabolitos en los sobrenadantes de los cultivos.....	49
7	Análisis por <i>Southern blot</i> en cepas de <i>Lactobacillus</i>	50
7.1	Síntesis de sondas y detección por hibridación.....	50
8	Ensayos de anti-adherencia.....	51
8.1	Detección de la adherencia por fluorescencia.....	52
9	Análisis estadístico.....	53
10	Construcción de mutantes.....	53
10.1	Oligonucleótidos.....	53
10.2	Construcción de plásmidos recombinantes con genes de <i>L. rhamnosus</i> GG (LGG).....	53
10.3	Construcción de plásmidos recombinantes con genes de <i>L. casei</i> BL23.....	55
11	Transformación.....	58
11.1	Transformación de <i>E. coli</i>	58

11.2	Transformación de <i>L. rhamnosus</i> GG (LGG).....	60
11.3	Transformación de <i>L. casei</i>	61
12	Expresión y purificación de proteínas.....	62
13	Análisis de la expresión de los genes por RT-qPCR.....	63
13.1	Extracción de RNA.....	63
13.2	RT-qPCR.....	64
14	Ensayos de retardo en gel.....	65
15	Análisis de secuencias.....	67
16	Técnicas generales.....	67
16.1	Extracción de DNA genómico.....	67
16.2	Extracción de DNA plasmídico.....	68
16.3	Preparación de células electrocompetentes.....	68
16.3.1	<i>E. coli</i>	68
16.3.2	<i>L. rhamnosus</i> GG.....	68
16.3.3	<i>L. casei</i> BL23.....	69
16.4	Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	69
16.5	Enzimas de restricción y ligación.....	70
16.6	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	70
16.7	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS).....	71
16.8	Tinción de geles de proteínas con azul de Coomassie.....	71

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

Síntesis de fucosil-oligosacáridos (FUS) mediante actividad de transfucosilación de las α -L-fucosidasas de *L. casei* BL23

1	Actividad de transfucosilación con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC.....	77
2	Síntesis del glicoaminoácido Fucosil- α -1,6- <i>N</i> -acetilglucosamina-Asn (Fuc-GlcNAc-Asn).....	78
3	Producción y purificación de FUS a escala semi-preparativa.....	82
3.1	Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc.....	82
3.1	Fucosil-glucosa, Fucosil-galactosa y Fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa.....	83
3.2	Fuc-GlcNAc-Asn.....	84

4	Mejora de la actividad de tranfucosilación de la α -L-fucosidasa AlfB.....	86
4.1	Mutagénesis aleatoria y selección de variantes AlfB.....	86
4.2	Análisis cinéticos de la actividad de hidrólisis de las variantes de la α -L-fucosidasa AlfB.....	86
4.3	Actividad de tranfucosilación de las variantes de la α -L-fucosidasa AlfB....	88
5	Mutagénesis dirigida a partir de la variante M58 de la α -L-fucosidasa AlfB	90
5.1	Actividad de tranfucosilación de los mutantes derivados de M58 AlfB.....	92
	Discusión	94

CAPITULO II

Determinación de las propiedades bioactivas de los fucosil-oligosacáridos (FUS)

1	Potencial prebiótico.....	101
1.1	Fermentación de disacáridos fucosil- <i>N</i> -acetilglucosamina por cepas de <i>Lactobacillus</i>	101
1.2	Fermentación de disacáridos fucosil- <i>N</i> -acetilglucosamina por cepas de <i>Bifidobacterium</i>	104
1.3	Análisis de azúcares en los sobrenadantes de los medios de cultivo.....	104
2	Presencia de genes homólogos para <i>alfB</i> y <i>alfC</i> en cepas de <i>Lactobacillus</i>	107
3	Inhibición de la adherencia de bacterias enteropatógenas <i>E. coli</i> (EPEC) por disacáridos fucosil- <i>N</i> -acetilglucosamina	108
	Discusión	112

CAPITULO III

Análisis molecular y funcional del operon implicado en la utilización de L-fucosa en *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)

1	Genes involucrados en el catabolismo de L-fucosa	121
1.1	Operón <i>fuc</i> de LGG.....	121
1.2	Genes <i>fuc</i> en <i>E. coli</i> y otras bacterias intestinales homólogos a los de LGG.	121
1.3	Genes <i>fuc</i> en otras especies de <i>Lactobacillus</i>	123
2	La mutación en genes catabólicos <i>fuc</i> impide el crecimiento en L-fucosa	124
2.1	Análisis de fenotipos.....	124
2.1.1	Crecimiento de LGG con L-fucosa	124
2.2	Crecimiento de LGG con Fuc- α -1,3-GlcNAc.....	125
3	Expresión de los genes <i>fuc</i> en LGG en presencia de L-fucosa	128

4	Expresión de los genes <i>fuc</i> en LGG en presencia de Fuc- α 1,3-GlcNAc	129
5	Regiones promotoras del operón <i>fuc</i>	130
6	El catabolismo de L-fucosa permite la producción de 1,2-propanodiol en LGG .	132
	Discusión	134

CAPITULO IV

Análisis molecular y funcional del operón implicado en la utilización del glicoaminoácido fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina en *Lactobacillus casei* BL23

1	Operón <i>alf2</i> de <i>L. casei</i> BL23	141
2	Genes homólogos a los del operón <i>alf2</i> presente en otras especies	142
3	Análisis fenotípico de los mutantes del operón <i>alf2</i>	144
3.1	El gen <i>alfR2</i> codifica para un represor transcripcional.....	144
3.2	La permeasa AlfH y la α -L-fucosidasa AlfC están implicadas en la utilización de Fuc-GlcNAc-Asn y otros compuestos fucosilados.....	147
3.3	La función de la putativa quinasa (SugK) puede ser sustituida por otra enzima.....	149
4	Ruta catabólica propuesta para el glicoaminoácido fucosil- α -1,6- <i>N</i> -acetilglucosamina-asparagina en <i>Lactobacillus casei</i> BL23	150
	Discusión	154

CONCLUSIONES 165

BIBLIOGRAFÍA 169

ANEXOS 185

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efectos postulados de los oligosacáridos de la leche humana (OLH)..	4
Figura 2. Modelo de acción directa de los oligosacáridos en la prevención de infecciones..	6
Figura 3. Efecto prebiótico de oligosacáridos de la leche humana (OLH)..	7
Figura 4. Representación esquemática del intestino humano indicando sus diferentes regiones y las densidades microbianas en cada una de ellas..	8
Figura 5. Metabolismo de oligosacáridos de la leche humana y derivados en <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ..	18
Figura 6. Representación esquemática de grupos de genes para el catabolismo de L-fucosa en diferentes grupos de bacterias..	20
Figura 7. Modelo descrito para el transporte y metabolismo del disacárido fuc- α -1,3-GlcNAc en <i>L. casei</i> BL23..	22
Figura 8. Representación esquemática para la degradación de <i>N</i> -glicoproteínas de células eucariotas..	24
Figura 9. Representación esquemática de la estrategia de síntesis en glicoproteínas..	27
Figura 10. Mecanismos de reacción de glicosidasas..	31
Figura 11. Curvas patrón utilizadas para la cuantificación de azúcares..	44
Figura 12. Rendimiento en la síntesis de Fuc- α -1,3-GlcNAc (Fuc1,6NAG) y Fuc- α -1,6-GlcNAc (Fuc1,3NAG) mediante la actividad de transfucosilación..	77
Figura 13. Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RCM Monosaccharide) de las reacciones de transfucosilación con AlfC a diferentes tiempos..	79
Figura 14. Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RSO Oligosaccharide) de los productos de las reacciones de transfucosilación con AlfC y el substrato aceptor Fuc-Asn..	81
Figura 15. Espectros de RMN..	82
Figura 16. Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RCM Monosaccharide) de los productos de las reacciones de transfucosilación..	83
Figura 17. Análisis por HPLC de las reacciones de transfucosilación con AlfC..	84
Figura 18. Representación gráfica de la actividad de transfucosilación de los variantes de AlfB..	90
Figura 19. Purificación de proteínas mutantes AlfB..	91
Figura 20. Análisis de la actividad de transfucosilación de los variantes de AlfB M58..	93
Figura 21. Curvas de crecimiento de cepas de <i>Lactobacillus casei</i> ..	102
Figura 22. Curvas de crecimiento de cepas de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ..	102
Figura 23. Curvas de crecimiento de cepas de <i>Lactobacillus</i> que no utilizaron ninguno de los disacáridos..	103
Figura 24. Análisis por <i>Southern blot</i> ..	108
Figura 25. Inhibición de la adhesión de bacterias EPEC..	110
Figura 26. Inhibición de la adhesión de la cepa CECT 352 detectada por FISH..	111
Figura 27. Metabolismo de L-fucosa en LGG. lactaldehído puede seguir dos rutas diferentes, llevando a la producción de L-1,2-propanodiol o L-lactato..	122

Figura 28. Representación esquemática del operón <i>fuc</i> de LGG tipo silvestre y estructuras genéticas de los diferentes mutantes..	124
Figura 29. Crecimiento de LGG en L-fucosa. r.....	126
Figura 30. Crecimiento de LGG en Fuc- α -1,3-GlcNAc (Fuc1,3NAG)..	127
Figura 31. Análisis de los contenidos de L-fucosa en los sobrenadantes de <i>L. rhamnosus</i> cepa silvestre (WT) y mutantes <i>fucP</i> (MfucP), <i>fucI</i> (MfucI) y <i>fucR</i> (MfucR) cultivadas con el disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc.	128
Figura 32. Expresión de los genes <i>fuc</i> en LGG cultivada en L-fucosa..	129
Figura 33. Expresión de genes <i>fuc</i> en LGG cultivado en Fuc- α -1,3-GlcNAc (Fuc1,3NAG).....	130
Figura 34. Representación esquemática del operón <i>fuc</i> con las secuencias de las regiones promotoras (<i>fucA-fucR</i> y <i>fucI</i>) en LGG.....	131
Figura 35. Análisis de la unión de la proteína FucR a las regiones promotoras del operón <i>fuc</i> (<i>fucA-fucR</i> y <i>fucI</i>) en LGG..	132
Figura 36. Representación esquemática del operón <i>alf2</i> de <i>L. casei</i> BL23	141
Figura 37. Curva de crecimiento de <i>L. casei</i> BL23 en presencia de diferentes FUS. .	142
Figura 38. Análisis comparativo de la estructura génica del operón <i>alf2</i> en el grupo <i>L. casei</i> / <i>L. paracasei</i> / <i>L. rhamnosus</i>	143
Figura 39. Curvas de crecimiento de <i>L. casei</i> BL405 (mutante en <i>alfR2</i>) con distintas fuentes de carbono.....	145
Figura 40. Expresión de los genes <i>alf2</i> en <i>L. casei</i> BL23 y la cepa mutante <i>alfR2</i> con distintas fuentes de carbono.....	146
Figura 41. Representación esquemática del operón <i>alf2</i> de <i>L. casei</i> BL23 silvestre y estructura genética de los diferentes mutantes..	147
Figura 42. Curvas de crecimiento de <i>L. casei</i> dobles mutantes BL406 (<i>alfR2/alfC</i>) y BL407 (<i>alfR2/alfH</i>)..	148
Figura 43. Curvas de crecimiento de <i>L. casei</i> mutante (BL405; Δ <i>alfR2</i>) y doble mutante (BL408; (Δ <i>alfR2-sugK</i>)..	150
Figura 44. Ruta catabólica propuesta para la utilización de componentes fucosilados de glicoproteínas en <i>L. casei</i> BL23..	153

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de microorganismos dominantes (autóctonos y alóctonos) en los principales hábitats del tracto gastrointestinal humano (TGIH).....	10
Tabla 2. Lista de cepas de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> usadas en este estudio.....	47
Tabla 3. Lista de cepas <i>E. coli</i> usadas en los ensayos de anti-adherencia.....	49
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo para clonación.....	54
Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	57
Tabla 6. Cepas <i>E. coli</i> usadas en transformación con plásmidos recombinantes para inactivación de genes y expresión de proteínas.....	59
Tabla 7. Cepas mutantes generadas a partir de <i>L. rhamnosus</i> GG (LGG) y <i>L. casei</i> BL23.....	62
Tabla 8. Oligonucleótidos usados en este trabajo para RT-qPCR.....	66
Tabla 9. Oligonucleótidos usados en este trabajo para ensayos de retardo en gel y síntesis de sondas para <i>Southern blot</i>	66
Tabla 10. Compuestos sintetizados con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC.....	85
Tabla 11. Variantes de α -L-fucosidasa AlfB, indicando el número de mutaciones, tipo de mutación y posición en la que se ha generado.....	87
Tabla 12. Parámetros cinéticos de los variantes de α -L-fucosidasa AlfB, comparado con los valores de la AlfB silvestre.....	88
Tabla 13. Rendimiento expresado en porcentaje en la actividad de transfucosilación para la síntesis de Fuc- α -1,3-GlcNAc con cada una de las variantes AlfB y la enzima silvestre.....	89
Tabla 14. Parámetros cinéticos de los variantes de M58 AlfB.....	92
Tabla 15. Valores de pH de sobrenadantes de cultivo de cepas de <i>Bifidobacterium</i> . Los cultivos se realizaron en MRS basal suplementado con carbohidratos.....	104
Tabla 16. Presencia de azúcares en los sobrenadantes de los medios de cultivo.....	106
Tabla 17. Porcentaje de inhibición con cada uno de los FUS y sus componentes.....	109
Tabla 18. Formación de productos y características de crecimiento de LGG con L-fucosa o D-glucosa bajo diferentes condiciones.....	133

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Estructura 3D obtenida por cristalización y difracción de rayos X de la variante M58 procedente de la α -L-fucosidasa AlfB de <i>L. casei</i> BL23.	187
Anexo 2. Estructura 3D obtenida por cristalización y difracción de rayos X de la α -L-fucosidasa AlfC de <i>L. casei</i> BL23.	188
Anexo 3. Secuencia de la variante M58 procedente de la α -L-fucosidasa AlfB de <i>L. casei</i> BL23.	190
Anexo 4. Secuencia del gen <i>fucP</i> de <i>L. rhamnous</i> GG silvestre (verde) y mutante obtenido mediante una delección de 963 pb (roja).	192
Anexo 5. Secuencia del gen <i>fucI</i> de <i>L. rhamnous</i> GG silvestre (verde) y mutante obtenido mediante <i>frameshift</i> (roja).	194
Anexo 6. Secuencia del gen <i>fucR</i> de <i>L. rhamnous</i> GG silvestre (verde) y mutante obtenido por una inserción con el plásmido pRV300 (roja).	195
Anexo 7. Secuencia del gen <i>alfR2</i> de <i>L. casei</i> BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una delección de 466 pb (roja).	196
Anexo 8. Secuencia del gen <i>alfH</i> de <i>L. casei</i> BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una <i>frameshift</i> (roja).	198
Anexo 9. Secuencia del gen <i>alfC</i> de <i>L. casei</i> BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una inserción del plásmido pRV300 (roja).	200
Anexo 10. Secuencia del gen <i>sugK</i> de <i>L. casei</i> BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una inserción del plásmido pRV300 (roja).	202

ABREVIATURAS

2'-FL: 2'-fucosillactosa

3'-FL: 3'-fucosillactosa

ABC: *ATP-Binding-Cassette*

AlfB: α -L-fucosidasa B

AlfC: α -L-fucosidasa C

CcpA: proteína de control de catabolito A

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CT: *Cycle Threshold*

DAQ: N,N'-diacetilquitobiosa

DHAP: *dihydroxiacetone phosphate*

DTT: dithiothreitol

E-b/O: *Effector-binding/Oligamerization*

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica

F6P: fructosa 6-fosfato

FOS: fructooligosacáridos

Fuc: fucosa

Fuc-DAQ: fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa

Fuc-Gal: fucosil-galactosa

Fuc-GlcNAc-Asn: fucosil- α 1,6-N-acetilglucosamina-asparagina

Fuc-Glu: fucosil-glucosa

Fuc- α 1,3-GlcNAc: fucosil- α 1,3-N-acetilglucosamina

Fuc- α 1,6-GlcNAc: fucosil- α 1,6-N-acetilglucosamina

FUS: fucosil-oligosacáridos

FUT: fucosiltransferasa

G6P: glucosa 6-fosfato

GA-3P: gliceraldehido 3- fosfato

Gal: galactosa

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GDP-L-fucosa: Guanosina difosfato L-fucosa

GH: glicosil hidrolasa

Glc: glucosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

GlcNAc-Asn: 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosil-L-asparagina

GNB: Galacto-N-biosa

GOS: galactooligosacáridos

GT: Glicosil transferasa

HTH: *helix-turn-helix*

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

Lac: Lactosa

LB: Luria-Bertani

LNB: Lacto-N-biosa

LNFP: lacto-N-fucopentaosa

LNT: lacto-N-tetraosa

Man: manosa

MFS: *Major Facilitator Superfamily*

Nu5Gc: ácido N-glicolilneuraminico

OHL: oligosacáridos de la leche humana

PEP: fosfoenolpiruvato

PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*

pNP: p-nitrofenol

pNP-fuc: p-nitrofenil- α -L-fucospiranosido

PTS: *phosphotranferase system*

PUL: *polysaccharide utilization loci*

REST: *Relative Expression Software Tool*

RMN: resonancia magnética nuclear

SCFAs: *Short-chain fatty acids* (ácidos grasos de cadena corta)

Sia: ácido siálico

TGIH: tracto gastrointestinal humano

UDP-Gal: Uridina difosfato Galactosa

UFC: unidades formadoras de colonia

UPEC: *Escherichia coli* uropatogénica

INTRODUCCIÓN

1 Oligosacáridos y su importancia biológica

Los oligosacáridos, además de los oligopéptidos y oligonucleótidos, son la tercera clase más diversa y compleja de biopolímeros que se encuentran comúnmente en la naturaleza. (Werz & Seeberger 2005). Estos oligosacáridos, libres o como glicoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) juegan un papel fundamental en muchos procesos biológicos, habiéndose demostrado que son cruciales en el desarrollo, crecimiento y supervivencia de todos los organismos (Varki 1993). Glicoconjugados tales como *N/O*-glicoproteínas son constituyentes de las membranas de células eucariotas y de mucinas que se encuentran sobre la superficie de células epiteliales (Holemann & Seeberger 2004); donde se ha demostrado, entre otras funciones, su implicación en interacciones célula-célula o célula-matriz extracelular, así como también en la modulación de las funciones de otras proteínas y en la presentación de estructuras diana de unión para muchos microorganismos (Varki 1993). En la leche humana, tanto los oligosacáridos libres como los glicoconjugados juegan un importante papel en la salud de los recién nacidos, contribuyendo no solo a prevenir la unión de patógenos a las células del huésped sino también como una excelente fuente de carbono y energía para microorganismos beneficiosos que se encuentran habitualmente en el tracto gastrointestinal (Bode 2012, Garrido et al 2013, Newburg 1996, Peterson et al 2013) (Fig. 1).

Tanto la complejidad como la diversidad de los oligosacáridos se debe a muchos factores; dentro de los cuales se incluyen su naturaleza no lineal, el número de diferentes azúcares, la estructura molecular de cada residuo, la formación de enlaces que conlleva a la formación de múltiples isómeros y su unión a otras moléculas dando lugar a glicoconjugados (Koeller 2000, Smilowitz et al 2014). Esta gran diversidad, correspondiendo bien sea a oligosacáridos libres o glicoconjugados ha llevado al estudio y descubrimiento de una gran variedad de funciones biológicas (Smilowitz et al 2014, Varki 1993); lo cual es un avance importante en la búsqueda de alternativas dirigidas a mejorar la salud y prevenir enfermedades.

2 Oligosacáridos de la leche humana (OLH)

Los oligosacáridos de la leche humana (OLH) son el tercer componente sólido más abundante seguido de la lactosa y los lípidos, y están compuestos básicamente por cinco monosacáridos; glucosa (Glc), galactosa (Gal), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y ácido siálico (Sia) (Bode 2012). Todos los OLH contienen lactosa (Gal β 1-4Glc) en su extremo reductor, los cuales pueden ser elongados por la adición de lacto-*N*-biosa (Gal β 1,3GlcNAc; cadena tipo 1) o *N*-acetilactosamina (Gal β 1,4GlcNAc; cadena tipo 2) mediante enlaces β 1-3 o β 1-6 dando lugar a diferentes estructuras (Bode 2012), entre ellas la lacto-*N*-tetrosa (LNT; Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc), para la cual se ha demostrado que es capaz de promover el crecimiento de algunas bacterias beneficiosas en el intestino humano (Bode 2012, Kitaoka et al 2005). Además, la lactosa o la cadena de oligosacáridos elongada puede ser fucosilada mediante enlaces α 1-2, α 1-3 o α 1-4 dando lugar a otros tipos de estructuras tales como el trisacárido 2'-fucosilactosa (2'-FL; Fuc α 1,2Gal β 1,4Glc) o diferentes isómeros de lacto-*N*-fucopentaosa (LNFP I, LNFP II, LNFP III y LNFP V). Estos oligosacáridos fucosilados han sido aislados y caracterizados, encontrándose cantidades relativamente altas desde los primeros días de lactancia, principalmente de 2'-FL y LNFP I. Estos dos azúcares han mostrado tener un papel biológico importante en el tracto gastrointestinal de los recién nacidos (Asakuma et al 2008); al igual que se ha demostrado actividad biológica para la LNFP III (Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) (Atochina & Harn 2005), cuya estructura contiene el trisacárido correspondiente al antígeno de Lewis^X (LeX) (Bode 2012).

La formación de los OLH como bloques estructurales, se debe a un gran número de glicosiltransferasas específicas que se expresan en las glándulas mamarias (Coppa et al 2006). Estas enzimas participan en la formación de enlaces glicosídicos a través de los distintos sitios de unión que presentan sus monosacáridos constituyentes, dando lugar a múltiples formas isoméricas, donde la composición de algunos de estos azúcares refleja características de los antígenos del grupo sanguíneo (Bode 2012, Engfer et al 2000, Newburg et al 2005) y, por lo tanto, cada mujer no sintetiza el mismo grupo de oligosacáridos que se pueden encontrar en la leche materna (Kobata 2010). Por ejemplo, la expresión o no de las fucosiltransferasas FUT2 (α 1-2) y FUT3 (α 1-3/4) puede dar lugar a la formación de oligosacáridos correspondientes a los del sistema del grupo

sanguíneo Secretor (Se) y Lewis (Le), que se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes (Secretor Le-positivo (Se+Le+), Secretor Le-negativo (Se+Le-), no Secretor Le-positivo (Se-Le+) y no Secretor Le-negativo (Se-Le-). La clasificación dentro de estos cuatro grupos es una simplificación de la complejidad de los OLH, ya que otras fucosiltransferasas (FUT1, 5, 6, 7 o 9) podrían estar implicadas en la fucosilación de distintos oligosacáridos (Bode 2012, Newburg et al 2005).

Las altas concentraciones de oligosacáridos es una característica solamente de la leche humana, encontrándose cantidades que pueden oscilar entre 5 y 15 g/L, de los cuales, entre el 50-80% de éstos se encuentran fucosilados (Bode 2012). Solo pequeñas cantidades de estos azúcares están presentes en la leche madura de bovino, que es la base para la síntesis de la leche de fórmula infantil (Bode 2009).

2.1 Beneficios de los oligosacáridos fucosilados (FUS)

A pesar del alto contenido de oligosacáridos en la leche humana, especialmente fucosilados (FUS), no hay evidencias de que éstos constituyan un aporte nutricional directo, ya que no pueden ser digeridos en el tracto gastrointestinal humano (Engfer et al 2000). Sin embargo, se ha demostrado, que este tipo de azúcares está involucrado en varios procesos biológicos, tales como metástasis de células tumorales (Misonou et al 2009), inflamación (Levander et al 2009) y adhesión célula-célula (Osumi et al 2009). La razón de esto es que además de estar presentes en la leche humana, también se encuentran en los antígenos de los grupos sanguíneos, sobre las superficies de las células de los mamíferos y en la mucina intestinal (Becker & Lowe 2003). Además, se ha evidenciado que los FUS de la leche humana pueden presentar al menos tres funciones principales en el tracto gastrointestinal infantil: 1. promover el crecimiento y establecimiento de la microbiota, generalmente dominado por bifidobacterias; 2. prevenir la adhesión de patógenos a la superficie del epitelio intestinal; y 3. mejorar las defensas del huésped mediante la modulación del sistema inmune (Smilowitz et al 2014).

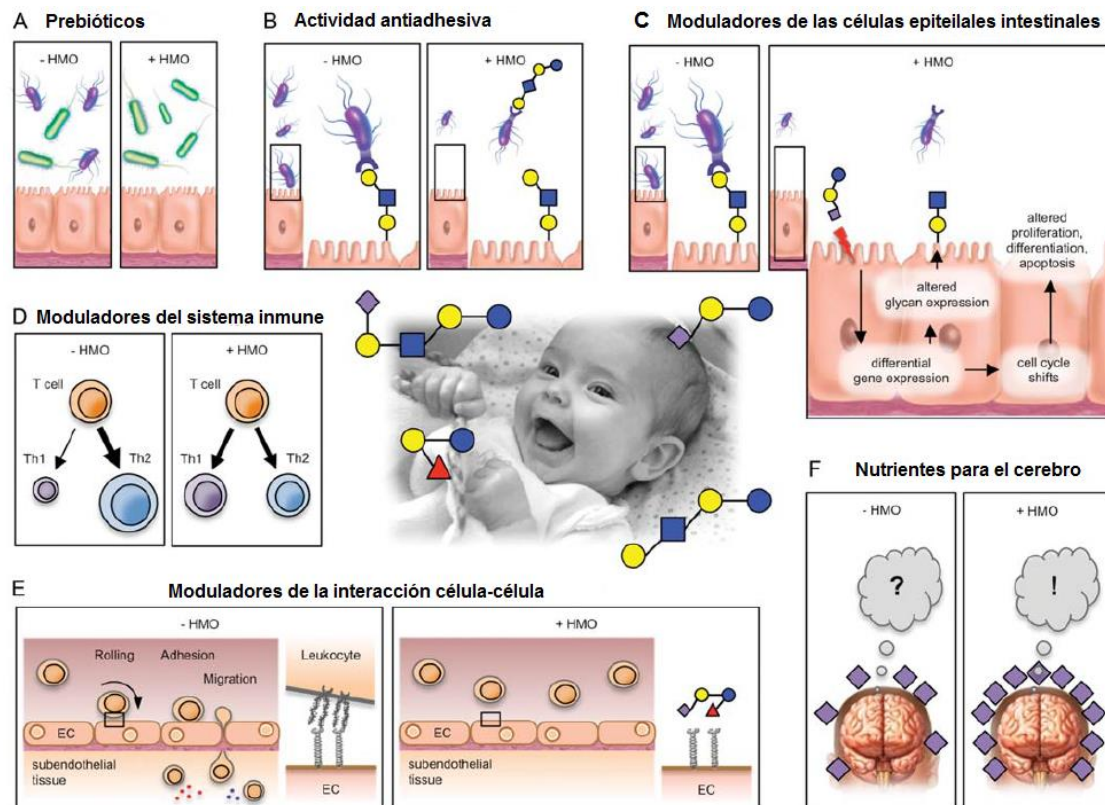


Figura 1. Efectos postulados de los oligosacáridos de la leche humana (OLH). La sigla en inglés se muestra como HMO (*human milk oligosaccharides*). Los OLH pueden beneficiar a los recién nacidos de diferentes maneras. (A) Los OLH son prebióticos que sirven como sustratos metabólicos para bacterias beneficiosas (verde) y proporcionan una ventaja en el crecimiento sobre potenciales patógenos (púrpura). (B) Los OLH son antimicrobianos anti-adhesivos que sirven como señuelos receptores e impiden la adhesión de patógenos. (C) Los OLH directamente afectan las células epiteliales intestinales y modulan la expresión génica, lo cual conduce a cambios en los glicanos de la superficie celular y otras respuestas celulares. (D) Los OLH modulan la producción de citoquinas de linfocitos, conduciendo a una respuesta más equilibrada Th1/Th2. (E) Los OLH reducen las interacciones célula-célula mediadas por selectinas en el sistema inmune y disminuye los leucocitos circulantes en células endoteliales activadas, lo cual conduce a la reducción de la infiltración de leucocitos en la mucosa y su activación. (F) Los OLH proveen ácido siálico como un nutriente potencialmente esencial para la cognición y desarrollo del cerebro. Modificado de Bode (2012).

Se ha demostrado que los OLH presentan actividad anti-adhesiva contra patógenos intestinales, confiriendo protección a los recién nacidos contra enfermedades diarreicas (Morrow et al 2005). Igualmente, se ha evidenciado que los FUS son fermentados *in vitro* por la microbiota de los recién nacidos y por cepas de *Bifidobacterium longum* en cultivos puros (Yu et al 2013a). Por lo tanto se considera que este tipo de carbohidratos serían buenos candidatos para actuar como anti-adhesinas, evitando enfermedades entéricas, y como prebióticos favoreciendo el crecimiento de la microbiota beneficiosa en el intestino humano.

2.2 FUS como anti-adhesinas

Las enfermedades diarreicas infecciosas constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad de los niños recién nacidos, no solo en países en vía de desarrollo sino también en áreas desarrolladas (Coppa et al 2006); y tales infecciones del tracto gastrointestinal son causadas por una amplia variedad de enteropatógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos (Coppa et al 2006). Sin embargo, la lactancia materna ofrece protección con diferentes mecanismos contra la diarrea debido a la presencia de varias sustancias anti-infectivas presentes en la leche humana (Howie et al 1990, Morrow et al 1999); las cuales incluyen oligosacáridos (Morrow et al 2005). Estos oligosacáridos, y principalmente los fucosil-oligosacáridos que se encuentran como glicoconjugados de las superficies de las células funcionan como receptores de unión de algunas bacterias patógenas y virus (Newburg et al 2005). Una estrategia para prevenir la adherencia inicial de los patógenos y la consecuente infección podría ser mediante la interrupción de las interacciones adhesina-receptor (Fig. 2). Esta estrategia ha resultado útil con algunos FUS solubles que inhiben por competición la unión de patógenos a los receptores de las células intestinales, ya que pueden actuar como análogos de éstos y por lo tanto proteger a los recién nacidos de enfermedades entéricas (Newburg et al 2005). Así los oligosacáridos derivados de la leche humana han mostrado que tienen actividad anti-adhesiva contra varios patógenos (Coppa et al 2006, Newburg 2009), siendo especialmente protectora contra enfermedades diarreicas infantiles la fracción de fucosil-glicano (Morrow et al 2005). La 2'-FL bloqueó *in vitro* la unión del enteropatógeno *Campylobacter jejuni* al antígeno H (O) del grupo sanguíneo expresado en la superficie de las células epiteliales, inhibiendo la infección por *Campylobacter in vivo* (Ruiz-Palacios et al 2003). La adherencia localizada de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) era inhibida por tetrasacáridos y pentasacáridos fucosilados, lo que sugiere un papel de estos azúcares como sitios de unión (Cravioto et al 1991), mientras que la adherencia de *Salmonella enterica* serotipo *Typhimurium* a las células Caco-2 también es bloqueada por el oligosacárido fucosilado H tipo 2 (Fuca1-2Galβ1-4GlcNAc) o por pretratamiento de las células con α-(1,2)-fucosidasa (Chessa et al 2009), la cual hidrolizaba el oligosacárido liberando la fucosa, de tal forma que la estructura para la unión no estaba disponible.

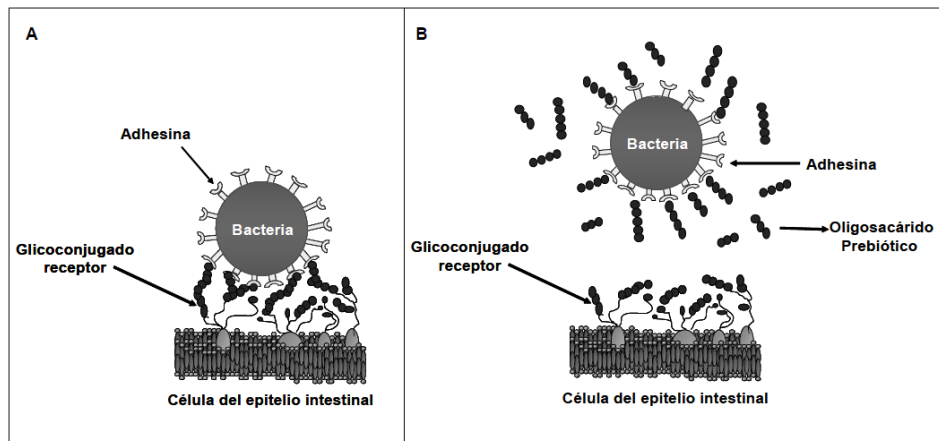


Figura 2. Modelo de acción directa de los oligosacáridos en la prevención de infecciones. A) Las adhesinas bacterianas reconocen a los receptores oligosacáridos en las células del epitelio intestinal. B) Inhibición de la adhesión bacteriana por prebióticos con estructuras similares a los glicanos receptores (Dominguez-Vergara et al 2009).

2.3 FUS como prebióticos

Los prebióticos son definidos como ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador (Gibson *et al.*, 2004; Roberfroid, 2007; Roberfroid *et al.*, 2010). Por lo tanto es necesario que los prebióticos sean resistentes a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y que no sean absorbidos en el tracto gastrointestinal. Estas condiciones se cumplen para los OLH, que llegan intactos al colon. En la actualidad está bien establecido que la microbiota del colon tiene una influencia muy grande en la salud, por lo que existe un gran interés en la utilización de prebióticos como ingredientes de alimentos funcionales (Macfarlane et al 2008). Una amplia variedad de suplementos dietéticos no digeribles han sido identificados y considerados como prebióticos, los cuales modifican el balance de la microbiota intestinal, estimulando el crecimiento y/o actividad de microorganismos beneficiosos y suprimiendo bacterias potencialmente perjudiciales. Estos suplementos incluyen lactulosa, lactitol y una gran variedad de oligosacáridos tales como inulina, galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) (Heyman & Menard 2002). Hasta ahora existen pocos estudios acerca del potencial efecto prebiótico de los FUS; no obstante, algunos de estos oligosacáridos que se encuentran en la leche humana como son 2'-FL, 3'-FL y lactodifucotetraosa son metabolizados por especies de *Bifidobacterium* que expresan α -L-fucosidasas, las cuales han sido encontradas en las

especies *B. longum*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium breve* (Ashida et al 2009, Ruiz-Moyano et al 2013, Sela et al 2012). *Lactobacillus casei* BL23, que expresa tres α -L-fucosidasas (AlfA, AlfB y AlfC) diferentes (Rodríguez-Díaz et al 2011), es capaz de utilizar el disacárido fucosil- α -1,3-GlcNAc (Rodríguez-Díaz et al 2012). Este disacárido forma parte del antígeno de Lewis^X (LeX), el cual es encontrado en los oligosacáridos de la leche humana (Kobata 2010) y en muchas glicoproteínas en las superficies de las mucosas (King 1994). Por lo tanto, se puede hipotetizar que los FUS podrían ser utilizados para promover el desarrollo de microorganismos beneficiosos en el intestino (Fig. 3).

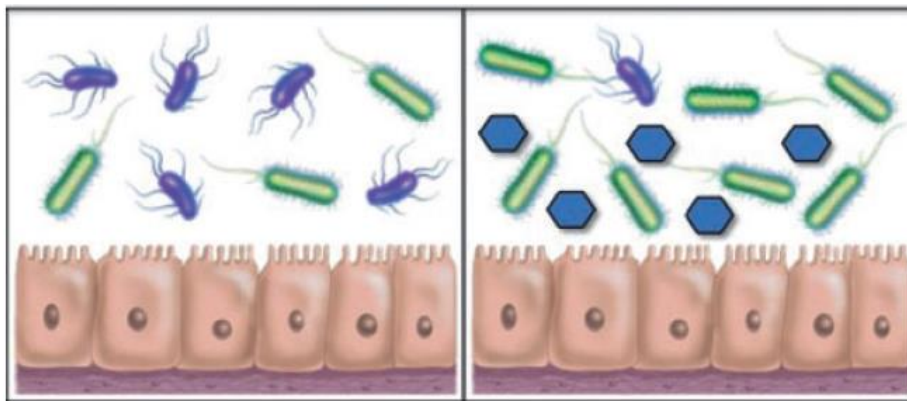


Figura 3. Efecto prebiótico de oligosacáridos de la leche humana (OLH). Este esquema simplificado muestra que las bacterias beneficiosas (verde) y no beneficiosas (violeta) tienen diferentes capacidades de metabolizar los OLH. En presencia de OLH (derecha), las bacterias beneficiosas son capaces de metabolizar estos azúcares lo cual les permite desarrollarse, mientras que las no beneficiosas no pueden crecer por la incapacidad de metabolizar los OLH. En la ausencia de OLH (izquierda), ambos tipos de bacterias compiten por los mismos recursos (Bode 2009).

3 Bacterias intestinales

El tracto gastrointestinal humano (TGIH) contiene decenas de billones de microorganismos, comprendiendo en su mayoría bacterias (Rajilic-Stojanovic & de Vos 2014), las cuales participan en un conjunto dinámico de interacciones mutualistas con su hospedador (Hooper et al 2012). Aunque la biomasa microbiana se mantiene relativamente baja en las regiones proximales del estómago, con 10^{2-3} células por g, en la región más distal del intestino delgado (ileón) aumenta a 10^8 células por g, y densidades más altas son encontradas en el colon con valores de hasta 10^{12} células por g (Fig. 4) (Walter & Ley 2011). Se ha demostrado que los factores genéticos principalmente relacionados con inmunidad, también como factores ambientales y

estocásticos afectan la composición de la comunidad microbiana (Benson et al 2010, Bourlioux et al 2003); incluso, el orden en el que las bacterias colonizan el TGIH afecta a la composición de dicha comunidad, puesto que las bacterias ya establecidas pueden modificar su entorno, afectando a la colonización de otros microorganismos (Walter & Ley 2011).

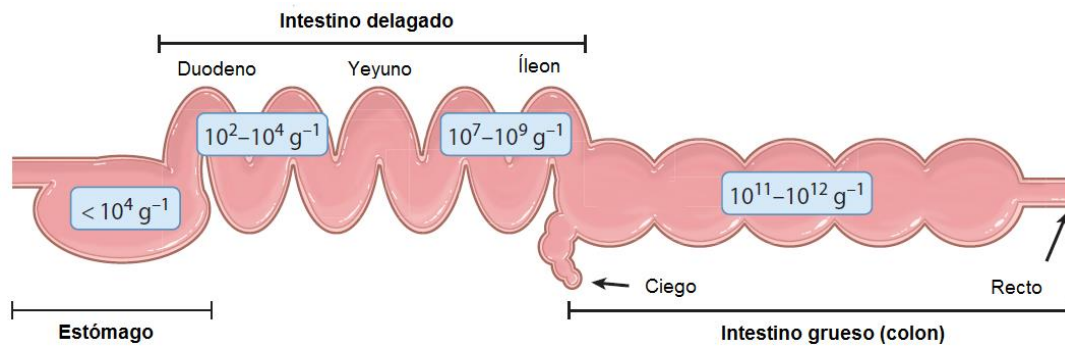


Figura 4. Representación esquemática del intestino humano indicando sus diferentes regiones y las densidades microbianas en cada una de ellas. Diferentes nichos del tracto gastrointestinal determina la composición de la microbiota. Modificado de Kleerebezem & Vaughan (2009).

Por otro lado, el mantenimiento de estas poblaciones microbianas en el TGIH y principalmente en el colon se relaciona con un ambiente rico en nutrientes, incluyendo polisacáridos ingeridos de la dieta y glicanos derivados del hospedador, los cuales son secretados en la capa de las mucosas y en la superficie del epitelio (Kashyap et al 2013). Las mucinas intestinales son una fuente rica de carbohidratos, comprendiendo entre un 50-80% de oligosacáridos en peso (Corfield et al 2001) y el consumo de glicanos de las mucosas por muchas especies de bacterias intestinales ha sido bien documentado (Martens et al 2008, Sonnenburg et al 2005, Turróni et al 2010).

A pesar que la microbiota intestinal de cada individuo está compuesta por cientos de diferentes especies de bacterias; relativamente pocos grupos son los predominantes. En general, el phylum de Firmicutes (bacterias Gram-positivas) y Bacteroidetes (bacterias Gram-negativas) son los que se encuentran en mayor proporción en el sistema digestivo humano seguido por bacterias del grupo de Actinobacterias y en una frecuencia más baja se encuentran las que pertenecen al grupo de Proteobacterias (Eckburg et al 2005, Sankar et al 2015).

Los miembros de las comunidades microbianas en el tracto gastrointestinal pueden ser ecológicamente clasificadas como autóctonos (indígenas) y alóctonas (no indígenas) (Savage, 1977). La principal diferencia entre las especies autóctonas y alóctonas es que las primeras colonizan naturalmente el hábitat, mientras que las segundas no pueden colonizarlo, excepto en situaciones anormales o atípicas (Tabla 1). Los microorganismos autóctonos están siempre presentes en el TGIH de los adultos sanos y desempeñan un papel en el mantenimiento de poblaciones bacterianas estables. Las especies alóctonas no son características del hábitat normal, siendo microorganismos transitorios, las cuales llegan al TGIH a través de los alimentos, del agua, o desde otros hábitats del cuerpo. Sin embargo, estos microorganismos pueden colonizar los hábitats desocupados por los microorganismos autóctonos en un sistema gastrointestinal alterado (Ouwehand, 2006).

Las comunidades microbianas presentes en el intestino grueso son bastante estables y relativamente uniformes a lo largo de la longitud del colon (Zoetendal et al, 2002; Eckburg et al, 2005), y en gran medida están dominadas por microorganismos autóctonos (Walter y la Ley de 2011). Sin embargo, la población en el resto del intestino es menos estable (Hayashi et al, 2005;. Booiijink et al, 2010). Por ejemplo, de todos los filotipos detectados en el estómago humano, sólo *Helicobacter pylori* persiste en este ecosistema, estando ausente en la cavidad oral o en los alimentos, y posee rasgos fenotípicos y genómicos para sobrevivir en el estómago. Así mismo, otros grupos de bacterias detectadas en el estómago e intestino delgado son microorganismos alóctonos procedentes de la cavidad oral (Walter y Ley, 2011).

La pretensión de entender la ecología microbiana de estos grupos de bacterias en el TGIH ha estado siempre ligada a la aspiración de manipular, promover y mantener la salud humana. Por lo tanto, varios estudios se han llevado a cabo con diferentes microorganismos intestinales tanto autóctonos como alóctonos, los cuales, en conjunto pueden ser vistos como un órgano funcional que contribuye entre otros beneficios, en la biosíntesis de nutrientes esenciales tales como las vitaminas K y B12, la transformación de ácidos biliares conjugados y fermentación de componentes de la dieta tales como carbohidratos que no pueden ser degradados por las enzimas digestivas humanas (Manson et al 2008).

Tabla 1. Tipos de microorganismos dominantes (autóctonos y alóctonos) en los principales hábitats del tracto gastrointestinal humano (TGIH). Tomado y adaptado de Walter & Ley (2011).

Región del TGIH	<u>Poblaciones bacterianas</u>	
	Autóctonos	Alóctonos
Estómago	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Gemella</i> (e.g., <i>G. haemolysans</i>), <i>Granulicatella</i> , <i>Streptococcus</i> (e.g., <i>S. mitis</i>), <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Rothia</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Intestino delgado	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Lactobacillus</i> (algunas especies)	<i>Granulicatella</i> , <i>Streptococcus</i> (e.g., <i>S. mitis</i>), <i>Veillonella</i> , <i>Lactobacillus</i>
Intestino grueso	Cinco phylum principales: <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , y <i>Proteobacteria</i> . Cientos de especies	Microorganismos alóctonos son superados en número por los microorganismos autóctonos

3.1 Bacterias lácticas: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*

3.1.1 *Bifidobacterium*

Miembros del género *Bifidobacterium* se encuentran entre los primeros microorganismos que colonizan el TGIH y se cree que ejercen beneficios de salud en el hospedador. Debido a sus propiedades promotoras de salud, las bifidobacterias se han incorporado en muchos alimentos funcionales como ingredientes activos (Nova et al 2016). Las bifidobacterias constituyen una proporción considerable de la microbiota intestinal de los lactantes que se alimentan con leche materna, encontrándose algunas especies predominantes tales como *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (*B. infantis*), *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* o *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, mientras que otras especies tales como *Bifidobacterium bifidum* o *Bifidobacterium catenulatum* que son típicas de la microbiota intestinal de adultos predomina en los lactantes que se alimentan con leche de fórmula (Haarman & Knol 2005). Por lo tanto, algunos de los componentes de los OLH determinan el “factor

bifidus” que se ha descrito para la leche humana. Los OLH actúan como una clase de sustancias prebióticas que promueven el crecimiento de ciertas especies de bifidobacterias y se ha demostrado que las diferencias en la composición de los OLH entre diferentes madres determina las proporciones bacterianas en la microbiota intestinal de los lactantes que se alimentan con leche materna (Lewis et al 2015, Wang et al 2015).

3.1.2 *Lactobacillus*

Lactobacillus son un grupo de bacterias subdominante de la microbiota intestinal humana que también se encuentra en otros sitios del cuerpo, ciertos alimentos y otros nichos ricos en nutrientes (e.g. material vegetal). Este género representa los tipos de microorganismos que han co-evolucionado junto con los mamíferos, lo cual proporciona una base racional para postular una asociación con beneficios en la salud (O'Callaghan & O'Toole 2013). La inspección del genoma de varios lactobacilos intestinales tales como *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* o *Lactobacillus acidophilus*, reveló que estas especies están adaptadas para colonizar el ambiente intestinal, aunque sus capacidades para aprovechar los componentes de los OLH o de las mucinas son limitadas y probablemente dependen de los carbohidratos derivados de la dieta para su crecimiento (Altermann et al 2005, Azcarate-Peril et al 2008, Pridmore et al 2004).

La capacidad generalmente limitada para la utilización de OLH o mucinas y la aparente falta de potencial metabólico para el catabolismo de OLH codificado por los genomas de *Lactobacillus* presenta una excepción en el grupo de *Lactobacillus casei/Lactobacillus paracasei/Lactobacillus rhamnosus*. Los miembros de este grupo filogenéticamente relacionado contienen 3 genes que codifican para α -L-fucosidasas de la familia GH29 (Rodríguez-Díaz et al 2011). Aunque algunas de estas enzimas muestran actividad *in vitro* con OLH fucosilados como 2'-FL o estructuras del antígeno H, estos carbohidratos específicos no son utilizados por lactobacilos. Por el contrario la utilización del disacárido Fuc- α 1,3-GlcNAc, un componente de los OLH ha sido caracterizada genéticamente en *L. casei* (Rodríguez-Díaz et al 2012). El repertorio de sistemas para la utilización de OLH y glicoconjugados en el grupo *L. casei/paracasei/rhamnosus* se amplía con el operón *gnb* el cual es requerido para el uso

de lacto-*N*-biosa (componente del núcleo de OLH) y también para la utilización de galacto-*N*-biosa (componente del núcleo de *O*-glicanos de glicoproteínas) (Bidart et al 2014). Todos estos hallazgos reflejan una adaptación particular del grupo *L. casei/paracasei/rhamnosus* que les permitiría captar nutrientes en el tracto gastrointestinal de los lactantes que se alimentan con leche materna.

4 *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la leche humana

La leche humana además de contener una gran variedad de moléculas bioactivas que contribuyen al buen desarrollo de los recién nacidos alimentados de este fluido materno (Newburg 2005), se considera también que es una de las principales fuentes de bacterias, tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y otras bacterias Gram-positivas que colonizan el tracto gastrointestinal de los niños lactantes (Fernandez et al 2013). Especies del género *Lactobacillus* han sido aisladas tanto de la leche humana como de las heces de los lactantes e incluyen entre otras a *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *Lactobacillus brevis* y *L. casei* (Albesharat et al 2011, Martin et al 2007). Entre las especies de *Bifidobacterium* que se han aislado e identificado de la leche humana se encuentran *B. breve*, *B. longum*, *B. adolescentes* y *B. bifidum* (Makino et al 2011, Martin et al 2009, Martin et al 2012, Soto et al 2014). Se ha demostrado que tanto especies de *Lactobacillus* como de *Bifidobacterium* utilizan oligosacáridos específicos de la leche humana (Ashida et al 2009, Rodriguez-Diaz et al 2011, Ruiz-Moyano et al 2013, Sela et al 2012, Ward et al 2006), lo que permitiría su adaptación dentro del tracto gastrointestinal de los niños amamantados. Varios estudios han demostrado que durante la lactancia, hay una transferencia de madre a hijo de una gran variedad de cepas bacterianas, lo cual sugiere que la exposición del lactante a estas bacterias desde los primeros días de su nacimiento, ejerce efectos beneficiosos contra enfermedades diarreicas y respiratorias, además de reducir el riesgo de desarrollar otras enfermedades tales como la diabetes o la obesidad (Hunt et al 2011, Sanz 2011). En este sentido se ha demostrado que estas bacterias son componentes de la microbiota natural de las glándulas mamarias en lugar de ser simples microorganismos contaminantes (Fernandez et al 2013).

5 Probióticos

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud en el hospedador” (Hill et al 2014). Por esta definición, las bacterias nativas no son probióticos, hasta que no se hayan aislado, purificado y demostrado que tengan un beneficio para la salud cuando se administran (Kleerebezem & Vaughan 2009)

Para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico, éste debe cumplir varios criterios. Debe conferir al menos un beneficio en la salud del hospedador, resistir a los ácidos y sales biliares, tener capacidad para adherirse a las células epiteliales del intestino, ser capaz de persistir a lo largo del tracto digestivo, producir agentes antimicrobianos, modular la respuesta inmune y resistir a los procesos tecnológicos (Heyman & Menard 2002). La mayoría de los microorganismos probióticos caracterizados actualmente pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, sin embargo algunas cepas pertenecientes a los géneros de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Bacillus* son considerados como probióticos (de Vrese & Schrezenmeir 2008).

6 Metabolismo de carbohidratos por bacterias intestinales

El metabolismo de carbohidratos se ha estudiado ampliamente en Bacteroidetes, particularmente en especies del género *Bacteroides*. Los estudios se han centrado básicamente en este tipo de microorganismos dada su habilidad para prosperar en el ecosistema intestinal, debido a su capacidad en la producción y uso de glicanos presentes en ese nicho (Comstock 2009). Estas especies tienen una maquinaria extensa para utilizar los polisacáridos complejos presentes en el colon como fuente de carbono y energía. De este modo, muchas de las especies de *Bacteroides* generan productos finales de la fermentación en forma de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs; *Short-chain fatty acids*) que proporcionan nutrición y otras propiedades beneficiosas al hospedador (Comstock 2009). Una de las especies bastante estudiadas corresponde a *Bacteroides thetaiotaomicron*, la cual contiene en su genoma 88 diferentes *loci* para la utilización de polisacáridos (PUL; *polysaccharide utilization loci*) que le permiten degradar carbohidratos derivados de la dieta (plantas, leche) o del hospedador (mucinas); por lo

que se puede considerar que el metabolismo de estos glicanos es un factor importante en la colonización intestinal y con probables impactos en la ecología microbiana (Martens et al 2008). La degradación de glicanos derivados de la dieta o del hospedador por parte de los numerosos PULs en especies de *Bacteroides* genera la liberación de sus monosacáridos constituyentes en el espacio periplasmático. El transporte de estos monosacáridos al citoplasma involucra permeasas específicas para importarlos sin la simultánea fosforilación. La mayoría de estos azúcares son luego convertidos a sus formas de hexosa fosforilada mediante la acción de quinasas citoplasmáticas. Estas moléculas fosforiladas pueden ser dirigidas bien sea hacia el catabolismo o a la síntesis de glicanos bacterianos (Brigham & Malamy 2005). Las estrategias moleculares usadas por los miembros de la microbiota intestinal para cosechar y degradar glicanos complejos son importantes para entender la genética y las propiedades metabólicas relacionadas con la adaptación al ambiente intestinal humano (Martens et al 2008). Por lo tanto, el metabolismo de los carbohidratos por parte de bacterias intestinales, depende tanto de proteínas transportadoras que se encargan de tomar y transportar los azúcares desde el medio extracelular, como también de enzimas glicosidasas capaces de su degradación, permitiendo de esta manera la utilización de los monosacáridos constituyentes a través de distintas rutas metabólicas (Fig. 5). El catabolismo de los hidratos de carbono por parte de la microbiota, finalmente permite la obtención de energía para el crecimiento y colonización del tracto gastrointestinal (Sela et al 2008); así como también la producción de metabolitos, principalmente SCFAs con efectos beneficiosos (El Kaoutari et al 2014).

6.1 Mecanismos de transporte y utilización de carbohidratos

Muchas de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos han sido bioquímicamente caracterizadas en la cepa *E. coli* K-12, en la cual se ha determinado la presencia de cuatro tipos de transporte de carbohidratos (Plantinga et al 2004). Entre ellos, dos corresponden a transportadores secundarios (permeasas), por los cuales el substrato pasa desde el medio extracelular al citoplasma impulsado por la fuerza motriz de un protón (H^+) (pmf; *proton-motive force*) y/o del ión sodio (Na^+) (smf; *sodium-motive force*). La diferencia entre estos dos tipos de transportadores secundarios es que uno de ellos (smf), además de lo mencionado es dependiente de una proteína de unión

que se encarga de entregar el sustrato al transportador localizado en la membrana (Poolman & Konings 1993). Otro de los transportadores presente estudiado extensivamente en *E. coli* y otras bacterias es del tipo PTS (*phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system*). Este sistema utiliza varias proteínas citosólicas, tales como los componentes IIA y IIB para transferir el grupo fosforilo desde el fosfoenolpiruvato (PEP) al sustrato que se toma mediante la permeasa denominada componente IIC (Postma et al 1993). Finalmente, el cuarto tipo de transporte de carbohidratos corresponde a la superfamilia de transportadores primarios de tipo ABC (*ATP-Binding-Cassette*). En este sistema una proteína de unión dona el soluto (azúcar) a dos dominios de transporte localizados en la membrana. Subsecuentemente, el transporte es conducido por la hidrólisis del ATP, lo cual es mediado por dos ATPasas que están asociadas con el transportador en el lado citoplasmático de la membrana (Higgins 2001).

En las bacterias intestinales del grupo de las bifidobacterias se han realizado algunos estudios sobre el mecanismo para la utilización de carbohidratos de importancia en leche humana y mucosas, tales como lacto-*N*-biosa (LNB; β Gal1,3GlcNAc) y galacto-*N*-biosa (GNB; β Gal1,3GalNAc) (Nishimoto & Kitaoka 2007, Xiao et al 2010, Yoshida et al 2012). Tanto la LNB como la GNB forman parte de los OLH y del núcleo estructural de *O*-glicanos de tipo mucina, respectivamente (Jensen et al 2010). Además la LNB se encuentra en glicolípidos y glicoproteínas de varios tipos celulares, incluyendo el epitelio intestinal y los antígenos del grupo sanguíneo (Finne et al 1989, Hakomori 2008). En *B. bifidum* se ha descrito un *cluster* de genes relacionado con el metabolismo de LNB y GNB. Estos disacáridos son incorporados al interior celular mediante transportadores específicos de tipo ABC. Una vez dentro de la bacteria, estos azúcares son hidrolizados por una GNB/LNB fosforilasa (LNBP) en galactosa-1P y la *N*-acetilhexosamina respectiva, las cuales siguen distintas rutas catabólicas (Wada et al 2008a). El hecho de que en el genoma de *Bifidobacterium longum* se de un agrupamiento de genes que codifican para glicosidasas junto con proteínas transportadoras de carbohidratos refleja una estrategia lógica para la utilización de una gran variedad de glicanos presentes en la leche humana (Fig. 5) (Sela et al 2008).

El grupo de los firmicutes en el intestino humano está representado principalmente por bacterias del ácido láctico tales como *Lactobacillus* y *Enterococcus*; así como también

por especies de *Clostridium* y *Ruminococcus* (Power et al 2014, Voreades et al 2014). En este grupo de bacterias, a pesar del impacto que tienen en la salud humana, existe gran desconocimiento acerca de los mecanismos en la utilización de carbohidratos presentes en el tracto gastrointestinal. Se ha demostrado que la cepa probiótica *L. casei* BL23 es capaz de metabolizar los disacáridos LNB y GNB (Bidart et al 2014). Estos carbohidratos son incorporados mediante el PTS^{Gnb}, que transporta también *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). El PTS está compuesto de dos proteínas generales (EI y HPr) (Viana et al 2000) y el transportador específico de carbohidratos (EII). El EI se autofosforila en un residuo de histidina mediante el PEP y luego transfiere el grupo fosforilo a HPr en el residuo 15; una histidina conservada. HPr funciona como un donador de grupos fosforilo para los diferentes transportadores EII, cada uno de ellos es específico para un azúcar o grupo de azúcares estructuralmente relacionados. El componente EII consiste en tres o cuatro proteínas: las del dominio citoplasmático (EIIA y EIIB) y las de los transportadores transmembrana (EIIC y EIID) (Postma et al 1993). A diferencia de las especies de *Bifidobacterium*, *L. casei* BL23 utiliza una fosfo- β -galactosidasa específica para la hidrólisis de LNB y GNB una vez que estos son internalizados mediante el PTS^{Gnb} (Bidart et al 2014).

6.2 Metabolismo de L-fucosa

La L-fucosa (6-deoxi-L-galactosa) es una de las pocas hexosas con la configuración L encontradas en la naturaleza. Este monosacárido unido a otros carbohidratos, forma glicanos fucosilados, los cuales se encuentran presentes tanto en las superficies de las células epiteliales o sanguíneas (Becker & Lowe 2003, Coyne et al 2005) como en la leche humana (Bode 2009). Estos hechos hacen que la L-fucosa sea un azúcar importante en la ecología microbiana del tracto gastrointestinal. La composición de la microbiota intestinal se relaciona con la fucosilación de glicoconjugados, siendo ésta dependiente del estado secretor de los individuos, donde la α -(1,2) fucosiltransferasa codificada por el gen FUT2, también conocido como gen secretor, es la responsable de adicionar una fucosa mediante un enlace α -(1,2) a un residuo de β -D-galactosa de los glicanos que forman parte del mucus intestinal (Kashyap et al 2013, Wacklin et al 2011). Por lo tanto, la L-fucosa es muy común en la mucina de individuos que contienen por lo menos una copia funcional del gen que codifica para la α -(1,2) fucosiltransferasa (FUT2). Aproximadamente el 20% de la

población caucásica carece de copias funcionales de este gen (conocidos como “no secretores”) y, como resultado, carecen de residuos de fucosa terminales con un enlace α -(1,2) en su mucina intestinal (Kelly et al 1995). La importancia de este monosacárido en las mucosas radica, entre otras funciones, en su intervención para mediar las interacciones entre los microorganismos y su hospedador (Kashyap et al 2013). Debido a la elevada concentración de L-fucosa encontrada en el nicho intestinal de los individuos secretores, ésta puede ser usada como fuente de carbono y su utilización ha sido identificada como factor clave para la colonización intestinal de algunas bacterias, tales como el patógeno *Campylobacter jejuni*, el cual es capaz de usar este monosacárido, otorgándole una ventaja competitiva, como se determinó en modelos de infección en cerdos recién nacidos (Stahl et al 2011). Por otro lado el mutante Δ *fucAO* de la cepa probiótica *Escherichia coli* Nissle 1917 fue incapaz de usar L-fucosa, mostrando niveles de colonización en intestino de ratón dos órdenes de magnitud más bajos comparado con la cepa silvestre (Autieri et al 2007).

El metabolismo de L-fucosa ha sido extensivamente caracterizado en *E. coli* (Baldoma & Aguilar 1988, Chen et al 1987a, Chen et al 1987b). En esta bacteria, la L-fucosa es transportada por una permeasa y catabolizada a fuculosa-1-fostafato que finalmente es escindida a dihidroxiacetona-fosfato y L-lactaldehído por una aldolasa específica. El L-lactaldehído puede ser luego metabolizado a 1,2-propanodiol o lactato, y la dihidroacetona-fosfato entra a la glicólisis (Baldoma & Aguilar 1988). Una vía similar ha sido descrita en *Bacteroides* (Hooper et al 1999). Sin embargo, *C. jejuni* se basa en una ruta diferente para su metabolismo, que involucra una L-fucosa deshidrogenasa y una L-fucunolactonasa, aunque los genes correspondientes y enzimas no han sido completamente caracterizados (Stahl et al 2011).

La L-fucosa, además de servir como fuente de carbono y energía, en algunas bacterias actúa como una molécula señalizadora. En *E.coli* enterohemorrágica, el sistema de dos componentes FusKR detecta L-fucosa extracelular y activa genes metabólicos y de virulencia (Pacheco et al 2012). Algunas cepas de *Streptococcus pneumoniae*, a pesar de tener todos los genes que codifican para una ruta completa para el catabolismo de L-fucosa (Fig. 6), no son capaces de utilizarla. Los genes *fuc* de *S. pneumoniae* están agrupados con genes que codifican glicosidasas extracelulares que liberan fucosil-oligosacáridos de los antígenos de Lewis^y y del grupo sanguíneo de tipo A y B de la

superficie celular del hospedador. Estos carbohidratos fucosilados son internalizados por transportadores específicos codificados por el mismo operón. Los genes *fuc* de *S. pneumoniae* son necesarios para la virulencia y son inducidos por L-fucosa, pero este azúcar no es metabolizado por la bacteria (Higgins et al 2014).

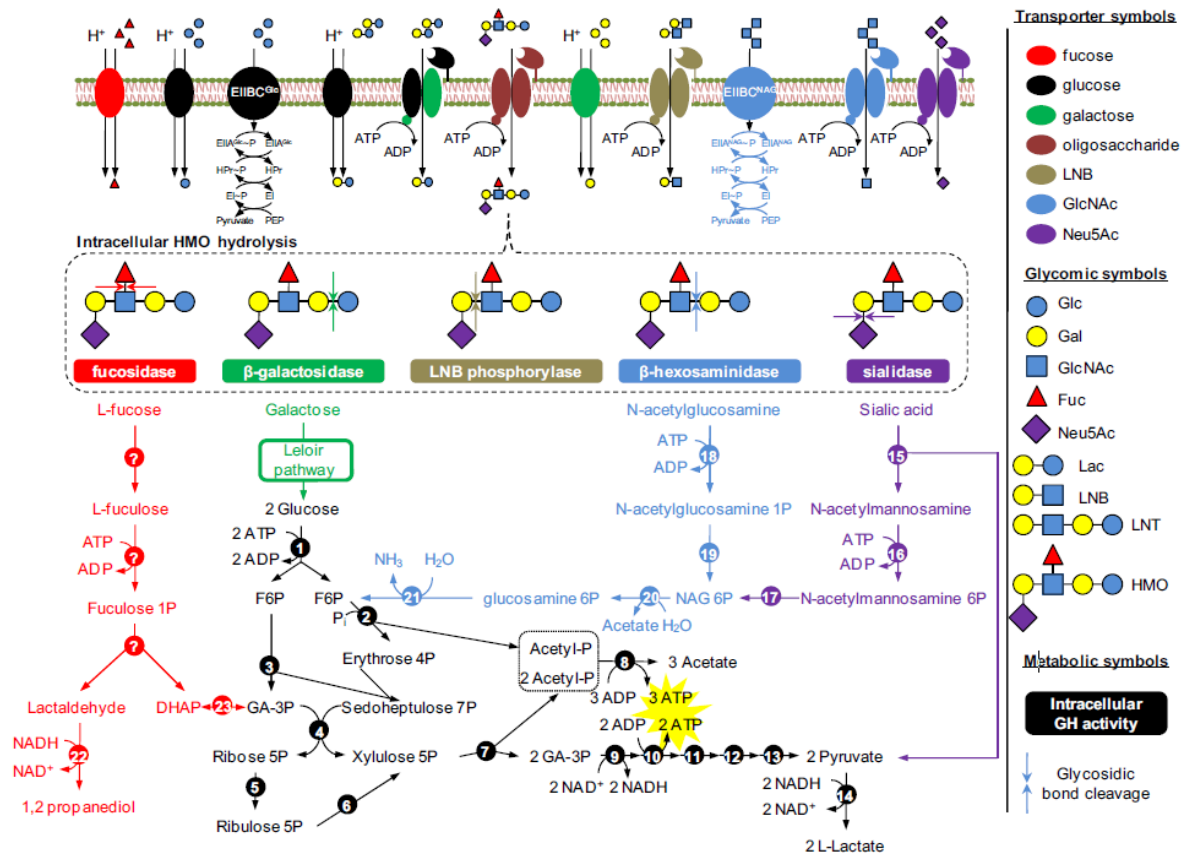


Figura 5. Metabolismo de oligosacáridos de la leche humana y derivados en *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. Los carbohidratos atraviesan la membrana celular a través de transportadores ABC específicos para el transporte de OLH como lactosa, *N*-acetilglucosamina y ácido siálico; permeasas pertenecientes a la familia MFS específica de fucosa, glucosa, galactosa y lactosa; y PTS para el transporte de glucosa y *N*-acetilglucosamina. Las glicosilhidrolasas intracelulares procesan los polímeros de azúcares en carbohidratos constituyentes, los cuales son degradados antes de entrar en la ruta metabólica. La vía fermentativa central (*Bifid shunt*) se muestra en negro con coeficientes estequiométricos representando la utilización de dos hexosas. PTS, “phosphotransferase system”; Pi, “phosphate”; G6P, “glucose 6-phosphate”; F6P, “fructose 6-phosphate”; GA-3P, “glyceraldehyde 3-phosphate”; DHAP, “dihydroxyacetone phosphate”; GH, “glicosil hydrolase”; Glc, “glucose”; Gal, “galactose”; GlcNAc, “*N*-acetylglucosamine”; Fuc, “fucose”; Nu5Ac, “sialic acid”; Lac, “lactose”; LNB, “lacto-*N*-biose”; LNT, “lacto-*N*-tetraose”; HMO, “human milk oligosaccharide”. Tomado de Sela et al (2008).

6.2.1 Metabolismo de la L-fucosa por *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)

A pesar de existir algunos estudios sobre la utilización de carbohidratos fucosilados por parte de bacterias consideradas probióticos (Ashida et al 2009, Rodriguez-Diaz et al 2012, Ruiz-Moyano et al 2013), poco se conoce sobre el metabolismo de la L-fucosa. *L. rhamnosus* GG (LGG) es una bacteria comercializada como probiótico (Saxelin et al 2005). Esta cepa fue aislada del hábitat intestinal humano y sus beneficios en salud como probiótico han sido ampliamente documentados (Saxelin et al 2005, Yan & Polk 2012). Estudios genéticos y bioquímicos han revelado que LGG posee muchos mecanismos para sobrevivir y persistir en el tracto gastrointestinal (Lebeer et al 2010), los cuales incluyen resistencia a sales biliares (Koskenniemi et al 2011), factores proteicos para la fijación en la mucosa (Reunanen et al 2012), glicosidasas, transportadores de azúcares y enzimas catalíticas necesarias para explotar las fuentes de carbohidratos característicos del hábitat intestinal (Kankainen et al 2009).

LGG es capaz de usar L-fucosa como fuente de carbono, y los genes putativos para la utilización de este azúcar están anotados en la secuencia de su genoma (Fig. 6), pero su funcionalidad nunca ha sido probada, y hay muy pocos datos disponibles sobre la utilización de L-fucosa en *Lactobacillus*. Un análisis de la utilización de L-fucosa en multitud de aislados de *L. rhamnosus* provenientes de diferentes orígenes ha evidenciado que la capacidad de metabolizar este azúcar está presente en las cepas de origen humano y ausente en cepas de origen lácteo o de vegetales (Douillard et al 2013). Esto sugiere que la utilización de L-fucosa puede ser importante en la persistencia y colonización del hábitat intestinal por lactobacilos.

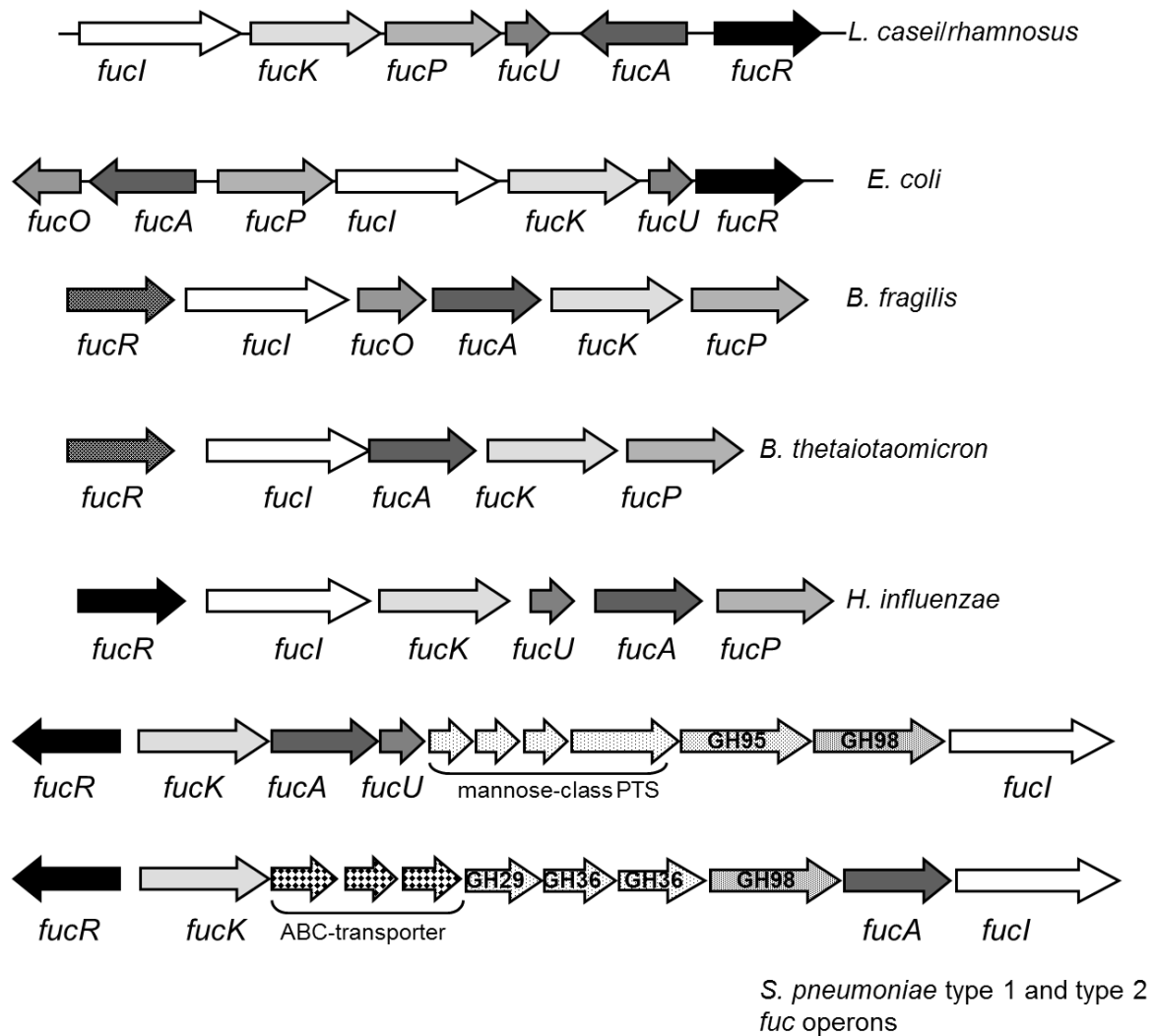


Figura 6. Representación esquemática de grupos de genes para el catabolismo de L-fucosa en diferentes grupos de bacterias. *B. fragilis*, *Bacteroides fragilis*; *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides thetaiotaomicron*; *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae*; *S. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*. En cepas de *S. pneumoniae*, dos operones *fuc* (tipo 1 y tipo 2) han sido descritos. Dentro de estos operones, genes que codifican glicosil hidrolasas (GH) se muestran junto al número de la familia a la cual pertenecen.

6.3 Metabolismo de fucosil-oligosacáridos (FUS)

Los FUS provenientes de la leche humana y los que se encuentran en las mucosas del epitelio intestinal (Becker & Lowe 2003, Bode 2012); al igual que muchos otros carbohidratos que provienen de la dieta, al no ser digeridos en el tracto gastrointestinal (Gnoth et al 2000), pueden ser utilizados por microorganismos autóctonos del sistema digestivo humano. El metabolismo de estos carbohidratos en particular aún no está muy esclarecido en las bacterias intestinales; y de acuerdo a los estudios realizados hasta

ahora, entre los microorganismos probióticos, solo algunas especies de *Bifidobacterium* y unas pocas especies de *Lactobacillus* (*L. casei* BL23, *L. casei* LC2W, *L. casei* BD-II, *L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* HN001), parecen estar adaptadas para metabolizar este tipo de azúcares (Ashida et al 2009, Rodríguez-Díaz et al 2012, Sela et al 2012). Las bifidobacterias contienen en sus genomas genes que codifican α -L-fucosidasas, las cuales son capaces de hidrolizar *in vitro* distintos fucosil-oligosacáridos formados por diferentes tipos de enlaces α -(1,2), α -(1,3) y α -(1,4) (Ashida et al 2009). Además se han encontrado secuencias de genes relacionados con el transporte, tales como permeasas que permitirían la entrada de estos azúcares fucosilados (Sela et al 2008), sin embargo su función aún no se ha determinado (Sela et al 2012), ni tampoco se conoce mucho acerca de sus rutas metabólicas. En *Lactobacillus*, a pesar de que existe un gran número de especies que colonizan el tracto gastrointestinal y otras superficies de las mucosas en humanos, el análisis de secuencias de este grupo de bacterias reveló que, genes que codifican α -L-fucosidasas solo se encuentran presentes en el grupo *L. casei/Lactobacillus paracasei/Lactobacillus rhamnosus* (Rodríguez-Díaz et al 2012).

6.3.1 Transporte y metabolismo de fucosil- α -1,3-GlcNAc por *L. casei* BL23

En el genoma de *Lactobacillus casei* BL23 se encuentra un *cluster* de genes implicados en el metabolismo del disacárido fucosil- α -1,3-GlcNAc: los genes *alfB* y *alfR* que codifican para una α -L-fucosidasa y un regulador transcripcional, respectivamente, y *alfEFG*, que codifican para proteínas con homología a enzimas EIIAB, EIIC y EIID del PTS (Rodríguez-Díaz et al 2012). Los ensayos *in vitro* demuestran que AlfB presenta alta actividad de hidrólisis del fucosil- α -1,3-GlcNAc (Rodríguez-Díaz et al 2011), y la inactivación de los genes *alfB* o *alfF* impide el crecimiento de *L. casei* con este disacárido. Con estos estudios se demostró que AlfB está involucrada en su metabolismo y que el transportador codificado por *alfEFG* participa en el metabolismo de fucosil- α -1,3-GlcNAc (Fig. 7). Además se determinó que los genes *alfR* y *ccpA*; este último codifica para la proteína de control de catabolito A (CcpA), participan en la regulación de los dos *clusters* *alfBR* y *alfEFG* (Rodríguez-Díaz et al 2012). Es de destacar, que *L. casei* BL23 metaboliza solo la porción de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) durante el crecimiento con fucosil- α -1,3-GlcNAc y excreta la L-fucosa al medio de cultivo (Rodríguez-Díaz et al 2012). Pese a que no se conoce

los mecanismos para la excreción de la L-fucosa; el transporte e hidrólisis del disacárido así como el catabolismo de GlcNAc están establecidos (Bidart et al 2014, Rodriguez-Diaz et al 2012).

L. casei BL23, además de expresar la α -L-fucosidasa AlfB y otras enzimas para el metabolismo de fucosil- α -1,3-GlcNAc, también contiene genes que codifican para las α -L-fucosidasas AlfA y AlfC. De estas dos enzimas, solo AlfC ha mostrado tener alta actividad de hidrólisis del disacárido fucosil- α -1,6-GlcNAc cuando se realizaron ensayos *in vitro*, sin embargo *L. casei* BL23 no es capaz de crecer cuando es cultivada con este azúcar (Rodriguez-Diaz et al 2011). El metabolismo de fuc- α -1,6-GlcNAc no se ha descrito en ningún organismo; y lo único que se conoce hasta ahora es que este disacárido forma parte del grupo de azúcares que constituyen el núcleo de la N-glicosilación de las proteínas presentes en células eucariotas y en la mucosa (Moran et al 2011).

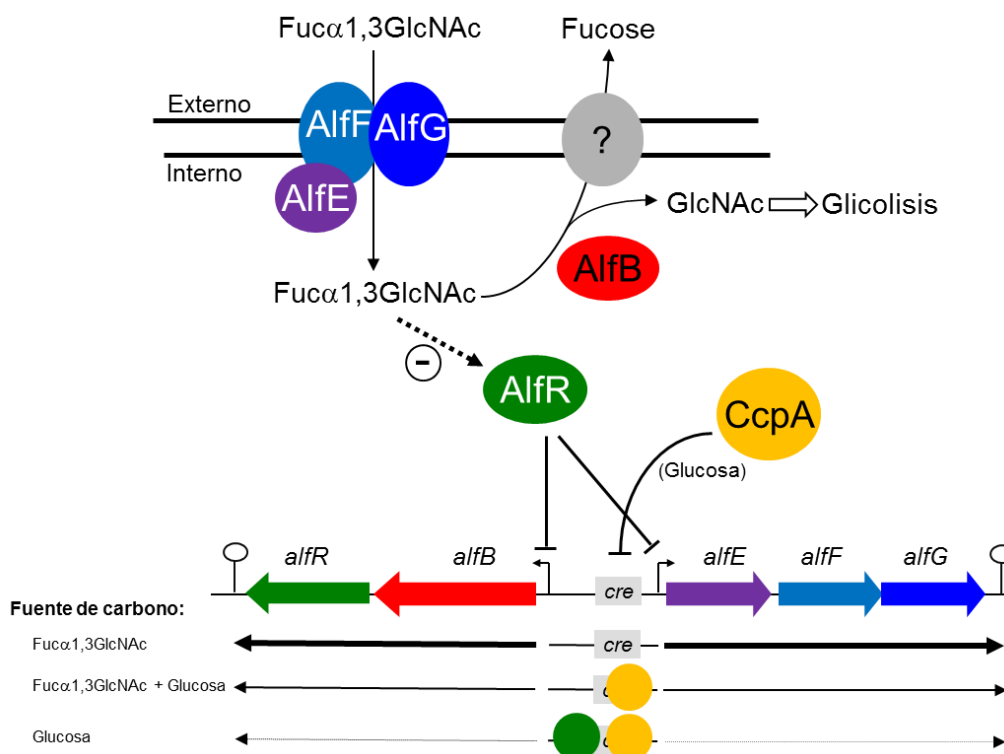


Figura 7. Modelo descrito para el transporte y metabolismo del disacárido fuc- α -1,3-GlcNAc en *L. casei* BL23. Se muestra la expresión de los genes correspondientes a los *clusters* *alfBR* y *alfEFG* con diferentes fuentes de carbono para el crecimiento (indicada por las flechas de diferente grosor). El elemento de respuesta catabólica (*cre*; *catabolite responsive element*) es el sitio de unión de la proteína CcpA. Tomado y modificado del material suplementario de Rodriguez-Diaz et al (2012).

6.4 Metabolismo de *N*-glicanos fucosilados

Los *N*-glicanos se encuentran abundantemente en la naturaleza y sus estructuras se componen principalmente de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), D-manosa (Man), D-galactosa (Gal), L-fucosa (Fuc) y ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico; Nu5Ac) (Moran et al 2011). Los *N*-glicanos están divididos en cuatro grupos: 1. Alto contenido de manosa; 2. Complejos; 3. Híbridos y 4. Glicanos poli-*N*-acetilactosamina. En todos ellos los oligosacáridos se unen al nitrógeno de una asparagina de la cadena peptídica mediante un enlace *N*-glicosil (Holemann & Seeberger 2004). Aunque los detalles estructurales están bien establecidos, poco se conoce acerca de su relación actividad-estructura.

En células eucariotas, las enzimas oligosacaril transferasas se encargan de glicosilar los residuos de asparagina (Asn) dentro de la secuencia consenso Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx es cualquier aminoácido excepto la prolina) de las cadenas peptídicas formando así las glicoproteínas (Imperiali & Hendrickson 1995). Estas *N*-glicoproteínas son degradadas en el lisosoma mediante la acción de muchas enzimas (Fig. 8), tales como glicosidasas que se encargan de eliminar gradualmente los carbohidratos del extremo no reductor del complejo *N*-glicano; proteasas que degradan la cadena peptídica y una glicosilasparaginasa que finalmente participa en la hidrólisis del enlace proteína-carbohidrato (GlcNAc-Asn) liberando GlcNAc y formando ácido aspártico (Witte et al 2011). La fracción GlcNAc-Asn puede llevar un residuo de fucosa mediante un enlace α -1,6 conformando así el compuesto Fuc-GlcNAc-Asn el cual forma parte de la estructura de muchas glicoproteínas de mamíferos (Aronson & Kuranda 1989). La secuencia de reacciones hidrolíticas en el catabolismo de dicha fracción puede variar de una especie a otra; por ejemplo la glicosilasparaginasa humana no es capaz de hidrolizar el puente *N*-glicosídico en presencia de fucosa (Noronkoski & Mononen 1997), mientras que la glicosilasparaginasa de rata si lo puede hacer (Baenziger et al 1974). Con esto se ha demostrado que el catabolismo de la fracción Fuc-GlcNAc-Asn en humanos se produce por la acción consecutiva de una α -L-fucosidasa y una glicosilasparaginasa (Noronkoski & Mononen 1997). Esto indica que una fucosa unida a GlcNAc-Asn mediante un enlace α -1,6 evita el acceso de la L-asparagina al sitio activo de la glicosilasparaginasa humana (Noronkoski & Mononen 1997).

Las *N*-glicoproteínas además de su participación en una multitud de procesos celulares incluyendo la respuesta inmune, orientación intracelular, reconocimiento intercelular, procesos proteolíticos, desarrollo embrionario, diferenciación, etc (Paulson 1989, Upreti et al 2003, Varki 1993), pueden también contribuir a la colonización de ciertos microorganismos en el tracto gastrointestinal (GI), ya que muchas de estas glicoproteínas presentes pueden actuar como receptores para la adhesión (Moran et al 2011). Por otro lado, algunos de sus componentes (por ejemplo: carbohidratos y péptidos) servirían como sustratos para la obtención de nutrientes por los microorganismos, asegurando así su permanencia en el intestino humano (Hooper & Gordon 2001, Hooper et al 1999, Koropatkin et al 2012). La diversidad química de estos glicoconjugados requiere que los microorganismos autóctonos (generalmente bacterias) produzcan diferentes enzimas degradativas, como una inversión metabólica para utilizar efectivamente estos polímeros heterogéneos (Koropatkin et al 2012). Sin embargo, hasta la fecha solo en pocos microorganismos se ha descrito la utilización de *N*-glicanos que forman parte de glicoproteínas. Entre estos microorganismos, *Capnocytophaga canimorsus*, una bacteria Gram-negativa que coloniza la cavidad oral de muchos mamíferos incluidos los humanos, es capaz de utilizar glicanos que forman parte de glicoproteínas del hospedador (Renzi et al 2011).

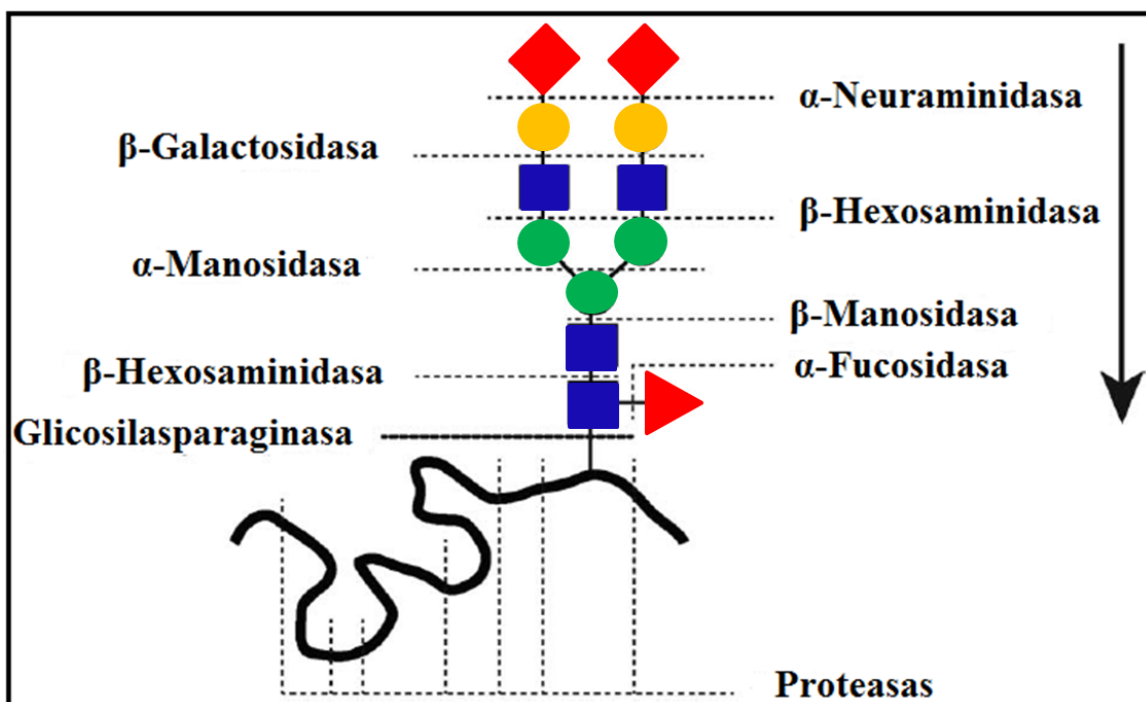


Figura 8. Representación esquemática para la degradación de *N*-glicoproteínas de células eucariotas. Los carbohidratos son degradados secuencialmente empezando desde el extremo no reductor mediante la acción de distintas glicosidasas. La acción de las

proteasas permite la hidrólisis de las cadenas peptídicas. En el paso final, el enlace glicosil-asparagina es hidrolizado por la glicosilasparaginasa. Los monosacáridos constituyentes de la *N*-glicoproteína están representados como se describen a continuación: ácido D-siálico (diamante rojo), D-galactosa (círculo amarillo), D-*N*-acetilglucosamina (cuadrado azul), D-manosa (círculo verde) y L-fucosa (triángulo rojo). Tomado y modificado de Witte et al (2011).

Otras bacterias como *S. pneumonie*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pyogenes* y *B. fragilis* son capaces de utilizar los azúcares de las glicoproteínas humanas y crecer eficientemente. Esta capacidad se debe gracias a la presencia de exoglicosidasas y endoglicosidasas involucradas en la desglicosilación de estos complejos glicoproteicos, lo cual estaría contribuyendo a su colonización y patogénesis (Burnaugh et al 2008, Byers et al 1999, Cao et al 2014, Collin et al 2002), aunque los mecanismos moleculares que utilizan para el aprovechamiento de este tipo de complejos aún no están muy claros. En algunos estudios se ha logrado la caracterización molecular y funcional de algunas enzimas tales como glicosilasparaginasa y peptidasas involucradas en el catabolismo de componentes glicoproteicos. En *Flavobacterium meningosepticum* se ha caracterizado muy bien una glicosilasparaginasa responsable de la hidrólisis del glicoaminoácido GlcNAc-Asn (Plummer et al 1984, Plummer & Tarentino 1991, Tarentino et al 1985, Tarentino et al 1990, Tretter et al 1991). En algunas especies de *Lactobacillus* como son *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus sakei* se han descrito algunas peptidasas involucradas principalmente en la degradación de dipéptidos (Montel et al 1995, Tan et al 1995, Vongerichten et al 1994). Aunque *L. delbrueckii* y *L. helveticus* son bacterias que se encuentran en productos lácteos y *L. sakei* en carnes y embutidos; las peptidasas de estas especies tienen la capacidad de hidrolizar dipéptidos comunes, los cuales pueden ser encontrados tanto en las proteínas de la leche (caseína) como en proteínas de la carne. Sin embargo, a pesar de que estas especies juegan un papel importante en la elaboración de productos fermentados derivados de la leche y en la producción de embutidos, el conocimiento sobre sus sistemas proteolíticos para la adaptación a estos nichos es en algunos casos incompleto.

B. thetaiotaomicron es la especie en la que mejor se ha estudiado la utilización de glicanos que forman parte de la mucina (Martens et al 2008) En esta bacteria se ha caracterizado un sistema que coordina la expresión de un operón *fucRIAK* para la

utilización de la L-fucosa, siendo FucR un represor transcripcional que funciona como un sensor molecular de la disponibilidad de este azúcar. L-fucosa actúa a través de FucR como un inductor de la transcripción de *fucRIAK* ya que reduce la unión de FucR al promotor de este operón; y como un co-represor del locus *csp* (*control of signal production*), el cual es responsable de la producción de la señal bacteriana que resulta en una producción incrementada de glicoconjugados fucosilados en el hospedador. Esta estrategia de regulación permitiría a *B. thetaiotaomicron* mantener las concentraciones de fucosa intracelular en un nivel determinado. La producción de fuentes de energía aprovechables por esta especie mediante esta estrategia le permite desarrollarse más eficazmente en un ecosistema altamente competitivo (Hooper et al 1999).

7 Oligosacáridos en la leche de otros mamíferos y fórmulas infantiles

La composición de oligosacáridos en la leche de otros mamíferos diferentes al humano ha sido estudiada durante muchos años, pero en ningún caso se ha evidenciado que coincida con la alta cantidad y gran diversidad estructural que se encuentra en los OLH (Urashima et al 2001). Los oligosacáridos en la leche de primates, incluyendo los humanos son más complejos y presentan mayor diversidad comparado con los que se encuentran en la leche de los no primates. En humanos entre el 50-80% de los oligosacáridos son fucosilados dependiendo del grupo Se/Le, lo cual es seguido por los chimpancés con alrededor de un 50% y gorilas con solo un 15%. La mayoría de las otras especies muestran muy bajos niveles de fucosilación (<1%) (Tao et al 2011).

Las concentraciones de oligosacáridos en leche de la mayoría de los animales domésticos incluyendo vacas, cabras, ovejas y cerdos se encuentran entre 100-1000 veces menos que los que se encuentran en la leche humana, con una más baja diversidad y una menor abundancia de oligosacáridos fucosilados. La base de la mayoría de las fórmulas infantiles es la leche de bovino, que además de contener una baja cantidad y diversidad de oligosacáridos, contiene algunos carbohidratos que no se encuentran en la leche humana como es el ácido *N*-glicolilneuraminico (Nu5Gc), del cual no se sabe aún si puede afectar la salud de los lactantes (Bode 2012).

8 Síntesis de compuestos fucosilados en el laboratorio

Metodologías de síntesis química y/o quimio-enzimática se han venido desarrollando desde hace muchos años para la producción de glicoproteínas con importancia biológica relevante (Okamoto et al 2014). Entre las estrategias para sintetizar glicoproteínas, dos juegos distintos de precursores pueden ser considerados: péptido/glicopéptido o proteína/oligosacárido (Fig. 9). En el primer caso, reacciones de acoplamiento químico selectiva de péptidos son empleadas para conectar con los segmentos péptido/glicopéptido, lo que conlleva la formación de las glicoproteínas con la estructura deseada (Fig. 9a). En el segundo caso, reacciones enzimáticas pueden ser utilizadas para incorporar covalentemente los oligosacáridos en la proteína (Fig. 9b). Esta estrategia ha sido ampliamente aplicable a la síntesis de *N*-glicoproteínas relativamente grandes. Para ambas estrategias, los oligosacáridos como bloques fundamentales son independientemente preparados mediante síntesis química, enzimática o quimioenzimática (Okamoto et al 2014). La síntesis química para la producción de oligosacáridos ha sido bastante utilizada durante muchos años con fines diversos (Bartolozzi & Seeberger 2001, Choay 1989, Flowers 1978, Jain & Matta 1992, Kameyama et al 1991, Wang et al 2011, Werz 2012). Sin embargo, la síntesis rentable es el principal obstáculo, ya que ésta requiere múltiples pasos de protección y desprotección de grupos químicos para conseguir el producto con la selectividad deseada.

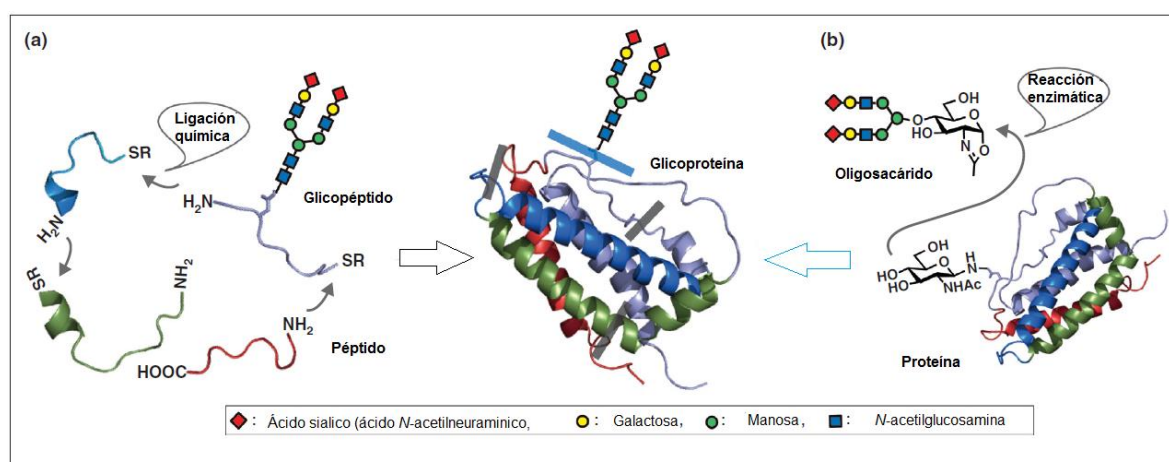


Figura 9. Representación esquemática de la estrategia de síntesis en glicoproteínas. (a) Síntesis de péptidos y glicopéptidos empleando reacciones de ligación química. (b) Síntesis convergente de oligosacáridos y proteínas que depende de un acoplamiento enzimático. Tomado y adaptado de Okamoto et al (2014).

A pesar de que los compuestos fucosilados (incluidos oligosacáridos y glicoproteínas) están involucrados en varios procesos biológicos importantes, estos permanecen en algunos casos difícilmente accesibles a la investigación científica y farmacéutica debido a las dificultades inherentes a su síntesis. Hasta la fecha, solo unos pocos estudios relacionados con la síntesis de oligosacáridos que contienen fucosa se han desarrollado mediante síntesis química (Jain & Matta 1992, Kameyama et al 1991) y síntesis enzimática (Petschacher & Nidetzky 2016). Para demostrar su función biológica y para estudiar sus potenciales aplicaciones, se requieren cantidades suficientes de estos compuestos estructuralmente definidos. Sin embargo, las dificultades encontradas para su extracción natural y/o síntesis química plantea la necesidad de desarrollar aproximaciones enzimáticas. La síntesis enzimática de oligosacáridos mediante glicosiltransferasas (GTs) (EC 2.4.1) o algunas glicosilhidrolasas (GHs) (EC 3.2.1) provee un perfecto control de la configuración anomérica y alta regio-selectividad para formar enlaces glicosídicos sin la necesidad de protección de grupos reactivos (OH) (Hancock et al 2006, Murray et al 1996).

8.1 Glicosiltransferasas (GTs) y glicosilhidrolasas (GHs)

En los sistemas biológicos, las GTs y las GHs son las responsables de la síntesis y del catabolismo de carbohidratos, respectivamente (Hancock et al 2006). Las GTs catalizan la transferencia de un monosacárido desde un donador activado, tal como un azúcar-nucleótido, (por ejemplo: Uridina Difosfato Galactosa [UDP-Gal]) a una molécula aceptora (Hancock et al 2006), mientras que las GHs hidrolizan enlaces glicosídicos mediante el uso de mecanismos que han sido extensivamente estudiados (Rye & Withers 2000, Zechel & Withers 2000, Zechel & Withers 2001). Con base a la similitud de secuencias, las GTs y GHs han sido clasificadas dentro de aproximadamente 85 y más de 100 familias, respectivamente. Se ha observado que las GHs se caracterizan por adoptar una gran variedad de formas estructurales, mientras que la mayoría de las GTs se caracterizan por ser más rígidas, presentando solo dos formas estructurales, forma A (GTfA) y forma B (GTfB) (Hancock et al 2006).

Tanto las GTs como las GHs han sido ampliamente estudiadas para la síntesis de oligosacáridos (Crout & Vic 1998, Hancock et al 2006). A pesar de que la reacción catalizada con las GTs es muy específica y de que éstas no tienen capacidad para

hidrolizar el producto final, la desventaja de estas enzimas es que son difíciles de aislar, ya que siempre se encuentran asociadas a la membrana celular y generalmente utilizan sustratos donadores caros, tales como azúcar-nucleótidos (Crout & Vic 1998, Hancock et al 2006). Para suplir este tipo de inconvenientes, principalmente la baja disponibilidad de los azúcares-nucleótidos, estrategias tales como la ingeniería metabólica en algunos microorganismos se han llevado a cabo. Tanto UDP-glucosa como UDP-galactosa han sido producidos en buenas cantidades mediante la sobreexpresión de la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (GalU) en la bacteria probiótica *L. casei* BL23 (Rodríguez-Díaz & Yebra 2011). La producción de guanosina difosfato L-fucosa (GDP-L-fucosa), sustrato utilizado en la síntesis de fucosil-oligosacáridos, ha sido llevada a cabo en *Escherichia coli* bajo diferentes estrategias. La GDP-L-fucosa en esta bacteria puede ser sintetizada a partir del intermediario glicolítico fructosa-6-fosfato, el cual es transformado en GDP-manosa por las actividades de la manosa-6P isomerasa (ManA), la fosfomanomutasa (ManB) y la manosa-1P guanililtransferasa (ManC). Subsecuentemente este azúcar-nucleótido es convertido en GDP-L-fucosa por las enzimas GDP-manosa-4,6-dehidratasa y GDP-L-fucosa sintasa dependiente de NADPH. La sobreexpresión de diferentes combinaciones de estas cinco enzimas (Lee et al 2009), la regeneración de NADPH por la expresión de glucosa-6P deshidrogenasa o NADH quinasa (Lee et al 2011), y el incremento de GTP mediante la modulación de las rutas sintéticas de los nucleótidos de guanidina, dio como resultado el aumento de la síntesis de GDP-L-fucosa en cepas de *E. coli* recombinantes (Lee et al 2012). A pesar de lograr aproximaciones exitosas para la producción de azúcares-nucleótidos, las GTs por ser proteínas que se encuentran asociadas a la membrana celular, conllevan una expresión en bacterias hospedadoras bastante complicada (Seto et al 1999). Esto hace que esta estrategia sea bastante costosa y por ende poco viable para la síntesis de carbohidratos.

Por otro lado las GHs, también llamadas glicosidasas, son enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en todos los reinos de la vida y tienen como función la ruptura de puentes glicosídicos en muchos carbohidratos, jugando así un papel muy importante en una gran variedad de procesos biológicos (Gloster et al 2008). Estas glicosidasas pueden catalizar la hidrólisis de enlaces glicosídicos bajo dos mecanismos diferentes; (i) Mecanismo de inversión: se da mediante una reacción de desplazamiento directo en la cual dos grupos carboxílicos en el sitio activo actúan como un ácido y como una base

general; el ácido protona el oxígeno glicosídico mientras que la base activa el agua entrante dando lugar al producto con una configuración anomérica invertida (Fig. 10a). (ii) Mecanismo de retención: consiste en una reacción de doble desplazamiento catalizada por dos grupos carboxílicos que actúan como ácido/base y nucleófilo. En el primer paso, el nucleófilo forma un intermediario covalente enzima-glicosilo mientras que el grupo ácido/base protona al oxígeno glicosídico del grupo saliente. En el segundo paso, el mismo residuo, previamente actuando como un ácido, trabaja como una base general activando el aceptor entrante (agua, alcohol u otro azúcar). Esto lleva a la formación de un producto con la misma configuración anomérica que el substrato (Fig. 10b) (McCarter & Withers 1994). Mediante este último mecanismo se promueve la síntesis de carbohidratos por reacciones de transglicosilación (Naumoff 2011).

La transglicosilación mediante el uso de glicosidasas tiene la desventaja de que el producto puede ser hidrolizado durante la reacción y el rendimiento final podría ser relativamente bajo (Cobucci-Ponzano & Moracci 2012); sin embargo, éstas presentan varias ventajas sobre las GTs, tales como su fácil acceso debido a la gran disponibilidad en muchos organismos, especialmente en microorganismos (Cabezas et al 1983), el potencial para transferir oligosacáridos en bloque en un solo paso (Wang & Huang 2009) y el uso de substratos fácilmente disponibles tales como compuestos de *o/p*-nitrofenil-azúcares (Rodríguez-Díaz et al 2011).

En base a la similitud de secuencia de aminoácidos las GHs se agrupan en familias (Okuyama 2011) (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Las α -L-fucosidasas pertenecen a las familias GH29 y GH95, las cuales siguen distintos mecanismos de reacción; retención e inversión, respectivamente. Las fucosidasas que pertenecen a la familia GH95, son exclusivamente 1,2- α -fucosidasas (EC 3.2.1.63) que hidrolizan enlaces Fuc α 1-2Gal unidos a los extremos no reductores de oligosacáridos (Katayama et al 2004, Leonard et al 2008), los cuales pueden encontrarse en la leche humana (2'-FL; Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc), glicoconjugados del grupo sanguíneo (antígenos de Lewis y ABO) y en residuos ramificados de xiloglucano que se encuentran en las plantas (Leonard et al 2008). No obstante, este tipo de enzimas no pueden ser utilizadas para la síntesis de carbohidratos por transglicosilación, ya que éstas emplean el mecanismo de inversión, el cual no permite dicha actividad (Naumoff 2011). Por otro lado, las fucosidasas que pertenecen a la familia GH29, α -L-fucosidasas (EC 3.2.1.51), además de tener la capacidad de hidrolizar una gran variedad de residuos fucosilados

con diferentes enlaces de tipo α -(1-2) unido a galactosa y α -(1-3), α -(1-4) y α -(1-6) unidos a *N*-acetilglucosamina (Cobucci-Ponzano et al 2008, Eneyskaya et al 2001, Rodriguez-Diaz et al 2011), son capaces de llevar a cabo síntesis de carbohidratos por la reacción de transglucosilación (Ajisaka et al 1998, Eneyskaya et al 2001, Osanjo et al 2007, Rodriguez-Diaz et al 2013, White et al 1987).

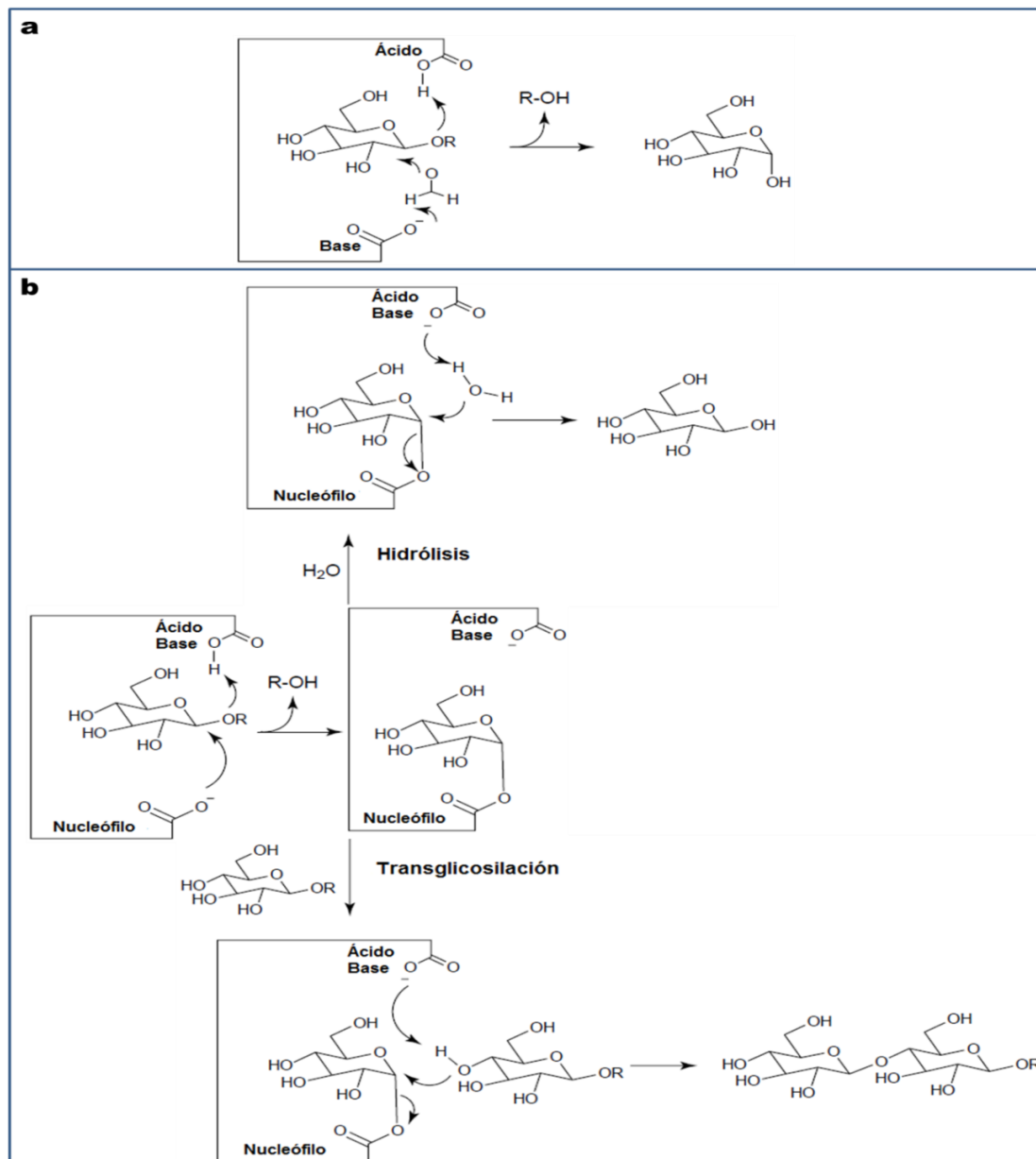


Figura 10. Mecanismos de reacción de glicosidasas. a) Inversión, b) Retención. Tomado y modificado de Perugino et al (2004)

8.2 Reacción de transglicosilación con α -L-fucosidasas

La reacción de transglicosilación realizada por α -L-fucosidasas es denominada transfucosilación. Pocos trabajos describen la síntesis de carbohidratos mediante este mecanismo a pesar de que existe una gran disponibilidad de estas enzimas en diferentes fuentes, incluyendo microorganismos, plantas, insectos, moluscos y mamíferos (Henrissat 1991). Entre los microorganismos que se han usado como fuente de α -L-fucosidasas con fines de transfucosilación están *Aspergillus niger* (Ajisaka & Shirakabe 1992), *Penicillium multicolor* (Ajisaka et al 1998), *Thermus sp* (Eneyskaya et al 2001), *Thermotoga maritima* (Osanjo et al 2007) y *Paenibacillus thiaminolyticus* (Benesova et al 2015).

Recientemente en nuestro laboratorio se ha llevado a cabo la clonación de tres genes de la cepa BL23 de *L. casei* que codifican para tres α -L-fucosidasas (AlfA, AlfB y AlfC) diferentes; las cuales han sido purificadas y caracterizadas por su capacidad de hidrolizar *in vitro* FUS naturales como 2'-FL, antígeno H y fucosil- α -1,3/1,4/1,6-*N*-acetilglucosamina (Rodríguez-Díaz et al 2011). Además de demostrarse por primera vez el papel fisiológico de una de las α -L-fucosidasas (AlfB) para metabolizar fucosil- α -1,3-GlcNAc en *L. casei* (Rodríguez-Díaz et al 2012), se comprobó también la capacidad de síntesis por reacción de transfucosilación a pequeña escala con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC, produciendo fucosil- α -1,3-GlcNAc y fucosil- α -1,6-GlcNAc, con rendimientos del 23% y 56%, respectivamente (Rodríguez-Díaz et al 2013). Estos disacáridos fucosilados son de gran importancia ya que forman parte de glicoconjugados presentes en la superficie de la mucosa intestinal humana y de oligosacáridos de la leche humana. Fuc- α -1,3-GlcNAc forma parte del grupo de antígenos Lewis^X, los cuales son encontrados en muchas glicoproteínas de la mucosa del epitelio intestinal (King 1994) y también se localizan en oligosacáridos de la leche humana (Kobata 2010). Fuc- α -1,6-GlcNAc forma parte del grupo de carbohidratos presentes en la *N*-glicosilación de las proteínas, incluidas las de la mucosa gastrointestinal (Hagglund et al 2007).

8.3 Mutagénesis de α -L-fucosidasas

Aunque las glicosidasas han demostrado ser muy valiosas en la síntesis de carbohidratos, el uso de estas enzimas está sujeto a dos limitaciones clave; el reto de

conducir la reacción en una dirección termodinámicamente desfavorable y la degradación del producto de reacción (Hancock et al 2006). Con el fin de superar tales limitaciones y mejorar el rendimiento en la síntesis, muchas glicosidasas han sido extensivamente sometidas a tácticas de ingeniería de enzimas mediante distintas estrategias tales como la generación de glicosintasas, cuyo principio se basa en la mutación de residuos catalíticos, de tal forma que se afectaría el sitio activo de la enzima (Hancock et al 2006). Las glicosintasas han perdido la capacidad de hidrólisis pero no la de formación de nuevos enlaces glicosídicos, impulsando de esta manera la reacción hacia la dirección de síntesis (Mackenzie et al 1998). A estas glicosidasas mutantes se les ha sustituido un residuo nucleofílico (Asp o Glu) en su sitio activo por otro residuo (típicamente Ala, Ser o Gly) (Bojarova & Kren 2009). Esta tecnología fue introducida el año 1998 con una β -glicosidasa de *Agrobacterium sp.* (una $\text{exo-}\beta$ -glicosidasa de retención), donde se observó que esta variante cataliza eficientemente la formación de puentes β -glicosídicos cuando se incubaba con α -glucosil fluoruro (substrato donador) en la presencia de substratos aceptores apropiados (Mackenzie et al 1998). Basados en esta tecnología se ha logrado que dos α -L-fucosidasas pertenecientes a *Thermotoga marítima* y *Sulfolobus solfataricus* sean convertidas en α -L-fucosintasas (Cobucci-Ponzano et al 2009). Estas enzimas mutantes, aunque se considera que son eficientes en algunos casos para la unión de residuos α -L-fucosil a varias moléculas aceptoras, intrínsecamente no logran controlar la regioselectividad y especificidad del aceptor, dificultando la obtención de productos puros (Sakurama et al 2012a). Otro inconveniente para este tipo de enzimas es que, además de que generalmente usan substratos donadores con baja estabilidad tales como glucosil-fluoruro (Osanjo et al 2007), la actividad hidrolítica, aunque de forma lenta, se conserva, llevando finalmente a la hidrólisis parcial del producto (Honda & Kitaoka 2006). Tales desventajas hacen que estas enzimas mutantes, las cuales provienen de microorganismos hipertermófilos, no sean muy atractivas para la síntesis de compuestos fucosilados. Sin embargo, α -L-fucosintasas procedentes de *Bifidobacterium bifidum*, permitieron la síntesis de varios productos fucosilados, con rendimientos de hasta el 55%, con un buen control de la regioselectividad y con alta especificidad del substrato (Sakurama et al 2012a, Wada et al 2008b).

Otra de las estrategias para obtener enzimas con actividad de transfucosilación mejorada es mediante evolución dirigida (Osanjo et al 2007). Esta estrategia hace referencia a una

variedad de métodos que permiten mejorar o alterar la función enzimática, los cuales son basados en los principios de la selección natural (Johannes & Zhao 2006, Kittl & Withers 2010). El desarrollo de este tipo de enzimas con actividad mejorada, se ha dado gracias a los avances en la biología molecular e ingeniería genética (Osanjo et al 2007). Estos métodos se centran básicamente en crear librerías de genes mutantes a partir de un gen silvestre a través de mutagénesis al azar, seguido por la selección de las “mejores variantes” y recombinación de éstas para conseguir enzimas mutantes con las características deseadas a las cuales se las llama transfucosidasas (Johannes & Zhao 2006, Nannemann et al 2011). Hasta la fecha, la primera y única α -L-transfucosidasa obtenida mediante evolución dirigida ha sido a partir de la α -L-fucosidasa de *T. marítima*. Con esta variante, la cual contiene tres mutaciones cerca de su sitio activo implicadas en la actividad de síntesis, se ha logrado producir *p*NP-Gal- α -1,2-Fuc con un rendimiento máximo del 65% en más de 13 horas de reacción (Osanjo et al 2007).

OBJETIVOS

Objetivos

Objetivo general

Los fucosil-oligosacáridos (FUS) son muy abundantes en la leche humana y en la mucosa gastrointestinal, y se les ha atribuido funciones fisiológicas y protectoras importantes para la salud de los niños. Entre esas funciones destaca su actividad anti-adhesiva frente a patógenos, esto es, son capaces de bloquear la unión de patógenos bacterianos y víricos a las células huésped, debido a la similitud estructural de los FUS con la de los receptores glicoconjugados de la superficie celular. Además, recientemente se ha descrito su utilización como fuente de carbono y energía por especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, lo cual abre la posibilidad de utilizar los FUS como prebióticos nuevos. A pesar de las evidencias de la participación de los FUS en funciones biológicas importantes, estos permanecen relativamente inaccesibles a la investigación científica y a la industria debido a las dificultades encontradas para su extracción natural o para su síntesis química. Con estos antecedentes en la presente Tesis Doctoral se planteó la síntesis de FUS mediante aproximaciones enzimáticas utilizando enzimas α -L-fucosidasas silvestres y modificadas por ingeniería de proteínas, con mayor actividad de transfucosilación. Los FUS sintetizados fueron evaluados por su actividad biológica como prebióticos y antiadhesinas frente a enteropatógenos. Por último, se estudiaron las rutas metabólicas implicadas en la utilización de estos carbohidratos y sus derivados en microorganismos probióticos. Esto ayudará a comprender mejor la función de los FUS en el establecimiento de estos microorganismos en el tracto gastrointestinal de los niños.

Para poder desarrollar esos objetivos generales se han planteado los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

1. Sintetizar y desarrollar el escalado de la síntesis de fucosil-oligosacáridos, por medio de la actividad de transfucosilación de las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC de *Lactobacillus casei*, y purificar los compuestos fucosilados por métodos cromatográficos.

2. Mejorar la actividad de transfucosilación de la α -L-fucosidasa AlfB, mediante la aplicación de métodos de mutagénesis aleatoria y dirigida.
3. Evaluar *in vitro* el potencial prebiótico de los fucosil-oligosacáridos sintetizados en los objetivos 1 y 2.
4. Evaluar *in vitro* la actividad anti-adhesiva frente a enteropatógenos de los fucosil-oligosacáridos sintetizados en los objetivos 1 y 2.
5. Realizar la identificación, y el análisis molecular y funcional de los genes responsables de la utilización de compuestos fucosilados y del monosacárido L-fucosa en las cepas probióticas *Lactobacillus casei* BL23 y *Lactobacillus rhamnosus* GG, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 α -L-fucosidasas de *L. casei* BL23: actividad de hidrólisis y transfucosilación

1.1 Actividad de hidrólisis

Las α -L-fucosidasas AlfA, AlfB y AlfC de *L. casei* BL23 fueron expresadas como proteínas recombinantes con colas de histidina 6X(His) y purificadas como se ha descrito previamente (Rodríguez-Díaz et al 2011). Para verificar su estado funcional, se realizaron previamente ensayos de hidrólisis de *p*-nitrofenil- α -L-fucospiranósido (*p*NP-fuc) a 1 mM con diferentes concentraciones de estas enzimas (0.01; 0.05 y 0.1 mg/ml) en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7.4 a temperatura ambiente. La cinética de la reacción se determinó mediante la medición de la absorbancia a 401 nm en intervalos de 10 segundos durante 1 hora. La determinación de la actividad hidrolítica de las α -L-fucosidasas AlfB mutantes se realizó mediante la utilización de extractos crudos de las cepas de *E. coli* que contenían estas enzimas en presencia de *p*NP-fuc a 5 mM, donde se midieron los cambios de absorbancia a 401 nm. Todas las mediciones eran realizadas en placas multipocillos (100 μ l de muestra de reacción) en un lector de placas Multiskan Ascent (Labsystem; USA).

1.1.1 Parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) de las α -L-fucosidasas (silvestres y mutantes) se realizaron reacciones en placas multipocillos utilizando 10 μ g de cada una de las enzimas en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7, a 42°C en presencia de 0.01 a 10 mM de *p*NP-fuc. La actividad se determinó midiendo la absorbancia a 401 nm en un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Germany) en intervalos de 10 segundos durante 1 hora.

La actividad específica de algunos de los mutantes de AlfB (M58 y sus variantes) fue determinada utilizando las mismas condiciones de reacción descritas anteriormente pero en presencia de 4 mM del disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc. Los cálculos de los valores se realizaron a partir de la cuantificación de uno de los productos hidrolizados (L-fucosa) en diferentes tiempos (5, 10, 20 y 60 minutos).

1.2 Reacciones de transfucosilación para la síntesis de FUS

Una vez verificada la actividad hidrolítica de las α -L-fucosidasas silvestres, se procedió a determinar la actividad de transfucosilación como se se ha descrito anteriormente (Rodríguez-Díaz et al 2013), con algunas modificaciones. En volúmenes de 100 μ l se realizaron mezclas de reacción en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.0, conteniendo *p*NP-fuc 50 mM como substrato donador y *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosa (Glu), galactosa (Gal), lactosa (Lac) y *N*,*N*-diacetilquitobiosa (DAQ) a 150 mM como substratos aceptores en reacciones independientes. Además, la 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucopiranosil-L-asparagina (GlcNAc-Asn) a concentración de 100 mM también fue utilizada como molécula aceptora. Las mezclas fueron calentadas a 98°C hasta solubilizar completamente el *p*NP-fuc y luego se enfriaron a la temperatura de reacción de 42°C. Las reacciones se iniciaron por la adición de 500 U/ml de AlfA, 180 U/ml de AlfB y 800 U/ml de AlfC (una unidad está definida como la cantidad de enzima capaz de liberar un μ mol de *p*NP en una hora) y se dejó actuar por diferentes tiempos (5, 10, 15, 20, 40, 60 y 120 min) con el fin de determinar el tiempo necesario para obtener el mejor rendimiento. Transcurrido cada uno de los tiempos, las muestras eran calentadas a 98°C durante 3 min para detener la reacción. La actividad de transfucosilación con las α -L-fucosidasas mutantes AlfB se realizó solamente con uno de los aceptores que se habían utilizado anteriormente (GlcNAc) y con 20 U/ml de cada una de las enzimas mutantes manteniendo las demás condiciones descritas anteriormente.

1.3 Síntesis a escala semi-preparativa

El escalado de la síntesis se realizó con las enzimas que mostraron tener actividad transfucosidasa (AlfB y AlfC). Para la síntesis con las moléculasceptoras GlcNAc-Asn y DAQ se realizó en volúmenes de 300 y 400 μ l de las mezclas de reacción respectivamente; mientras que con las demás moléculas (GlcNAc, Glu y Gal), las reacciones se escalaron a volúmenes de 1 ml. El tiempo de reacción con cada una de estas enzimas fue el mismo con el que se obtuvo el máximo rendimiento en la síntesis a pequeña escala (100 μ l) con cada uno de los substratos utilizados. Las demás condiciones (cantidad de enzima, temperatura y pH) fueron las mismas utilizadas anteriormente.

1.4 Análisis por HPLC con columna analítica

Los productos de las reacciones de transfucosilación a pequeña escala eran analizados por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con un sistema Jasco PU2080PLUS acoplado a un detector de índice de refracción (Jasco RI-2031 Plus) usando una columna analítica Rezex RCM-Monosaccharide (Phenoenex, Torrance, CA, USA). La columna era mantenida a 80°C y las muestras de 20 µl eran inyectadas y eluidas en modo isocrático usando agua como la fase móvil a un flujo de 0.6 ml/min. Esta columna fue utilizada para analizar todas las reacciones realizadas, excepto para la que se utilizó Asn-GlcNAc como molécula aceptora, para la cual se usó una columna analítica Rezex-RSO Oligosaccharide Ag⁺ (Phenoenex, Torrance, CA, USA) a un flujo de 0.3 ml/min y manteniendo las demás condiciones ya descritas. Para algunos casos, la formación de los productos era confirmada por la comparación de sus tiempos de retención con los de los estándares. El rendimiento en cada uno de los tiempos establecidos se determinó como el porcentaje que corresponde a la cantidad de producto formado con respecto a la cantidad de substrato donador (*p*NP-fuc) adicionado.

1.5 Purificación de FUS por HPLC en columna semi-preparativa

Los productos de las reacciones de transfucosilación a escala semi-preparativa fueron purificados por HPLC con un sistema Jasco PU2080PLUS acoplado a un detector de índice de refracción (Jasco RI-2031 Plus) usando una columna semi-preparativa Rezex RCM-Monosaccharide (Phenomenex, Torrance, CA, USA). La columna era mantenida a 80°C y las muestras de 300 µl, 400 µl y 1 ml eran eluidas en modo isocrático usando agua como la fase móvil a un flujo de 4 ml/min. Se recolectaron fracciones de 1 ml. Las fracciones apropiadas fueron agrupadas, concentradas por evaporador rotatorio (Concentrator plus, Germany) y analizadas mediante una columna analítica Rezex-Monosaccharide (Phenoenex, Torrance, CA, USA) en las condiciones descritas anteriormente. Los FUS puros eran confirmados mediante la observación de un único pico en el cromatograma.

1.6 Cuantificación de compuestos fucosilados

La cuantificación de Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc se realizó mediante la utilización de curvas patrón con azúcares estándares (Fig. 11). Para el caso de otros azúcares (fucosil-glucosa, fucosil-galactosa y fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ)), cuya forma estructural aún se desconoce, la cuantificación se realizó con curvas patrón de los estándares de uno de sus componentes (L-fucosa). Para ello se requirió la hidrólisis de los productos con AlFC (1,5 mg/ml) en una reacción de 30 μ l conteniendo 15 μ l del azúcar producido en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,4 a 42°C durante 2 horas. Las reacciones eran detenidas por calentamiento a 98 °C y analizadas por HPLC como se describe anteriormente. En la cuantificación donde se tuvo en cuenta la L-fucosa liberada, se asumió una hidrólisis completa del producto previamente sintetizado y se consideró que las concentraciones molares se mantuvieron.

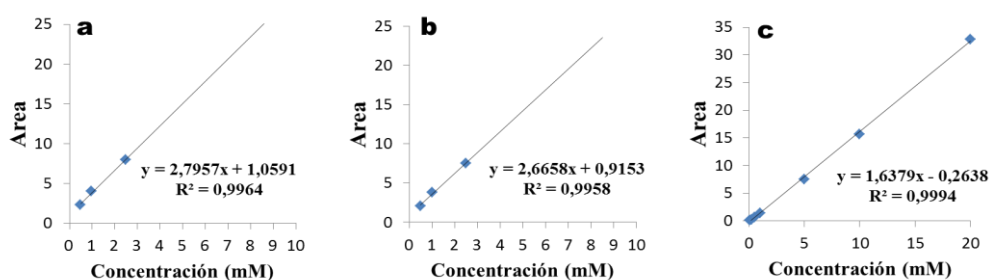


Figura 11. Curvas patrón utilizadas para la cuantificación de azúcares. a) Fuc- α -1,3-GlcNAc; b) Fuc- α -1,6-GlcNAc y c) L-fucosa

El compuesto Fuc-GlcNAc-Asn, debido a su alto costo, no se sometió a hidrólisis para su cuantificación, por lo que solamente se hizo una estimación de la cantidad producida mediante una curva patrón con el substrato donador (GlcNAc-Asn), asumiendo que el coeficiente de extinción molar de esta molécula se aproxima al del producto formado.

1.7 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Para confirmar la estructura del compuesto Fuc- α -1,6-GlcNAc-Asn, producido mediante transglucosidación, las muestras se liofilizaron, se disolvieron en 550 μ l de agua deuterada (D₂O) y se analizaron mediante RMN. El espectro de RMN fue adquirido a 27°C utilizando un espectrómetro Bruker AvanceII 600MHz, equipado con

una criosonda inversa. El espectro monodimensional (1D) de ^1H con presaturación para supresión de agua fue adquirido con 256 transientes. El espectro se referenció en relación a la señal de agua a 4.7 ppm. Los experimentos ^1H - ^{13}C heteronucleares de coherencia cuántica única (HSQC) y de enlace múltiple (HMBC) fueron adquiridos con 360 transientes sobre una anchura espectral de 10 (para ^1H) y 160-220 ppm (para ^{13}C) y con 128 puntos en la dimensión indirecta. Los experimentos de correlación espectroscópica (COSY) y correlación espectroscópica total (TOCSY) fueron adquiridos con 64 transientes sobre una anchura espectral de 10 ppm en ambas dimensiones y 128 puntos en la dimensión indirecta. El espectro de RMN fue procesado con el programa MestReNova 8.1 (© 2013 Mestrelab Research S.L.).

2 Medios de cultivos y condiciones de crecimiento

2.1 Cultivo de cepas en medio MRS complejo

Las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* usadas en este estudio se describen en la Tabla 2. Estas cepas eran rutinariamente cultivadas a 37°C bajo condiciones estáticas en medio MRS (Difco, Sparks, MD, USA) durante 18 horas. El cultivo de las bifidobacterias se hacía adicionando L-cisteína al 0.1% al medio de cultivo (MRS) y en condiciones anaeróbicas usando un sistema de generación de atmósfera anaerobia (Anaerogen, Oxoid, Basingstoke, UK).

2.2 Cultivo en medio MRS de fermentación

Tanto las cepas de *Lactobacillus* como de *Bifidobacterium* fueron también cultivadas en medio MRS de fermentación (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spain) suplementado con 0.5% de L-fucosa. La utilización de este azúcar era determinado tanto por el cambio de color del medio de cultivo por su acidificación (violeta – amarillo) como por la medición de los niveles de pH (CRISON, pH-Meter BASIC 20+). Para las cepas de *Bifidobacterium*, además de adicionar L-cisteína al 0,1% en el medio de cultivo, se usaron condiciones anaeróbicas (Anaerogen, Oxoid, Basingstoke, UK).

3 Cultivo de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en MRS basal

3.1 Curvas de crecimiento de *Lactobacillus*

Las cepas de *Lactobacillus* (Tabla 2) eran cultivadas toda la noche a 37°C bajo condiciones estáticas en medio MRS basal sin azúcar conteniendo: bacto pectona (Difco, Sparks, MD, USA), 10 g/l; extracto de levadura (Pronadisa, Madrid, Spain), 4 g/l; acetato de sodio, 5 g/l; tri-amonio de citrato, 2 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado, 0.2 g/l; sulfato de manganeso mono-hidratado, 0.05 g/l y Tween 80, 1 ml/l. Tras la incubación, los cultivos eran diluidos a una OD₅₅₀ de 0.1 en MRS basal conteniendo 4 mM de Fuc- α -1,3-GlcNAc o Fuc- α -1,6-GlcNAc. Además, la cepa BL23 de *L. casei* y mutantes en el operón *alf2* fueron cultivados en el mismo medio con el compuesto Fuc-GlcNAc-Asn, los disacáridos fucosil-glucosa y fucosil-galactosa a 4 mM y el trisacárido fucosil-N,N'-diacetilchitobiosa a 2 mM. El crecimiento de las bacterias era monitoreado hasta 31.5 horas por mediciones espectrofotométricas cada 30 min a una OD₅₅₀ en placas de 96 pocillos a 37°C sin agitación en un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Germany). Para la mayoría de los casos se realizó un mínimo de tres réplicas biológicas independientes para cada curva de crecimiento. Los resultados fueron presentados como las medias con sus desviaciones estándar. Las tasas de crecimiento (μ) fueron calculadas usando el modelo de Gompertz (Grad Pad Software, San Diego, CA, USA).

Para los análisis de la expresión de genes, los cultivos se realizaron en el medio MRS basal descrito anteriormente bajo las siguientes condiciones: conteniendo 4 mM del disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc o 0.5% de L-fucosa o 0.5% de L-fucosa más 0.2% de glucosa para las cepas de *L. rhamnosus* GG (silvestre y mutantes); y conteniendo el disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc o GlcNAc o glucosa a 4 mM para las cepas de *L. casei* BL23 (silvestre y mutantes). Estas bacterias se cultivaron hasta una OD₅₅₀ de 0.5-1 en placas de 96 pocillos y manteniendo las demás condiciones ya descritas.

El crecimiento anaeróbico y aeróbico de *L. rhamnosus* GG era llevado a cabo en 10 ml de MRS de fermentación suplementado con 20 mM L-fucosa o 20 mM glucosa en jarras de anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid) o en 50 ml en matraces Erlenmeyer con agitación a

200 rpm. Para todos los cultivos, el medio de MRS basal era inoculado con una OD₅₅₀ de 0.1 y los tiempos de incubación a 37°C eran de hasta 72 h.

Tabla 2. Lista de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* usadas en este estudio.

Género	Especie	Cepa	Referencia de otras colecciones
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	BL1	CECT 278, ATCC 7469
	<i>L. rhamnosus</i>	BL2	CECT 276, NCIB 8651
	<i>L. rhamnosus</i>	BL3	CECT 275, NCIB 8963
	<i>L. casei</i>	BL23	CECT 5275
	<i>L. casei</i>	BL28	64H
	<i>L. casei</i>	BL32	CECT4040
	<i>L. casei</i>	BL82	CECT 277
	<i>L. casei</i>	BL83	CECT 4043
	<i>L. casei</i>	BL86	CECT 4045
	<i>L. casei</i>	BL87	ATCC 11578
	<i>L. casei</i>	BL90	ATCC 334
	<i>L. casei</i>	BL91	CECT 4646
	<i>L. casei</i>	BL93	BG61
	<i>L. casei</i>	BL94	ATCC 393
	<i>L. zeae</i>	BL95	ATCC 15820, KCTC 3804
	<i>L. paracasei</i>	BL133	CECT 4022, ATCC 25302
	<i>L. plantarum</i>	BL166	NCIMB 8826 (WCFS1), ATCC
	<i>L. rhamnosus</i>	BL358	BAA-793
	<i>L. zeae</i>	BL257	HN001
	<i>L. rhamnosus</i>	BL327	CECT 288
<i>L. rhamnosus</i>	BL377	CECT 288, ATCC 9595 GG, ATCC53013	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i>	BL217	CECT 4839
	<i>B. longum</i>	BL331	CECT 4551
	<i>B. angulatum</i>	BL333	CECT 5775
	<i>B. pseudocatenulatum</i>	BL334	CECT 5776
	<i>B. adolescentis</i>	BL336	CECT 5781
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BL360	Bb-12
	<i>B. gallicum</i>	BL335	CECT 5778
<i>B. bifidum</i> ,	BL330	CECT 4549	

Colección de cultivos de nuestro laboratorio (BL); Colección Española de Cultivo Tipo (CECT), *American Type Culture Collection* (ATCC); *National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria, UK* (NCIMB). Las cepas de *L. casei* 64H y BG61 están descritas en Gasser y Mendel (1968); *L. rhamnosus* HN001, también conocida como DR20, está descrita en Prasad et al. (1998); *L. casei* BL257 fue aislada de vino de envejecimiento biológico Moreno-Arribas y Polo (2008); *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 es una cepa de la colección de cultivos Christian Hansen (CHCC), Dinamarca.

3.2 Cultivos de cepas de *Bifidobacterium*

Las cepas de *Bifidobacterium* (Tabla 2) eran cultivadas toda la noche a 37°C en medio MRS basal y bajo condiciones anaeróbicas como se describió anteriormente. Tras la incubación, los cultivos fueron diluidos a una OD₅₅₀ de 0.1 en tubos eppendorf con 300 µl de medio MRS basal con 0.1% de L-cisteína y conteniendo 8 mM Fuc-α-1,3-GlcNAc o Fuc-α-1,6-GlcNAc. El crecimiento de las bacterias era determinado por la medición de los niveles de pH del cultivo al término de 72 horas. Los cultivos bacterianos control conteniendo 8 mM de GlcNAc, L-fucosa o D-glucosa también fueron analizados.

4 Cultivo de cepas de *E. coli* para clonación

La cepa *E. coli* DH10B (*F*⁻ *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ*⁻), fue usada como huésped de clonación y *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL (*fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]ΔhsdS λDE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*) fue usada como huésped para la expresión de proteínas. Estas eran cultivadas a 37°C en medio LB (Luria-Bertani) (Pronadisa, Madrid, Spain) con agitación a 200 rpm. El correspondiente medio sólido era preparado con la adición 1.8% de agar. Ampicilina a 100 µg/ml era usada para la selección y mantenimiento de plásmidos.

5 Cultivo de cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) para ensayos de antiadherencia

Las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas (EPEC) usadas para este estudio se encuentran descritas en la Tabla 3 y éstas eran rutinariamente cultivadas en medio LB como se describe en el punto anterior. Una colonia de cada cepa EPEC era inoculada en medio DMEM (high glucose w/o L-glutamine, Biowest, Nuaille, France) suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bovino descomplementado (Sigma, St. Louis, MO, USA) y 1% (vol/vol) de L-glutamina (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e incubada toda la noche a 37°C sin agitación. Posteriormente, las células bacterianas eran diluidas al 1% en el mismo medio bajo las mismas condiciones y, tras otra noche de incubación, los cultivos eran diluidos al 10% en el mismo medio e incubados sin

agitación a 37°C durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, las células bacterianas eran centrifugadas y resuspendidas en PBS (phosphate-buffered saline) a una OD₅₉₅ de 0.1, para ser usadas en los ensayos de antiadherencia.

Tabla 3. Lista de cepas *E. coli* usadas en los ensayos de anti-adherencia.

Cepa	Serotipo	Fuente	Patogenicidad
CECT515	O1:K1(L1):H7	Orina humana	Pollos
CECT352	O127a:K67(B8):H-	Gastroenteritis infantil	Enteropatógena
CECT727	O111:K58(B4):H-	Gastroenteritis infantil	Enteropatógena
CECT729	O55:K59(B5):H6	Gastroenteritis infantil	Enteropatógena
CECT816	O86:K61(B7):H-	Gastroenteritis infantil	Enteropatógena
CECT817	O119:K69(B14):H-	Gastroenteritis infantil	Enteropatógena

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

5.1 Cultivo de células HT-29

Las células HT-29 (ATCC HTB-3) eran cultivadas en medio DMEM. Este medio era suplementado con el 1% (vol/vol) de antibióticos (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml streptomycin; PAA Laboratories, Dartmouth, MA, USA), inoculado a una densidad de 9.0×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos e incubado a 37°C en presencia de CO₂ realizando cambio de medio de cultivo cada 24 h hasta alcanzar la confluencia (aproximadamente en 72 h).

6 Análisis de azúcares y metabolitos en los sobrenadantes de los cultivos

Para determinar los carbohidratos presentes en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* crecidas en presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc o Fuc- α -1,6-GlcNAc, las bacterias eran eliminadas por centrifugación a 10000 x g y los sobrenadantes eran analizados por cromatografía de intercambio iónico a pH 12 con detección amperométrica pulsada en un sistema cromatográfico ICS3000 (Dionex) usando una columna CarboPac PA100. Un gradiente de 10 a 100 mM de NaOH fue usado durante 15 min a un flujo de 1 ml/min. Para confirmar el consumo de Fuc-GlcNAc-Asn, los sobrenadantes de los cultivos de *L. casei* BL23 eran analizados por HPLC con un sistema Jasco PU-2080Plus acoplado a detectores de índice de

refracción (Jasco RI-2031Plus) con una columna Rezex RCM-Oligosaccharide Ag⁺ a un flujo de 0.3 ml/min. El 1,2-propanodiol y el ácido láctico excretados de la cepa *L. rhamnosus* GG fueron determinados en el mismo sistema de HPLC acoplado a detectores de índice de refracción (Jasco RI-2031Plus) o UV (210 nm) con las columnas Rezex RCM-Monosaccharide y Rezex ROA-Organic Acid, respectivamente. El flujo fue de 0.6 ml/min y 0.5 ml/min en agua o 5 mM de H₂SO₄, respectivamente. Los azúcares y metabolitos presentes en los sobrenadantes eran confirmados por sus tiempos de retención cuando se comparaba con sus respectivos estándares.

7 Análisis por *Southern blot* en cepas de *Lactobacillus*

7.1 Síntesis de sondas y detección por hibridación

Las sondas de DNA fueron sintetizadas por PCR usando DNA cromosomal de *L. casei* como molde, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato marcados con digoxigenina y Taq polimerasa (Expand High Fidelity PCR System) (Roche, Mannheim, Germany). La sonda de *alfB* fue amplificada con el par de oligonucleótidos BFOR/BREV y la sonda de *alfC* se amplificó con CFOR/CREV (Tabla 9). El DNA cromosomal de las cepas de *Lactobacillus* fue digerido con la enzima de restricción EcoRI y los fragmentos generados fueron separados en un gel de agarosa al 0.8% a 50 voltios en tampón TBE 1X (Tris-Borato-EDTA). Una vez separados los fragmentos, el gel fue puesto sobre una membrana de nylon y mediante un sistema de vacío se llevó a cabo la transferencia del DNA. El proceso fue el siguiente:

Depurinación: se adicionó al gel una solución de HCl 0.25 M (cambio de color azul a amarillo del indicador de migración azul de bromofenol). Se mantuvo durante 5 minutos y se lavó con agua.

Desnaturalización: se cubrió el gel con una solución conteniendo NaCl 1.5 M; NaOH 0.5 M y se mantuvo al vacío hasta que se recuperó el color azul.

Neutralización: se cubrió el gel con una solución de Tris-HCl 0.5 pH7.4 y NaCl 3 M, se dejó durante 1 hora y se lavó con agua.

Transferencia: se añadió el tampón de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M; citrato de sodio 0.3 M a pH 7.0) y se mantuvo en el sistema al vacío durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se lavó con SSC 2X varias veces, se retiró la membrana y se secó en estufa a 45 °C. La fijación del DNA se hizo mediante la exposición a UV de baja intensidad (transiluminador) durante 4 minutos.

Hibridación: la membrana fue puesta dentro de un tubo de hibridación, donde se le añadió una solución de hibridación (SSC 5X, N-laurilsarcosina 0.1% SDS 0.02% y reactivo de bloqueo (Roche, Mannheim, Germany) 1% (p/v)) y se mantuvo en horno a 65°C durante 60 minutos. Se desnaturalizaron las sondas (*alfB* y *alfC*) en solución de hibridación 10 min a 95°C, se transfirieron dentro de tubos independientes que contenían la membrana y se dejaron hibridar toda la noche. Al día siguiente se realizaron lavados dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0.1% durante 5 minutos cada lavado y otras dos veces por 15 minutos con la misma solución pero más diluida (SSC 0.1X, SDS 0.1%). Se enjuagó con tampón 1 (Tris-HCl 100 mM; NaCl 150 mM; pH 7.5) a 65°C durante 10 minutos y se puso la solución de bloqueo (tampón 1 más reactivo de bloqueo al 1% (p/v)) dejando durante 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) diluido 10.000 veces en solución de bloqueo y se dejó actuar durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavó dos veces durante 15 minutos con tampón de lavado (tampón 1 más Tween 20 al 0.3%).

Detección: la membrana se puso en una bandeja y se equilibró con tampón 3 (Tris-HCl 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM; pH 9.5) durante 3 minutos. Se añadió substrato luminiscente CDP-Star (Roche) diluido 100 veces en tampón 3 y se mantuvo durante 5 min en la oscuridad. El revelado para la detección se hizo en un analizador de imagen luminiscente (FUJIFILM LAS-1000, Intelligent Dark-Box II, USA) con una exposición de 20 segundos.

8 Ensayos de anti-adherencia

Las células bacterianas EPEC resuspendidas en PBS a una OD₅₉₅ de 0.1 conteniendo Fuc- α -1,3-GlcNAc, Fuc- α -1,6-GlcNAc, GlcNAc o L-fucosa a una concentración final de 1 mM, en volúmenes de 100 μ l eran adicionadas a las monocapas del cultivo celular a cada pocillo, y seguidamente se incubaba a 37°C durante 2 h. Los

controles eran realizados sin la adición de carbohidratos. Transcurridas las dos horas, los pocillos eran lavados 3 veces con PBS para eliminar las bacterias EPEC no adheridas y tratados con 50 μ l de tripsina (0.5 mg/ml) a 37°C durante 5 min. Subsecuentemente 50 μ l de PBS eran adicionados a cada pocillo y las unidades formadoras de colonia (UFC) de las bacterias adheridas eran contadas mediante siembra de diluciones adecuadas en placa de LB agar. Los experimentos se realizaron con un mínimo de tres veces y cada muestra por triplicado.

8.1 Detección de la adherencia por fluorescencia

Para la detección por fluorescencia de las bacterias EPEC unidas a las células HT-29, los ensayos de anti-adherencia fueron realizados como se describió anteriormente exceptuando que las células HT-29 eran cultivadas en cubreobjetos de vidrio dentro de pocillos hasta que alcanzaron la confluencia. Una vez las bacterias EPEC no adheridas eran eliminadas por lavados con PBS, las células eran fijadas en 3% de formaldehído y lavado con PBS. Las placas de cultivo eran incubadas a 46°C durante 10 min y tratadas sucesivamente con etanol al 50%, 80% y 100%. Las células eran luego incubadas en presencia de 1 μ M de sonda fluorescente (EUB 338) (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') marcada con ATTO 594 (Isogen, De Meern, The Netherlands), la cual va dirigida a la subunidad 16S del rRNA de eubacterias (Amann et al 1990), en tampón de hibridación (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 0.9 M y SDS 0.01%) a 46°C durante 90 min en oscuridad. La unión inespecífica de la sonda era eliminada por lavados de los pocillos con el mismo tampón sin SDS. Los núcleos de las células HT-29 eran luego teñidos con 4',6-diamino-fenilindol (DAPI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 10 min en oscuridad. Después de lavar con PBS las preparaciones eran montadas con 10 μ l de ProLong Gold Antifade Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La imágenes digitales epifluorescentes fueron adquiridas con un microscopio Nikon Eclipse 90i (Nikon corporation, Japan) con un objetivo de 40X y equipado con una cámara digital (Nikon DS-5Mc). Las imágenes individuales DAPI (azul) y EUB338 (rojo) fueron procesadas y combinadas con el software Nis Elements BR 2.32 (Nikon corporation, Japan).

9 Análisis estadístico

Para detectar diferencias estadísticamente significativas entre las unidades formadoras de colonia de las muestras control sin carbohidratos y las muestras conteniendo cada uno de los carbohidratos se realizó un análisis estadístico mediante el test de T-student de la versión 21 del software SPSS IBM (IBM, USA). La significancia estadística era aceptada con $P < 0.05$.

10 Construcción de mutantes

10.1 Oligonucleótidos

En la tabla 4 se especifican los oligonucleótidos diseñados en este trabajo, sintetizados por Isogen Life Science.

10.2 Construcción de plásmidos recombinantes con genes de *L. rhamnosus* GG (LGG)

Los mutantes de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) en *fucP* (LGG_02683) y *fucI* (LGG_02685) se construyeron mediante la sustitución de los genes de tipo silvestre por las variantes mutadas. El gen *fucP* fue amplificado a partir del DNA cromosomal de LGG por PCR con la DNA polimerasa Pfx (Invitrogene) y el par de oligonucleótidos FucP1/FucP2 usando el DNA genómico como molde. El fragmento resultante de 2187 pb fue digerido con la enzima de restricción AclI y los fragmentos de 634 y 590 pb correspondiendo a las porciones 5' y 3' de *fucP*, respectivamente, fueron separados en gel de agarosa al 0.8%. Estos fragmentos fueron ligados junto con el plásmido pRV300 (Leloup et al 1997) digerido con EcoRV creando un plásmido integrativo el cual lleva el gen *fucP* con una delección interna en fase de 963 pb (pRfucP). El gen *fucI* fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos FucI1/FucI2 y el fragmento obtenido fue digerido con PstI. Uno de los fragmentos generados de 997 pb fue aislado de gel y ligado a pRV300 digerido con EcoRV/PstI. El plásmido obtenido fue digerido con EcoRI, tratado con Klenow y ligado, creando así un *frameshift* en *fucI* como fue verificado por secuenciación (Plásmido pRfucI) (Tabla 5).

Un fragmento interno de 437 pb del gen *fucR* (LGG_02680) fue amplificado con los oligonucleótidos FucR1/FucR2 y clonado en pRV300 digerido con EcoRV; este plásmido fue nombrado como pRfucR (Tabla 5).

Para realizar los ensayos de unión a DNA, El gen *fucR* fue amplificado con los oligonucleótidos FucRfor/FucRrev y la polimerasa *Expand High Fidelity DNA polymerase* (Roche). El producto de PCR de 761 pb se trató con BamHI/HindIII y clonado en el vector de expresión en *E. coli* pQE80 (Qiagen) digerido con las mismas enzimas, y el plásmido resultante (pQEfucR) fue secuenciado (Tabla 5).

Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo para clonación.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Especie/Vector
FucP1	GCCTTGCGATGGTCTATAG	<i>L. rhamnosus</i>
FucP2	GCTTCTTCTCAGTTGATCAAC	<i>L. rhamnosus</i>
FucI1	ATTGGCGCGTTGAATGAAAG	<i>L. rhamnosus</i>
FucI2	ATAAGATCCGGCTGGTTTCC	<i>L. rhamnosus</i>
FucR1	GGCGTGGCTTTGGATATG	<i>L. rhamnosus</i>
FucR2	CATCATCGCTCGCTTGAC	<i>L. rhamnosus</i>
FucRfor	GGGGGATCCATGTTTAAAAACGAGCGA	<i>L. rhamnosus</i>
FucRrev	GTCAAGCTTTTAAGCAAGGAGTTCAACG	<i>L. rhamnosus</i>
FucRforBamHI	GGGGGATCCATGTTTAAAAACGAGCGA	<i>L. rhamnosus</i>
FucRrevEcoI	GTCGAATTCTTAAGCAAGGAGTTCAACG	<i>L. rhamnosus</i>
FucRforNcoI	TTACCATGGTTAAAAACGAGCGA	<i>L. rhamnosus</i>
FucRrevXhoI	TTACTCGAGAGCAAGGAGTTCAACG	<i>L. rhamnosus</i>
AlfBBamHIFw2	CGCGGATCCATGACAGAACCATTACCGCGC	<i>L. casei</i>
AlfBHindIIIRv2	CGCAAGCTTTTACTCGTAATCTATTTGGGC	<i>L. casei</i>
AlfcFor	ATCCGCTGTACTTCGATGC	<i>L. casei</i>
AlfCRev	AAGAATCATT AATGGTGCC	<i>L. casei</i>
FucperFor	TATGATGTGTATGTACCAAGC	<i>L. casei</i>
FucperRev	AACAGAACATAGAAGATGCCG	<i>L. casei</i>
AspDecaFor	CGATATGGTGCTGTTTTTGC	<i>L. casei</i>
XhoPeptVRev2	CATTGCTCGAGTGCCATGGCATCATTGACG	<i>L. casei</i>
K29280FOR	GTCTCGTTAAAGCTAGTGC	<i>L. casei</i>
K29280REV	CGGTTTGCATGTTGTAGATC	<i>L. casei</i>
pGEXfor	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	pQE80
pGEXrev	CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG	pQE80
M13Fwd	CAGGAAACAGCTATGAC	pRV300
M13Rev	GTTTTCCCAGTCACGAC	pRV300

Este mismo gen *fucR* fue amplificado con el par de oligonucleótidos FucRforBamHI/FucRrevEcoI. El fragmento generado de 775 pb fue tratado con BamHI

y EcoRI y clonado en el plásmido pGEX-2T digerido con estas mismas enzimas. El plásmido resultante fue nombrado como pGfucR (Tabla 5), en el cual se verificó la inserción del gen mediante PCR con oligos externos del vector pGEXfor /pGEXrev y digestión con enzimas apropiadas.

Para clonar este gen para su expresión como una proteína recombinante con un *tag* de histidina en el carboxi terminal, su amplificación se realizó con los oligos FucRforNcoI /FucRrevXhoI. El producto amplificado de 768 pb se trató con NcoI y XhoI y se clonó en pET-28a digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante fue nombrado como pEfucR (Tabla 5) en el cual se comprobó la inserción del gen mediante digestión con enzimas apropiadas.

10.3 Construcción de plásmidos recombinantes con genes de *L. casei* BL23

Para producir las enzimas variantes de la α -L-fucosidasa AlfB (proveniente de *L. casei* BL23), se realizaron reacciones de PCR utilizando dNTPs en concentraciones desiguales (1 mM dTTP y dCTP, 0.2 mM dATP y dGTP), el vector pQalfBWT (conteniendo el gen *alfB* silvestre) (Rodríguez-Díaz et al., 2011) como molde, y el par de oligonucleótidos: AlfBBamHIFw2/AlfBHindIIIr2. Los fragmentos resultantes fueron de 1245 pb, los cuales se clonaron en el vector pQE80 digerido con BamHI y HindIII. Tras la transformación de la mezcla de ligación en *E. coli*, se obtuvo una librería de mutantes en *alfB* (plásmidos pQalfB) que se cribaron por su diferente actividad fucosidasa (ver más abajo) y se secuenciaron.

A partir de la combinación del constructo pQalfBWT (conteniendo el gen *alfB* silvestre) (Rodríguez-Díaz et al 2011) y de uno de los constructos pQalfBM58 (conteniendo el gen *alfB* con tres mutaciones, M58), se generaron 6 nuevos mutantes sencillos y dobles realizando todas las combinaciones posibles (M1, M2, M3, M1-2, M1-3 y M2-3). Para generar los mutantes M1 y M2-3 se realizó la digestión del constructo conteniendo el gen *alfB* silvestre y del que presentaba las tres mutaciones (M58) con Kpn2I (corta en dos sitios) de forma independiente. Los fragmentos generados en cada uno de ellos de 4941 y 1056 pb se purificaron a partir de gel de agarosa al 0.8% y se ligaron de forma cruzada; de tal forma que el fragmento de 4941 pb proveniente de M58 conteniendo la mutación 1 fue ligado con el fragmento de 1056 pb del silvestre. De forma contraria, el fragmento de 4941 pb del gen silvestre se ligó con el fragmento 1056 pb de M58, el cual

presentaba 2 mutaciones, consiguiendo así obtener un nuevo mutante sencillo y otro doble (p*QalfBM58-M1* y p*QalfBM58-M2-3*, respectivamente). Para generar los mutantes M1-2 y M3 se realizó una doble digestión con las enzimas BsrGI y HindIII en los constructos del silvestre y M58, generando así dos fragmentos de 5639 y 320 pb en cada uno de ellos. Utilizando la misma estrategia mencionada anteriormente se obtuvieron otros dos nuevos mutantes (p*QalfBM58-M1-2* y p*QalfBM58-M3*), correspondiendo a un mutante doble y otro sencillo respectivamente. Los últimos dos mutantes, M2 y M1-3 se consiguieron tras la digestión de los constructos de mutantes previamente generados (p*QalfBM58-M1*, p*QalfBM58-M2-3* y p*QalfBM58-M3*), en la cual, los dos primeros plásmidos fueron digeridos con Kpn2I, mientras que el tercero fue digerido con BsrGI y HindIII. Después se purificaron en gel de agarosa los fragmentos que interesaban; correspondientes a 4941, 5677 y 1056 pb, respectivamente. La ligación del fragmento de 5677 pb proveniente de pQE80*alfBM58-M2-3* con el fragmento de 320 pb de p*QalfBWT* anteriormente purificado, permitió la obtención del mutante sencillo p*QalfBM58-M2*. Entre tanto, la ligación de los fragmentos de 4941 y 1056 de p*QalfBM58-M1* y p*QalfBM58-M3*, respectivamente, permitió obtener el mutante doble p*QalfBM58-M1-3*. De esta manera se logró finalmente conseguir las 6 posibles combinaciones de mutantes derivados de la variante p*QalfBM58*.

Los mutantes en los genes del operón *alf2* que codifican para una α -L-fucosidasa AlfC (LCABL_29340), una permeasa (LCABL_29330) un regulador transcripcional (LCABL_29310) y una quinasa (LCABL_29280) fueron generados. Estos genes fueron amplificados a partir del DNA genómico de *L. casei* BL23 por PCR con la polimerasa *Phusion* (Invitrogen) utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos respectivamente: AlfCFor/AlfCRev, FucperFor/FucperRev, AspDecaFor/XhoPeptVRev2 y K29280FOR/ K29280REV (Tabla 4). El fragmento generado de 669 pb que codifica para la α -L-fucosidasa AlfC (LCABL_29340) y el fragmento del gen de 486 pb que codifica para la quinasa (LCABL_29280) fueron clonados en pRV300 digerido con EcoRV, a los cuales se los nombró como plásmido pRalfC y pRsugK, respectivamente. Por otro lado, el fragmento de 1322 pb del gen que codifica para la permeasa (LCABL_29320) fue clonado en pRV300 digerido con BclI y tratado con Klenow. Una vez se obtuvo este constructo, se digirió con BclI, se trató con Klenow y se ligó, lo que permitió crear una mutación con un cambio en la pauta de lectura (*frameshift*) como se pudo comprobar por secuenciación (plásmido pRalfH). El

fragmento de 1289 pb del gen que codifica para el regulador transcripcional (LCABL_29310) se clonó en romos en el plásmido pRV300 digerido con dos enzimas (EcoRV y KpnI) y tratado con la enzima Klenow. Una vez el constructo fue obtenido, éste fue digerido nuevamente con Sall (corta en dos sitios del inserto) y religado, lo cual permitió eliminar un fragmento central, generando así una delección de 466 pb (plásmido pRalfR2) (Tabla 5).

Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Genotipo relevante o propiedades	Fuente o referencia
pRV300	Plásmido no replicativo de <i>Lactobacillus</i> ; Erm ^r y Amp ^r .	(Leloup et al 1997)
pQE80L	Plásmido para expresión - 6xHis-N-terminal; Amp ^r y Clf ^r	Qiagen
pGEX-2T	Plásmido para expresión con fusión proteína GST; Amp ^r	GE Healthcare Life Sciences
pET-28a	Plásmido para expresión - 6xHis N y C-terminal; Kan ^r	EMD Biosciences
pRfucP	pRV300 con un fragmento de 1.2 kb del gen <i>fucP</i> de LGG	En este trabajo
pRfucI	pRV300 con un fragmento de 0.99 kb del gen <i>fucI</i> de LGG	En este trabajo
pRfucR	pRV300 con un fragmento de 0.43 kb del gen <i>fucR</i> de LGG	En este trabajo
pQfucR	pQE80 con un fragmento de 0.77 kb (gen <i>fucR</i> de LGG)	En este trabajo
pGfucR	pGEX-2T con un fragmento de 0.77 kb (gen <i>fucR</i> de LGG)	En este trabajo
pEfucR	pET-28a con un fragmento de 0.77 kb (gen <i>fucR</i> de LGG)	En este trabajo
pQalfBWT	pQE80 con el gen <i>alfB</i> (1.2 kb) de BL23	(Rodriguez-Diaz et al 2011)
pQalfBMut	pQE80 (19 constructos) con el gen <i>alfB</i> de BL23 con distintas mutaciones	En este trabajo
pQalfBM58-M1	pQE80 con el gen <i>alfB</i> de BL23 con una mutación 1 (M1: N196S)	En este trabajo
pQalfBM58-M2	pQE80 con el gen <i>alfB</i> de BL23 con una mutación 1 (M2: V261M)	En este trabajo
pQalfBM58-M3	pQE80 con el gen <i>alfB</i> de BL23 con una mutación 1 (M3: N346K)	En este trabajo

pQalfBM58-M1-2	pQE80 con el gen <i>alfB</i> con doble mutación; 1 y 2 (M1-2: N196S; V261M)	En este trabajo
pQalfBM58-M1-3	pQE80 con el gen <i>alfB</i> con doble mutación; 1 y 3 (M1-3: N196S; N346K)	En este trabajo
pQalfBM58-M2-3	pQE80 con el gen <i>alfB</i> con doble mutación; 2 y 3 (M2-3: V261M; N346K)	En este trabajo
pRalfC	pRV300 con un fragmento de 0.67 kb del gen <i>alfC</i> que codifica para una fucosidasa de <i>L. casei</i> BL23	En este trabajo
pRalfH	pRV300 con un fragmento de 1.3 kb del gen que codifica para una permeasa de <i>L. casei</i> BL23	En este trabajo
pRsugK	pRV300 con un fragmento de 0.48 kb del gen que codifica para una hipotética quinasa de <i>L. casei</i> BL23	En este trabajo
pRalfR2	pRV300 con un fragmento de 0.82 kb del gen que codifica para un regulador transcripcional de <i>L. casei</i> BL23	En este trabajo

Erm^r: resistencia a eritromicina, Amp^r: resistencia a ampicilina, Kan^r: resistencia a kanamicina, Clf^r: resistencia a cloranfenicol

11 Transformación

11.1 Transformación de *E. coli*

Los productos de la ligaciones, de los genes de *L. rhamnosus* (pRfucP, pRfucI, pRfucR, pQfucR, pGfucR y pEfucR) y de *L. casei* (pRalfC, pRalfH, pRalfR2, pRsugK, y todos los plásmidos pQalfB y sus variantes), fueron usados para transformar *E. coli* DH10B por electroporación, preparando las células electrocompetentes tal y como recomienda el fabricante del GenePulser (Bio-Rad). Sin embargo, el plásmido pRalfH, una vez transformado en esta cepa fue recuperado como plásmido recombinante y utilizado para transformar la cepa de *E. coli* GM119 (*dam*⁻ *dcm*⁻), como un paso intermedio para obtener el plásmido con el sitio accesible para el corte con BclI (no metilado). La transformación se realizó mediante electroporación (GenePulser) a 2.5 KV y 200 Ω con 50 µl de estas cepas electrocompetentes y entre 1-10 µl de los productos de ligación en cubetas de 0.2 cm entre electrodos. Una vez realizada la electroporación, las bacterias se resuspendieron en 450 µl de medio de recuperación SOC (Tryptona 20 g/l; extracto de

levadura 5 g/l; MgSO₄ 4.8 g/l; dextrosa 3.6 g/l; NaCl 0.5 g/l y KCl 0.18 g/l) y se incubaron a 37°C durante 1 h en agitación a 200 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, para la selección se sembró en placas con medio LB-agar suplementado con 100 µg/ml de ampicilina para las transformaciones con los plásmidos pRV300, pQE80L y pGEX-2T y con 25 µg/ml de kanamicina para las transformaciones con el plásmido pET-28a.

Las transformaciones de las ligaciones de *alfB* mutagenizado (plásmidos pQ*alfB*) se sembraron en medio LB-agar conteniendo además de ampicilina 100 µg/ml, 0.1 mM de X-Fuc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -L-fucopiranosido) y se seleccionaron las colonias con tonalidad azul claro, las cuales supuestamente expresaban variantes de la α -L-fucosidasa AlfB con baja actividad hidrolítica.

Tabla 6. Cepas *E. coli* usadas en transformación con plásmidos recombinantes para inactivación de genes y expresión de proteínas.

Cepa	Genotipo	Fuente referencia	o
DH10B	<i>F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ^-</i>	Invitrogen	
GM119	<i>F⁻ dam-3 dcm-6 metBI galIK2 galT22lacY tsx-78 supE44 (thi-)tonA3I mtl-1)</i>	(Arraj & Marinus 1983)	
BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λDE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs	
C41 (D3) (BL21)	<i>F⁻ ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)(DE3)pLysS (Cm^r)</i>	Lucigen	
Shuffle (BL21)	<i>fhuA2 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacI^f) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	New England Biolabs	
Rosetta (D3) (BL21)	<i>E. coli</i> str. B <i>F⁻ ompT gal dcm lon? hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S) pLysS RARE[T7p20 ileX argU thrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori_{p15A}](Cm^R)</i>	Novagen	

Los plásmidos pGfucR y pEfucR además de ser usados para transformar la cepa BL21, se utilizaron para transformar la cepa Rosetta (DE3) derivada de BL21, donde la selección de las colonias que contenían pGfucR se realizó en placas LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) más cloranfenicol (34 µg/ml). Las cepas de *E. coli* que contenían pEfucR fueron seleccionadas con kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml). Además, el plásmido pGfucR fue usado para transformar las cepas C41 (DE3) y Shuffle, derivadas también de la cepa BL21, las cuales fueron seleccionadas en medio con ampicilina (100 µg/ml).

11.2 Transformación de *L. rhamnosus* GG (LGG)

Los plásmidos conteniendo los genes mutados *fucP* y *fucI* fueron transformados por electroporación en LGG utilizando el equipo GenePulser (Bio-Rad) a 1.7 KV y 200 Ω con 100 µl de células electrocompetentes y entre 5-10 µl de DNA (cantidad: 0.5-1 µg) como se había descrito anteriormente (De Keersmaecker et al 2006). Una vez realizada la electroporación, inmediatamente estas células fueron diluidas en 5 ml de MRS suplementado con 2 mM de CaCl₂ y 20 mM de MgCl₂ e incubadas sin agitación a 37°C durante 3 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, estas células fueron sembradas en placas MRS-agar suplementado con 5 µg/ml de eritromicina e incubadas a 37°C. Transcurridas 48 h, se seleccionaron colonias, en las cuales se había obtenido la integración por una recombinación sencilla. Posteriormente, los clones fueron cultivados durante aproximadamente 200 generaciones en MRS sin antibióticos y posteriormente se sembraron diluciones (10⁻⁶ y 10⁻⁷) en placas de MRS. Transcurridas 48 horas las colonias resultantes eran replicadas en placas de MRS con eritromicina (5 µg/ml). Las colonias que bajo un segundo evento de recombinación dieron un fenotipo sensible a la eritromicina fueron seleccionadas para evaluar por PCR la sustitución de los genes de tipo silvestre por la copia mutada, que presentaba una delección o un *frameshift* con la desaparición de un sitio de restricción. Después de la confirmación de las mutaciones por secuenciación, dos clones fueron seleccionados y nombrados como BL394 ($\Delta fucP$) y BL395 ($\Delta fucI$).

El plásmido pRFucR fue usado para transformar LGG seleccionado por resistencia a eritromicina como se describe anteriormente. En este caso, la recombinación homóloga da lugar a un mutante en *fucR* con dos copias truncadas del gen. Los integrantes

obtenidos fueron comprobados por PCR y uno de ellos se seleccionó: cepa BL396 (*fucR*).

11.3 Transformación de *L. casei*

El plásmido pRalfR2 fue utilizado para transformar la cepa BL23 de *L. casei* por electroporación a 1.25 KV y 100 Ω con 50 μ l de células electrocompetentes y entre 5-10 μ l de DNA (cantidad: 0.5-1 μ g). Una vez realizada la electroporación, inmediatamente estas células fueron diluidas en 450 μ l de MRS suplementado con 0.5 M de sacarosa, 2 mM de CaCl₂ y 20 mM de MgCl₂ e incubadas sin agitación a 37°C durante 1.5 h. Transcurrido dicho tiempo, las células fueron sembradas en placas MRS-agar suplementado con 5 μ g/ml de eritromicina e incubadas a 37°C. Una de las colonias que llevaba el plásmido pRalfR2 integrado en el genoma fue seleccionada y cultivada aproximadamente durante 200 generaciones en MRS sin antibióticos y posteriormente sembrada (diluciones de 10⁻⁶ y 10⁻⁷) en placas MRS, donde finalmente se seleccionaron las colonias que bajo un segundo evento de recombinación dieron un fenotipo sensible a la eritromicina por excisión del plásmido del cromosoma. Después de la confirmación del evento que dejaba una copia delecionada de *alfR2* en el cromosoma mediante PCR, la cepa mutante obtenida fue nombrada como BL405 (Δ *alfR2*). Los plásmidos pRalfC, pRalfH y pRsugK fueron usados para transformar la cepa BL405 (Δ *alfR2*) para obtener dobles mutantes, de las cuales, solo los que llevaban el plásmido pRalfH integrado fueron sometidas a un segundo evento de recombinación, permitiendo así la liberación del plásmido pRV300 y generando un fenotipo de sensibilidad a eritromicina. Tras la confirmación de la mutación por PCR y secuenciación, esta cepa doble mutante se nombró como BL407 (Δ *alfR2-alfH*). La confirmación de la integración de los plásmidos en la cepa Δ *alfR2* se realizó por PCR y se generaron dos nuevos mutantes dobles que fueron nombrados como BL406 (Δ *alfR2-alfC*) y BL408 (Δ *alfR2-sugK*), respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Cepas mutantes generadas a partir de *L. rhamnosus* GG (LGG) y *L. casei* BL23.

Cepa mutante (gen)	Especie (cepa original)	Características
BL394 ($\Delta fucP$)	<i>L. rhamnosus</i> GG	Delección 963 pb en <i>fucP</i>
BL395 ($\Delta fucI$)	<i>L. rhamnosus</i> GG	Frameshift en <i>fucI</i>
BL396 ($\Delta fucR$)	<i>L. rhamnosus</i> GG	Inserción pRV300 en <i>fucR</i>
BL405 ($\Delta alfR2$)	<i>L. casei</i> BL23	Delección 466 pb en <i>alfR2</i>
BL407 ($\Delta alfR2-alfH$)	<i>L. casei</i> BL23	$\Delta alfR2$ y frameshift en <i>alfH</i>
BL406 ($\Delta alfR2-alfC$)	<i>L. casei</i> BL23	$\Delta alfR2$ e inserción pRV300 en <i>alfC</i>
BL408 ($\Delta alfR2-sugK$)	<i>L. casei</i> BL23	$\Delta alfR2$ e inserción pRV300 en <i>sugK</i>

12 Expresión y purificación de proteínas

El gen *fucR* de *L. rhamnosus* GG clonado en los plásmidos pQE80L, pGEX-2T y pET-28a, fue expresado en diferentes cepas de *E. coli* (BL21, Rosetta, Shuffle y C41 [DE3]). En la cepa BL21 solo se expresó el gen clonado en pQE80L, mientras que las cepas Shuffle y C41 [DE3] fueron usadas para expresar el gen en pGEX-2T. La cepa Rosetta fue usada para expresar *fucR* desde los tres plásmidos (pQE80L, pGEX-2T y pET-28a). El gen *alfB* de *L. casei* BL23 y sus variantes mutadas clonadas en pQE80L fueron expresados en la cepa DH10B de *E. coli*. Para todos los casos, la purificación proteica fue realizada a partir de 500 ml de medio LB con cada una de las cepas de *E. coli* las cuales habían crecido a 25°C hasta una OD₅₅₀ de 0.4 e inducidas con 0.1 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante cuatro horas. Los pellets bacterianos fueron resuspendidos en 10 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y 50 mM de Na₂SO₄ conteniendo 0.5 mM DTT (dithiothreitol), 0.5 mM PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) y 1 mg/ml de lisozima. Después de 30 min, las células se lisaron por inmersión en nitrógeno líquido (solamente las que contenían FucR), el DNA fue degradado por sonicación y los extractos crudos se obtuvieron por centrifugación. Estos fueron filtrados por membranas de 0.45 μ m y las proteínas provenientes de las cepas que contenían pQE80L y pET-28a, con expresión de colas de histidina en el amino y carboxi terminal de FucR (FucR-6xHis-amino y FucR-6xHis-carboxi), respectivamente, y las proteínas (6xHis)AlfB fueron pasadas a través de columnas His-Trap FF (GE Healthcare life Sciences, UK), mientras que la expresada con fusión a GST; FucR-GST, se purificó a través de una columna GSTrap FF (GE Healthcare life Sciences, UK). Para ambos casos se utilizó un sistema de purificación de proteínas mediante un equipo

AKTA (GE Healthcare) bajo las recomendaciones del proveedor. Para las proteínas que fueron purificadas mediante columnas His-Trap FF, se utilizó un tampón de unión (50 mM de Tris-HCl a pH 7,5 y 50 mM de Na₂SO₄) y otro de elución, que además contenía 0.5 M de imidazol. Este último era puesto en gradiente de 5 a 65% para obtener la máxima proteína posible. Entre tanto, para las proteínas purificadas mediante columnas GSTrap FF se utilizó el tampón de unión (20 mM de Na₂PO₄ a pH 7.3 y 0.15 M de NaCl) y un tampón de elución que contenía 20 mM de Tris-HCl a pH 8.0 y 10 mM de glutatión reducido. Las alícuotas que se recogieron durante la purificación fueron analizadas junto con las proteínas que se encontraban en el pellet en una electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Las alícuotas en las que se evidenció expresión proteica fueron concentradas en Amicones de 10-15 KDa (Millipore), cuantificadas y se conservaron a -80° C hasta su uso.

Debido a que la proteína FucR de LGG formaba cuerpos de inclusión en todas las formas en las que fue expresada, se realizó nuevamente la expresión en la cepa Rosetta de *E. coli* utilizando el plásmido pE_{fucR} como se describió anteriormente. La extracción proteica se hizo a partir del pellet, el cual fue resuspendido con 10 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y 50 mM de Na₂SO₄ conteniendo 8 M de urea, dejándolo durante 3 h en rotación continua. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó y se continuó con el protocolo descrito anteriormente en la purificación de proteínas con colas de histidina. La urea fue eliminada mediante diálisis (membrana de 10 KDa de corte) usando altas concentraciones de sal (2 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 1mM de MgCl₂ y 1 mM de β-mercaptoetanol), que fueron disminuidas paulatinamente en la diálisis hasta 0.2 M NaCl en pasos de reducción de no más de 0.2 M NaCl por cada ciclo de diálisis a 4°C. Esta proteína fue concentrada con Amicones de 10-15 KDa (Millipore), cuantificada y visualizada en una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

13 Análisis de la expresión de los genes por RT-qPCR

13.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA de las cepas de *L. rhamnosus* se realizó a partir de cultivos en MRS basal (9 ml) conteniendo 0.5% de L-fucosa o 0.5% de L-fucosa más 0.2% de

glucosa crecidos hasta una OD₅₅₀ de 0.9-1. Para los experimentos con el disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc o L-fucosa el RNA fue aislado de cultivos (1 ml) conteniendo 4 mM de estos azúcares, los cuales habían alcanzado una OD₅₅₀ de 0.5-0.6. La extracción de RNA de las cepas de *L. casei* se realizó a partir de cultivos en MRS basal (1 ml) conteniendo el disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc o GlcNAc o glucosa a 4 mM, los cuales alcanzaron una OD₅₅₀ de 0.5-0.6. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación y lavadas dos veces con EDTA 50 mM a pH 8.0, utilizando el mismo volumen en el que habían crecido. Los pellets fueron resuspendidos en un 1 ml de TRizol (Gibco) a los cuales se les adicionó 0.5 g de perlas de vidrio (0.1 mm de diámetro). Las bacterias se rompieron con un Mini beadBeater (Biospec Products, Vartlesville, OK) con tres ciclos de 45 segundos a máxima velocidad y el RNA total fue aislado siguiendo las recomendaciones del fabricante de TRizol, que consistió en la adición de 200 μ l de cloroformo, agitación en vortex durante 15 seg, incubación a temperatura ambiente (3 min) y centrifugación a 17000 x g durante 15 min a 4°C. A la fase acuosa recuperada tras la centrifugación se le adicionó 500 μ l de isopropanol, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 17000 x g durante 10 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 10000 x g durante 5 min a 4°C. Una vez centrifugado, el etanol fue eliminado y el RNA fue resuspendido en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) y cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7). Entre 100 y 400 ng de la extracción de RNA obtenida fueron tratados con DNAsa I (RNase free, Fermentas).

13.2 RT-qPCR

Entre 50-100 ng de RNA previamente tratado con DNAsa fueron retrotranscritos (RT) usando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante fue utilizado para realizar PCR cuantitativa (qPCR). Esta fue realizada en un LightCycler 480 II System (Roche) con LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Roche). Los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el servicio primer-BLAST de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) para obtener amplicones que fueron desde 70 a 100 pb en tamaño. La qPCR fue realizada para cada muestra de cDNA con los pares de oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 8.

La mezcla de reacción (10 μ l) contenía 5 μ l de SYBR® Green PCR Master Mix, 0.5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos (10 μ M) y 1 μ l de la reacción de síntesis de cDNA diluida 10 veces. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de tres pasos consistiendo en desnaturalización a 95°C durante 10 seg, hibridación de los oligonucleótidos a 60°C durante 20 seg y extensión de estos oligonucleótidos a 72°C durante 20 seg. Para cada juego de oligonucleótidos los valores CT (*Cycle Threshold*) fueron determinados por el método automatizado implementado en el software de LightCycler (Versión 4.0; Roche)

Los genes *pyrG* (LGG_02546), *recG* (LGG_01660) y *leuS* (LGG_00848) de LGG y *pyrG* (LCABL_27380), *ileS* (LCABL_15110) y *lepA* (LCABL_17760 de *L. casei* BL23 fueron seleccionados como genes de referencia. La expresión relativa fue calculada con la herramienta del software REST (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl et al 2002). La eficiencia de la amplificación fue determinada para cada par de oligonucleótidos y cada reacción RT-qPCR se realizó por triplicado como mínimo con dos muestras biológicas independientes.

14 Ensayos de retardo en gel

La región del promotor *fucI* y la región itérgica *fucA-fucR* de LGG fueron amplificadas por PCR con los siguientes pares de oligonucleótidos: ProFucIfor/ProFucIrev y ProfucA-fucRrev/ProfucA-fucRrev respectivamente (Tabla 9). Los ensayos de la unión de FucR fueron llevados a cabo en un volumen de 15 μ l conteniendo 2.5 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 25 mM de MgCl₂, 0.25 mM de EDTA, 0.25 mM de ditiotretol, 1.5% de glicerol, 1 μ g de DNA de esperma de salmón, 50 ng de cada fragmento de PCR y cantidades variables (0, 25, 50 y 75 ng) de la proteína 6X(His)FucR. Después de 15 min a 37°C las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 6% en tampón TAE 1X a 100 V que fueron teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 8. Oligonucleótidos usados en este trabajo para RT-qPCR.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Especie
fucIqPCRfor	TGGCTAAGCATGGGTTTCCTG	<i>L. rhamnosus</i>
fucIqPCRrev	TCGCCATTGATCGTCTCTCG	<i>L. rhamnosus</i>
fucKqPCRfor	CCGGAGAGCCAGTCAAAGTT	<i>L. rhamnosus</i>
fucKqPCRrev	CTCAACAGGCCAGCTACAA	<i>L. rhamnosus</i>
fucPqPCRfor	TTTGTCGGCTGACACGATGA	<i>L. rhamnosus</i>
fucPqPCRrev	GCCGGCGCTAATTCAGAAAG	<i>L. rhamnosus</i>
fucUqPCRfor	GAGCAGATGGCCTGACAGTT	<i>L. rhamnosus</i>
fucUqPCRrev	ACTGGCGGTTACCATTAGG	<i>L. rhamnosus</i>
fucAqPCRfor	GAAGTTGCTGGTGCAAAGGG	<i>L. rhamnosus</i>
fucAqPCRrev	TCATCCGGGTATTCGCTGTG	<i>L. rhamnosus</i>
fucRqPCRfor	TCAGTTGTGCAGTGAGCAGT	<i>L. rhamnosus</i>
fucRqPCRrev	TTCAACGCCTGCATCTGCTA	<i>L. rhamnosus</i>
q29280for	TAAGACAACCATGGCGCTGT	<i>L. casei</i>
q29280rev	AAAATGACGGTAATGCGGCG	<i>L. casei</i>
q29290for	CTTGGCATCAGCGATTTCCG	<i>L. casei</i>
q29290rev	AATACGCCCAACTCAACGGT	<i>L. casei</i>
q29300for	AAGTGCCCGACAATTCCGAT	<i>L. casei</i>
q29300rev	CTATGGCTTCAAACGGCGG	<i>L. casei</i>
q29310for	CGACGGTCATTGGTTCCTCA	<i>L. casei</i>
q29310rev	CAGAAGCGGCCAAAGCATAAC	<i>L. casei</i>
q29320for	CAAGTGTCACTGCCAAACGG	<i>L. casei</i>
q29320rev	CTCGCTTGCTAGTCGCCTTA	<i>L. casei</i>
q29330for	TCACCACTTCCATTCCGGTG	<i>L. casei</i>
q29330rev	GGTTAGTGCCGGGTTGATGA	<i>L. casei</i>
q29340for	ACATTGCAACAGCGTGGTTC	<i>L. casei</i>
q29340rev	TCGCCCAGAGAAACGAAGTC	<i>L. casei</i>

Tabla 9. Oligonucleótidos usados en este trabajo para ensayos de retardo en gel y síntesis de sondas para *Southern blot*.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Especie
ProFucIfor	GGGTTGGATGAAAGCTATACATG	<i>L. rhamnosus</i>
ProFucIrev	TGATATCTACCAAATCTAACAAT	<i>L. rhamnosus</i>
ProfucA-fucRrev	TCAACAACATTCTAACGGCGATC	<i>L. rhamnosus</i>
ProfucA-fucRrev	TTGGATAGTGTATTATAGCTTG	<i>L. rhamnosus</i>
BFOR	ATGACAGAACCATTACCGCGC	<i>L. casei</i>
BREV	TTACTCGTAATCTATTTGGGC	<i>L. casei</i>
CFOR	ATGAATGACAATGTAGCATGG	<i>L. casei</i>
CREV	TTATCGGTTTCGCTTCATCCTC	<i>L. casei</i>

15 Análisis de secuencias

Las secuencias de los genes *fuc* de LGG y de los genes *alf2* de *L. casei* BL23 fueron extraídas de la base de datos de GeneBank (acceso N° FM179322.1) y la búsqueda de homologías fue realizada con BLAST en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). El análisis del contexto genómico fue realizado en genomas depositados en la base de datos de genomas bacterianos para análisis comparativos (<http://mbgd.genome.ad.jp/>). Los terminadores transcripcionales en el *cluster* de genes *fuc* y *alf2* se buscaron con ARNold(<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>).

16 Técnicas generales

16.1 Extracción de DNA genómico

Mediante el kit de extracción de DNA genómico REAL PURE ‘SSS’ (Durviz, Valencia, Spain) el DNA total fue aislado de las cepas de *Lactobacillus* (Tabla 1), las cuales previamente habían sido cultivadas en 10 ml de medio MRS a 37°C bajo condiciones estáticas. De los 10 ml de cultivo se tomó 1.5 ml, se centrifugó a 14000 x g durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 150 µl de solución de lisis RBC, se añadió 1.5 mg de lisozima y 15 U de mutanolisina y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se centrifugó nuevamente a 16000 x g, y al pellet se le añadió 300 µl de solución de lisis SSS y 50 µl de RNAsa (10 mg/ml), incubándose a 37°C durante 1 hora. Una vez finalizado el tiempo de incubación, al lisado celular se le añadió 180 µl de solución de precipitación proteica, se agitó en vortex y se centrifugó a 16000 x g durante 5 minutos. Para precipitar el DNA, el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos a los que se les adicionó el mismo volumen de isopropanol (500 µl), se mezclaron por inversión unas 50 veces y se centrifugó a 16000 x g durante 2 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el DNA se lavó añadiendo 2 veces un volumen de 300 µl de etanol al 70% y centrifugando a 16000 x g durante 1 minuto. El DNA de cada una de las cepas se dejó secar durante 15 minutos a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo el pellet se resuspendió con 100 µl de agua estéril y se incubó a 65°C durante 1 hora para

ayudar a la disolución del DNA. Las muestras fueron cuantificadas en un Nanodrop (NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7). El DNA se almacenó a -80°C hasta su uso.

16.2 Extracción de DNA plasmídico

El DNA plasmídico de *E. coli* fue aislado usando el kit NucleoSpin de la casa comercial Macherey-Nagel, siguiendo las indicaciones del fabricante. El aislamiento se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas seguido de la adsorción del DNA en presencia de una columna de sílica en altas concentraciones de sal. El procedimiento consiste en tres pasos básicos: 1) preparación y aclarado del lisado bacteriano, 2) adsorción del DNA sobre la matriz y 3) lavado y elución del DNA plasmídico.

16.3 Preparación de células electrocompetentes

16.3.1 *E. coli*

Las células de *E. coli* competentes para transformación por electroporación se prepararon a partir de un cultivo de estas bacterias previamente crecidas durante toda la noche en 5 ml de LB a 37°C y en agitación constante a 200 rpm. De este cultivo se inoculó 1 ml en 200 ml de LB y se incubó a 37°C con agitación hasta una OD_{550} entre 0.5-0.6. Una vez alcanzada dicha OD, el cultivo se enfrió en hielo durante 15 min y se centrifugó a $8000 \times g$ durante 20 min a 4°C . Estas células fueron lavadas tres veces; los dos primeros lavados se realizaron con agua estéril fría, mientras que el tercer lavado se hizo con 10% de glicerol, siendo esta última solución la que se usó para resuspenderlas en un volumen de 800 μl , los cuales fueron distribuidos en alícuotas de 45 μl y guardadas a -80°C hasta su uso.

16.3.2 *L. rhamnosus* GG

Un cultivo de *L. rhamnosus* GG en 50 ml de MRS suplementado con el 2% de glicina se inició con 2.5 ml de un cultivo previo en el mismo medio a una OD_{600} entre 0.8-1. Ese cultivo fue incubado a 37°C sin agitación hasta alcanzar una OD_{600} entre 0.2 - 0.3. Una vez alcanzada esta densidad, se adicionó ampicilina a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y la incubación prosiguió hasta alcanzar una OD_{600} entre 0.4-0.5. Las células

fueron recogidas por centrifugación a 6000 x g durante 15 minutos a 16°C, lavadas dos veces con tampón de electroporación (0.5M sacarosa, 7 mM fosfato sódico pH 7.4 y 1 mM cloruro de magnesio), resuspendidas en 0.4 ml del mismo tampón y puestas en hielo. Finalmente se hicieron alícuotas de 100 µl de células en tubos Eppendorf y se usaron inmediatamente en la transformación por electroporación. Protocolo modificado de (De Keersmaecker et al 2006).

16.3.3 *L. casei* BL23

Un inóculo de 1 ml de cultivo de *L. casei* BL23 previamente crecido durante toda la noche a 37°C fue transferido a 50 ml de MRS suplementado con glicina al 1% e incubado a 37°C hasta alcanzar una OD₅₅₀ entre 0.4-0.6. Una vez alcanzada dicha OD, las células fueron cosechadas por centrifugación a 8500 x g durante 10 min a 4°C y lavadas dos veces con tampón de electroporación (0.3 M sacarosa, 5 mM fosfato sódico a pH 7.4 y 1 mM cloruro de magnesio) y resuspendidas en 0.5 ml del mismo tampón. Una vez resuspendidas, éstas se alicuotaron en volúmenes de 45 µl y se guardaron a -80°C hasta su uso.

16.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los fragmentos de DNA se utilizaron diferentes productos, según la finalidad del fragmento amplificado.

Cuando se requirió una alta fidelidad en la amplificación, como en el caso de la generación de un fragmento para clonaje de un gen específico, se utilizó la enzima DNA polimerasa Phusion (Thermo Fisher Scientific; USA). Las reacciones con un volumen final de 25 µl contenían: 17 µl de agua destilada, 5 µl tampón Phusion 5X con 7.5 mM MgCl₂, 1 µl de mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 2 µl de cada oligonucleótido 10 µM, 0.5 µl de muestra de DNA y 0.5 µl de enzima.

Cuando la finalidad de la amplificación era solamente comprobar los tamaños de fragmentos esperados, se utilizó la enzima Taq polimerasa de la casa Biotools. Las reacciones con volumen final de 25 µl contenían: 17.5 µl de agua destilada, 2.5 µl tampón de reacción estándar 10X con 7.5 mM MgCl₂, 1 µl de mezcla de

desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM, 1 µl de cada oligonucleótido 10 µM, 1 µl de muestra de DNA y 1 µl de enzima.

El programa básico utilizado para la amplificación fue: 1- desnaturalización inicial 95 °C durante 5 min, 2- desnaturalización a 94 °C durante 30 s, 3- hibridación a la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos (50-60°C) durante 30 s, 4- extensión a 72 °C entre 1 a 2.5 min según la longitud del DNA a amplificar (pasos 2, 3 y 4 se repitieron 30 veces), extensión final a 72 °C durante 7 min.

16.5 Enzimas de restricción y ligación

En el tratamiento del DNA con enzimas de restricción (Fermentas y Roche), el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Invitrogen) o la enzima ligasa del fago T4 (Roche) se siguieron las instrucciones suministradas por los fabricantes.

16.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

El DNA genómico, plasmídico y los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa.

Los geles de agarosa se prepararon en tampón TBE 1X (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio (Sigma) o Redsafe (INtRON Biotechnology). La concentración de agarosa de los geles varió en función de los tamaños de los fragmentos de PCR a analizar. Para tamaños inferiores a 500 pb se utilizaron geles con un 2 % de agarosa, mientras que para tamaños superiores se utilizó una concentración de 0.8 %. Para la visualización del DNA plasmídico siempre se utilizaron geles con una concentración de agarosa de 0.8 %.

Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió 1/5 parte de tampón de carga (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilen cianol, 60 % glicerol, 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA). Conjuntamente con las muestras a analizar, se cargaron marcadores de pesos moleculares (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas) que permitieron estimar el tamaño de las moléculas de DNA presentes en las muestras. El voltaje que se aplicaba fue entre 100 y 120 V.

16.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)

Estos geles están formados por dos fases, en función y composición diferentes:

Fase de compactación: situada en la zona superior del gel, donde se cargan las muestras para realizar la electroforesis. Está compuesta por un 5 % de poliacrilamida y un pH de 6.8. Su función es compactar todas las proteínas de la muestra en un solo frente antes de entrar en la siguiente fase.

Fase de resolución: situada en la zona inferior del gel. Su función es la de separar las proteínas en función de su peso molecular. En este trabajo se utilizaron geles que contenían un 10 % de poliacrilamida y un pH de 8.8.

Para preparar el gel se añadió primero la fase de resolución hasta 3/4 partes de la altura de los vidrios de un sistema MiniProtean III (Bio-Rad), y se cubrió con butanol. Una vez polimerizó esta fase, se retiró el butanol y se añadió la fase de compactación. Antes de que ésta polimerizase se colocó el peine para formar los pocillos donde se cargaron las muestras. Una vez estuvo el gel preparado, se colocó en la cubeta de electroforesis, se sumergió en tampón de recorrido 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1 % SDS) las muestras se resolvieron a 120 V (Power Pac 3000, Bio-Rad).

16.8 Tinción de geles de proteínas con azul de Coomassie

La tinción se realizó incubando los geles de 30 min a 1 hora en la solución de tinción (0.5 % azul brillante de Coomassie R-250, 10 % ácido acético glacial, 25 % isopropanol) en agitación suave y a temperatura ambiente. A continuación se realizaron lavados con ácido acético glacial al 10 %, 25% isopropanol para eliminar el exceso de tinción hasta que quedasen bien definidas las proteínas presentes en el gel. El marcador de peso molecular utilizado fue de una mezcla de proteínas de 14, 20, 30, 45, 66 y 97 KDa (GE Healthcare, UK). Las imágenes digitales fueron obtenidas en el equipo Proxima 16 phi+ de Isogen Life Science y utilizando el software Proxima AQ-4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

**Síntesis de fucosil-oligosacáridos (FUS) mediante actividad de
transfucosilación de las α -L-fucosidasas de *L. casei* BL23**

Síntesis de fucosil-oligosacáridos (FUS) mediante actividad de transfucosilación de las α -L-fucosidasas aisladas de *L. casei* BL23

1 Actividad de transfucosilación con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC

Las reacciones de transfucosilación fueron realizadas según se ha descrito previamente (Rodríguez-Díaz et al 2013), con algunas modificaciones como se especifica en el apartado de materiales y métodos. La síntesis de FUS sólo se logró con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC. Con la α -L-fucosidasa AlfA no se evidenció la formación de productos con ninguno de los sustratos aceptores en los tiempos ensayados. Con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC se sintetizaron los disacáridos Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc, respectivamente, cuando se utilizó la GlcNAc como sustrato aceptor y según se había descrito anteriormente (Rodríguez-Díaz et al 2013). Los rendimientos máximos producidos en porcentaje de Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc a los 10 y 15 minutos de reacción respectivamente fueron alrededor de 29% para AlfB y 65% para AlfC, teniendo en cuenta el *p*NP-fuc añadido (Fig. 12). Los valores de porcentaje en rendimiento mejoraron moderadamente con respecto a los descritos anteriormente que fueron 23% y 56% para AlfB y AlfC, respectivamente (Rodríguez-Díaz et al 2013).

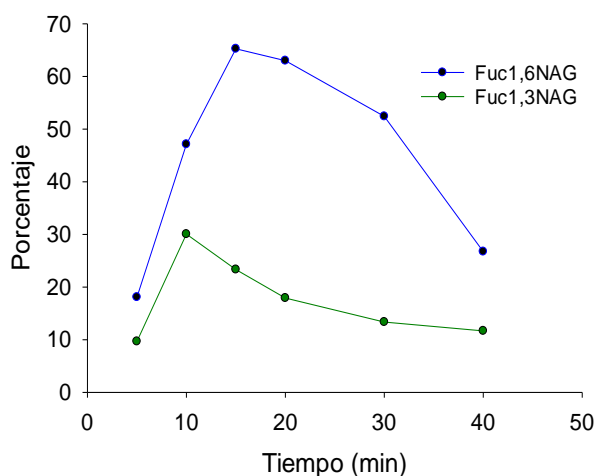


Figura 12. Rendimiento en la síntesis de Fuc- α -1,3-GlcNAc (Fuc1,6NAG) y Fuc- α -1,6-GlcNAc (Fuc1,3NAG) mediante la actividad de transfucosilación. La actividad de las enzimas α -L-fucosidasas AlfB (verde) y AlfC (azul) presentan rendimientos distintos en la actividad de síntesis de cada uno de los disacáridos Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc respectivamente. El porcentaje de rendimiento determinado fue con respecto a la cantidad de sustrato donador (*p*NP-fuc) adicionado.

Se ha ensayado también la actividad de AlfC utilizando otros azúcares aceptores como son la glucosa y la galactosa, obteniéndose la formación de los productos fucosil-glucosa (Fuc-Glu) y fucosil-galactosa (Fuc-Gal), respectivamente. Aunque inicialmente fue difícil de estimar el porcentaje de producción de estos nuevos disacáridos fucosilados (debido a la falta de patrones), sí se logró conocer el tiempo en el que se alcanzó el máximo rendimiento. La cinética de la reacción mostró que Fuc-Glu se produce en mayor cantidad a los 10 minutos (Fig. 13a), mientras que Fuc-Gal es mayormente producida a los 15 min (Fig. 13b). Cuando se utilizó lactosa como substrato aceptor para esta enzima en la reacción de transfucosilación, sólo se detectaron cantidades extremadamente bajas del trisacárido (datos no mostrados), lo cual hacía inviable su purificación para su posterior uso en los ensayos de bioactividad. Sin embargo, cuando se utilizó el disacárido N,N'-diacetilquitobiosa (GlcNAc- β 1,4-GlcNAc) como substrato aceptor, se logró la síntesis del trisacárido fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ), obteniéndose un rendimiento máximo a los 10 minutos (Fig. 13c). Aunque no se ha determinado aún la estructura de estos compuestos, hipotetizamos que la unión de la L-fucosa a las moléculasceptoras se ha generado mediante un enlace α -1,6, ya que esta enzima es específica para la hidrólisis y formación de este tipo de enlaces como se demostró anteriormente (Rodríguez-Díaz et al 2013, Rodríguez-Díaz et al 2011). Con la α -L-fucosidasa AlfB, los substratos aceptores utilizados diferentes a la GlcNAc (glucosa, galactosa, lactosa y N,N'-diacetilquitobiosa) no dieron lugar a la síntesis de ningún otro FUS adicional.

2 Síntesis del glicoaminoácido Fucosil- α -1,6-N-acetilglucosamina-Asn (Fuc-GlcNAc-Asn)

Como se describe arriba utilizando la α -L-fucosidasa AlfC en reacciones de transfucosilación con los substratos aceptores GlcNAc y N,N'-diacetilquitobiosa se ha sintetizado el disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc y el trisacárido fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa, respectivamente. Ambos carbohidratos forman parte del núcleo de la N-glicosilación de las proteínas, en la cual la GlcNAc está unida al aminoácido Asn (Weerapana & Imperiali 2006).

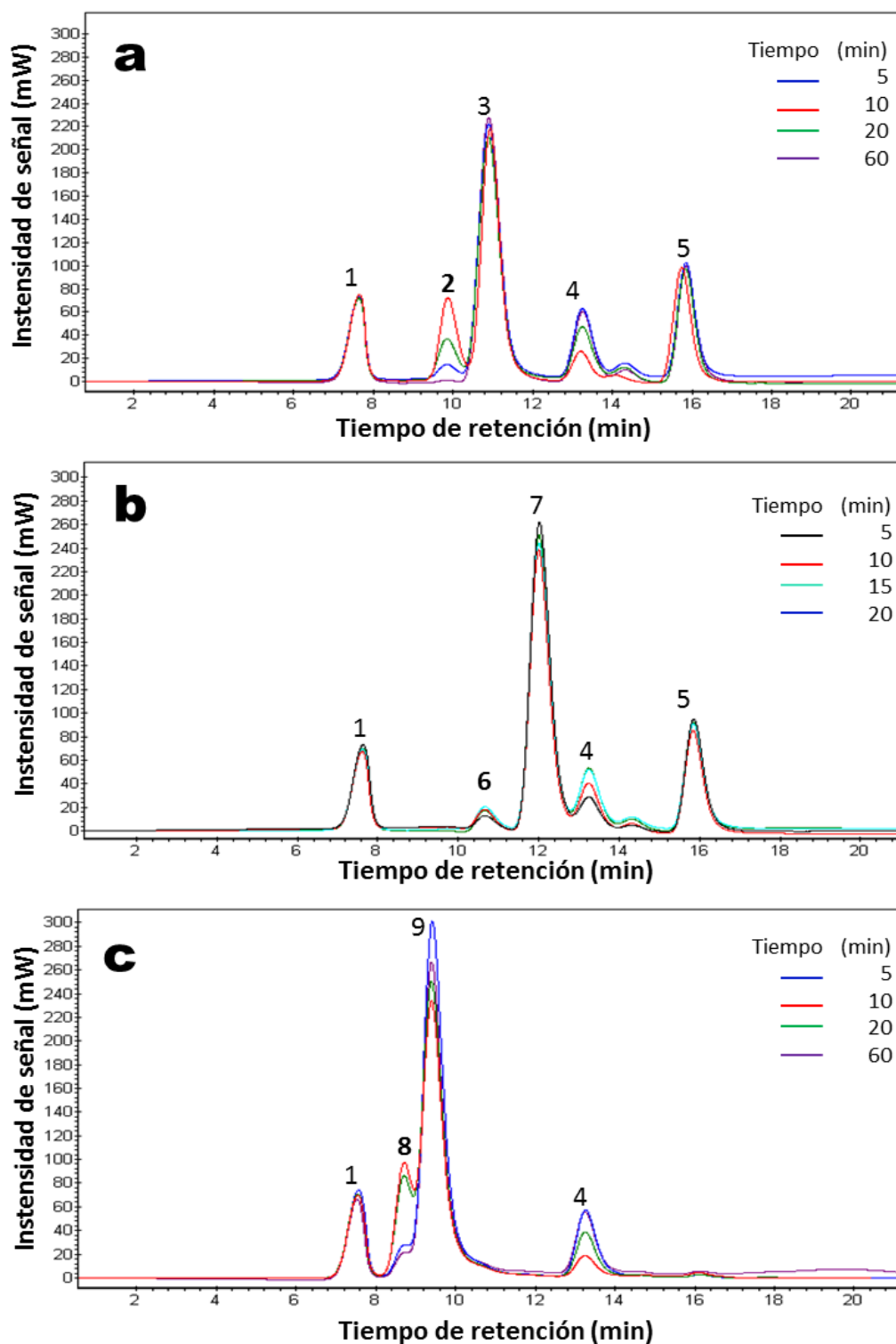


Figura 13. Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RCM Monosaccharide) de las reacciones de transfructosilación con AlFC a diferentes tiempos. Los sustratos aceptores que se utilizaron fueron glucosa (a), galactosa (b) y N,N'-diacetilquitobiosa (c). Tanto los componentes de la mezcla como los productos sintetizados son enumerados; 1. Tris-HCl; 2. Fucosil-glucosa; 3. glucosa; 4. L-fucosa; 5. Glicerol; 6. Fucosil-galactosa; 7. Galactosa; 8. Fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa; 9. N,N'-diacetilquitobiosa. Las reacciones en los diferentes tiempos se indican con colores.

Con el objeto de analizar si AlfC también es capaz de producir el compuesto fucosilado Fuc-GlcNAc-Asn se utilizó en reacciones de transfucosilación con el substrato GlcNAc-Asn. Los resultados demostraron que AlfC puede utilizar este compuesto como substrato aceptor para sintetizar Fuc-GlcNAc-Asn (Fig. 14). Como en los casos anteriores, debido a la falta de los estándares para este tipo de compuestos, conocer las cantidades producidas en un principio no fue posible. Sin embargo, el mayor rendimiento se registró a los 20 min de reacción, el cual fue observado en el cromatograma de HPLC, evidenciándose un pico de mayor tamaño que se correlaciona con una mayor área bajo la curva cuando se compara con los demás tiempos de reacción (Fig. 14). Además, en los tiempos de retención este pico se separó muy bien de los otros componentes de la reacción. Esto permitió realizar el análisis de la cinética de AlfC para la síntesis de este compuesto por la actividad de transfucosilación. Después de los 20 min de reacción, el producto formado Fuc-GlcNAc-Asn comenzó a hidrolizarse por la acción de la misma enzima hasta desaparecer por completo en el término de 2 horas.

Otro de los productos formados durante las reacciones de transfucosilación podría corresponder a un disacárido Fucosa-Fucosa (Fuc-Fuc), el cual eluye en una columna analítica muy cerca del monosacárido L-fucosa. Su mayor rendimiento se produce al término de 1 hora de reacción (Fig. 14), siendo también hidrolizado después de las 2 horas. Sin embargo, la resolución estructural de este producto queda todavía por realizar.

Algunos de los componentes y productos de la reacción coincidieron en sus tiempos de retención. La L-fucosa generada por la hidrólisis del *p*NP-Fuc (utilizado como substrato donador) coincide en su tiempo de retención con el glicerol, el cual es aportado a la reacción por la solución de la enzima AlfC. Igualmente, el *p*NP-fuc y *p*NP coincidieron en sus tiempos de retención con el substrato aceptor Asn-GlcNAc. Sin embargo, este hecho no afectó a la determinación de la producción de Fuc-GlcNAc-Asn.

La estructura del compuesto Fuc-GlcNAc-Asn sintetizado en el laboratorio fue determinada mediante espectroscopia de resonancia nuclear (RMN). El análisis de los espectros HSQC 1D ^1H y 2D ^1H - ^{13}C (Fig 15a) en combinación con los espectros COSY y TOCSY 2D mostró los valores de desplazamiento químico ^1H y ^{13}C que permitieron determinar la formación específica de un enlace α -1,6 entre la fucosa y la GlcNAc, el

cual dio lugar a la estructura del glicoaminoácido Fuc- α -1,6-GlcNAc-Asn. Además, los experimentos HMBC 2D mostraron la correlación que hay entre C1' y H6a y H6b (Fig. 15b) reflejando claramente el enlace 1,6 entre los dos monosacáridos (Fucosa y *N*-acetilglucosamina). El conjunto de estos análisis además de confirmar la estructura de la Fuc- α -1,6-GlcNAc-Asn, demostró la ausencia de estereoisómeros de la reacción en las muestras purificadas.

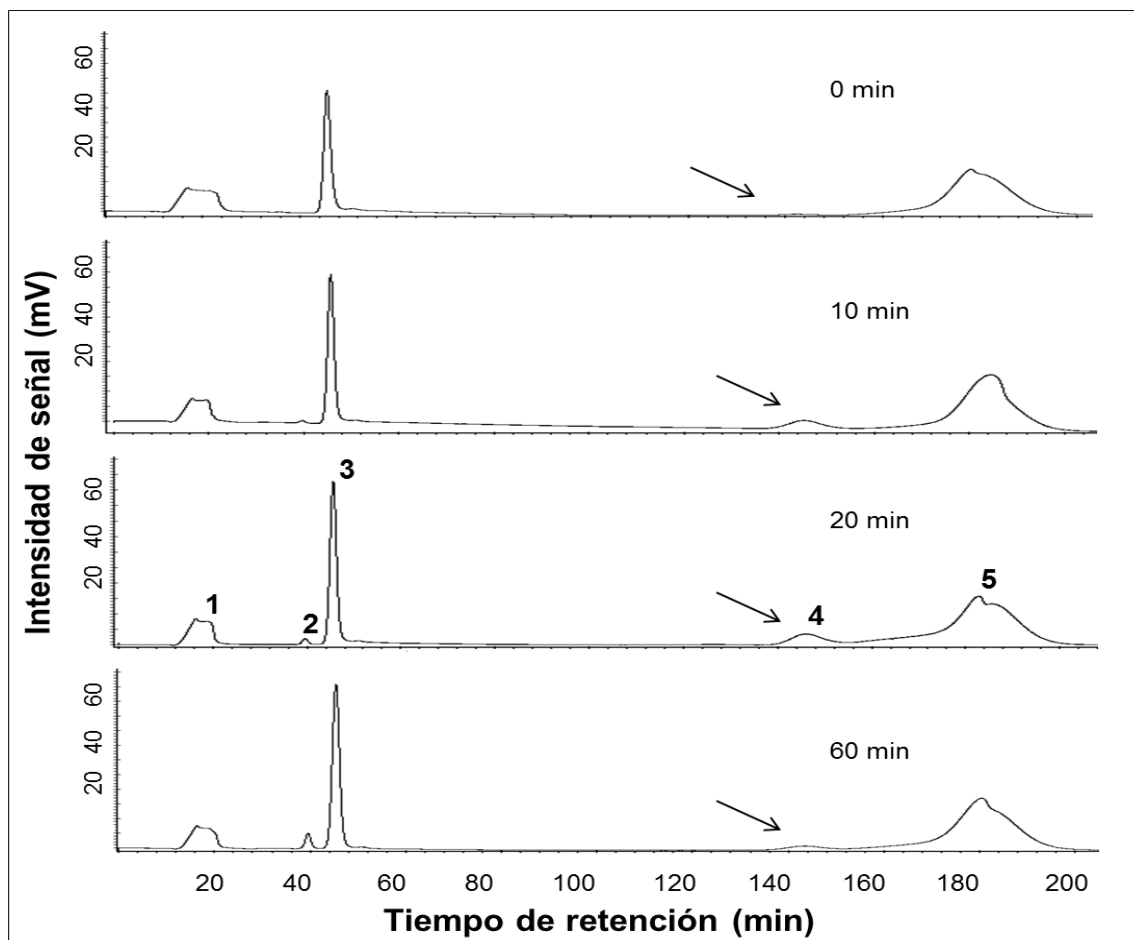


Figura 14. Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RSO Oligosaccharide) de los productos de las reacciones de transfucosilación con AlfC y el sustrato aceptor Fuc-Asn. Los tiempos 0, 10, 20 y 60 minutos indican la duración de la reacción desde que se le adiciona la enzima. El producto sintetizado en cada uno de los tiempos de reacción se indica con una flecha, registrándose el mayor rendimiento a los 20 min. Tanto los componentes de la reacción como los productos sintetizados son enumerados: 1. Tris-HCl; 2. Fuc-Fuc?; 3. Fucosa y Glicerol; 4. Fuc-GlcNAc-Asn; 5. Asn-GlcNAc, *p*-NP-Fuc y/o *p*NP.

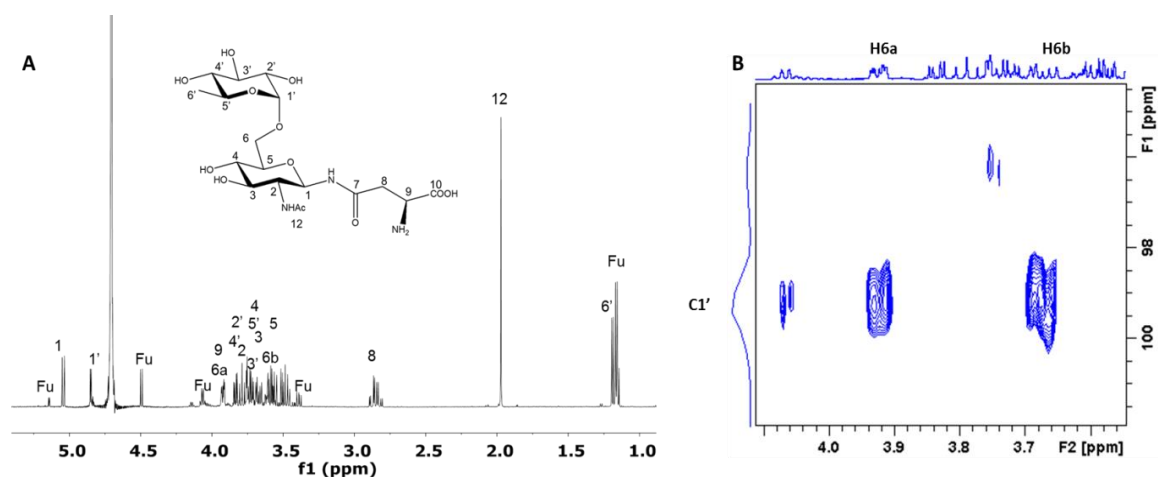


Figura 15. Espectros de RMN. Espectros heteronucleares de coherencia cuántica única 1D HSQC (A) y de enlace múltiple 2D HMBC (B) en los experimentos de RMN adquiridos a 600 MHz y 27°C ^1H - ^{13}C del glicoaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn. Las señales etiquetadas con Fu corresponden a la fucosa coeluida.

3 Producción y purificación de FUS a escala semi-preparativa

3.1 Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc

Una vez determinados los tiempos en los que se obtuvieron mejores rendimientos de la síntesis de FUS, las reacciones de transfucosilación con las α -L-fucosidasas AlfB o AlfC fueron escaladas de volúmenes de μl a ml bajo las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos. Tras la purificación por HPLC se recolectaron las fracciones que contenían los productos formados (FUS) puros y se cuantificaron cada uno de ellos. Los máximos rendimientos obtenidos en cantidades absolutas para Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc fueron de 4,2 y 9,3 g/l, respectivamente. El análisis realizado mediante los cromatogramas de HPLC muestra la detección de todos los componentes de la reacción (Fig. 16a y 16c), excepto el *p*NP, el cual es liberado tras la hidrólisis de la L-fucosa. La calidad en cuanto a pureza de cada uno de estos disacáridos fue también analizada como se observa en los cromatogramas de las Fig. 16b y 16d, sin evidenciarse presencia de contaminantes.

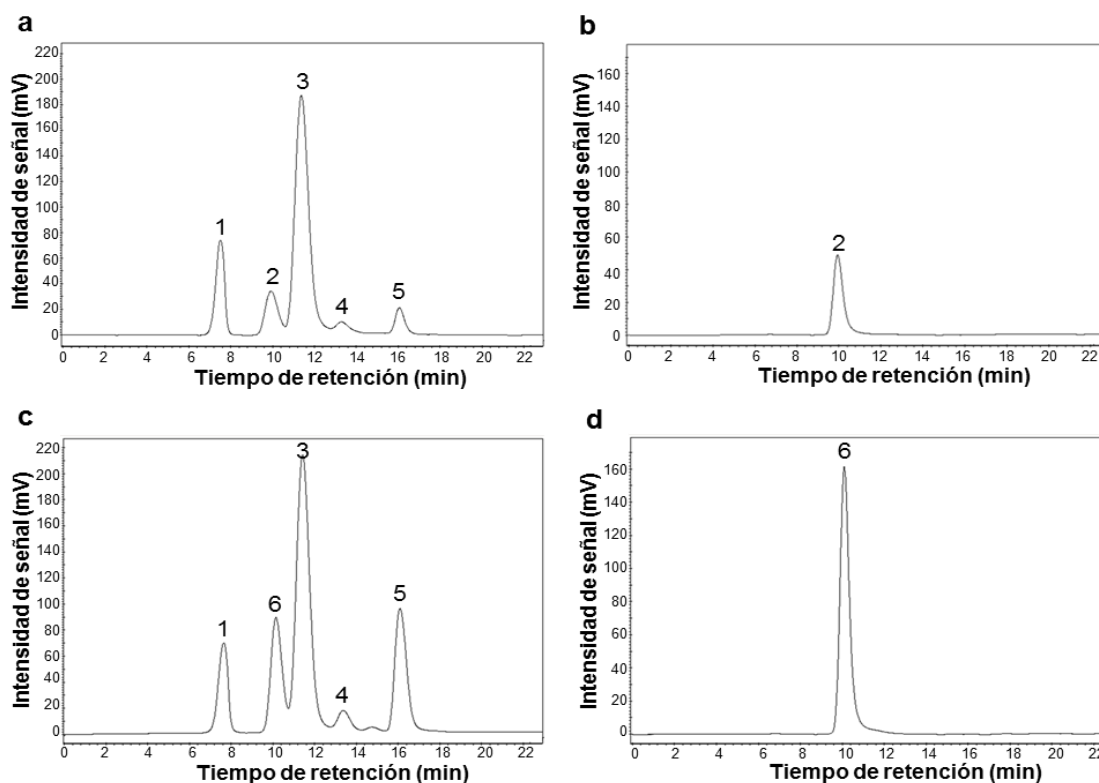


Figura 16. Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RCM Monosaccharide) de los productos de las reacciones de transfucosilación con las α -L-fucosidas AlfB (a) o AlfC (c). Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RCM Monosaccharide) de las fracciones agrupadas de la cromatografía a escala semi-preparativa conteniendo los disacáridos purificados Fuc- α -1,3-GlcNAc (b) y Fuc- α -1,6-GlcNAc (d). 1. Tris-HCl; 2. Fuc- α -1,3-GlcNAc; 3. *N*-acetilglucosamina; 4. L-fucosa; 5. Glicerol; 6. Fuc- α -1,6-GlcNAc.

3.2 Fucosil-glucosa, Fucosil-galactosa y Fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa

Las reacciones de transfucosilación para sintetizar los disacáridos Fuc-Glu y Fuc-Gal, y el trisacárido Fuc-DAQ fueron escaladas y purificadas mediante HPLC (Fig. 17) como se describe arriba. Como no se dispone de patrones, para cuantificar estos productos sintetizados fue necesario someterlos a una reacción de hidrólisis con la α -L-fucosidasa AlfC (enzima implicada en su síntesis), de tal forma que la L-fucosa fue liberada permitiendo su cuantificación mediante el uso de una curva patrón de este monosacárido. Los rendimientos finales obtenidos para cada uno de estos compuestos fucosilados (Fuc-Glu, Fuc-Gal y Fuc-DAQ) fueron de 3,3; 1,3 y 1,8 g/l respectivamente (Tabla 10).

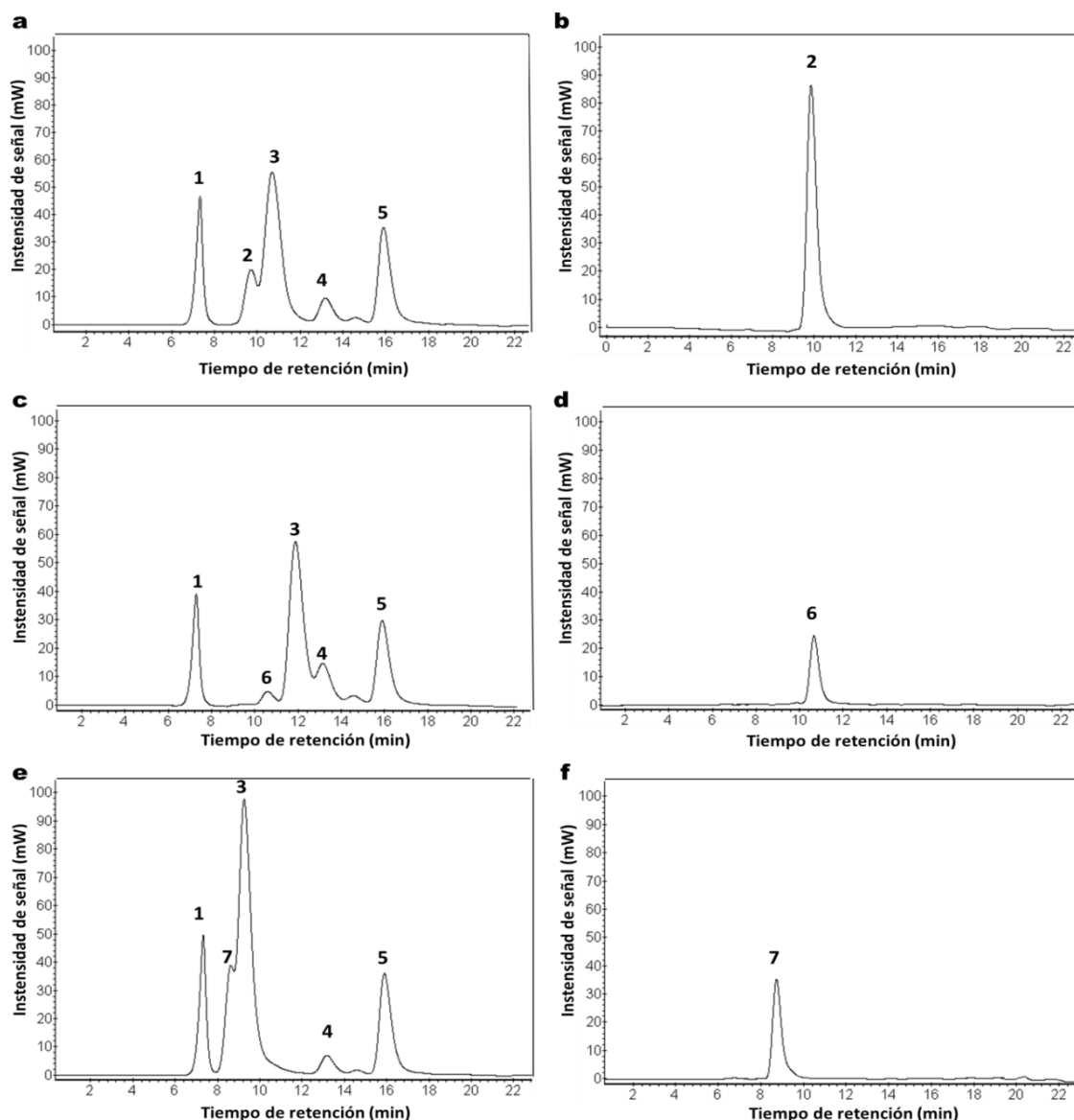


Figura 17. Análisis por HPLC de las reacciones de transfucosilación con AlfC. Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RCM Monosaccharide) de los productos de reacción de transfucosilación con AlfC utilizando los sustratos aceptores glucosa (a), galactosa (c) y N,N'-diacetilquitobiosa (e). Cromatogramas de HPLC (columna analítica Rezex-RCM Monosaccharide) de las fracciones agrupadas de la cromatografía semipreparativa conteniendo los productos purificados fucosil-glucosa (b), fucosil-galactosa (d) y fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa (f). 1. Tris-HCl; 2. fucosil-glucosa; 3. glucosa; 4. L-fucosa; 5. Glicerol; 6. fucosil-galactosa; 7. fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa.

3.3 Fuc-GlcNAc-Asn

La purificación de Fuc-GlcNAc-Asn se llevó a cabo en la columna semipreparativa Rezex RCM-monosaccharides disponible en el laboratorio. Aunque las

características de esta columna son diferentes a las de la columna (Rezex RSO-oligosaccharides) que se utilizó para el análisis de la cinética de la reacción de transfucosilación, se logró obtener el producto libre de la mayoría de los componentes de la reacción. Entre estos el *p*NP-fuc y *p*NP, los cuales afectaban al desarrollo de los estudios posteriores de bioactividad. El único componente que no se logró eliminar completamente del producto purificado fue la L-fucosa, quedando aproximadamente en una tercera parte del total de este monosacárido liberado. Sin embargo este azúcar no interfería en los ensayos posteriores que se realizaron en este trabajo como se describe en el capítulo 4 de esta Tesis. Por otro lado, a pesar de que la cantidad producida tampoco se pudo determinar con exactitud, un cálculo aproximado mediante el uso de una curva patrón del substrato aceptor permitió estimar que el glicaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn obtenido correspondería a una producción de 3,6 g/l, representando un rendimiento aproximado del 26%.

Tabla 10. Compuestos sintetizados con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC.

FUS	Estructura	Rendimiento (%)	Tiempo ³ (min)	α -L-fucosidasa
3'-Fucosil-GlcNAc	Fuc- α -1,3-GlcNAc	¹ 29	10	AlfB
6'-Fucosil-GlcNAc	Fuc- α -1,6-GlcNAc	¹ 65	15	AlfC
Fucosil-Glu	Sin determinar	² 19	10	AlfC
Fucosil-Gal	Sin determinar	² 8	15	AlfC
Fucosil-DAQ	Sin determinar	² 6,6	10	AlfC
Asn-GlcNAc-Fuc	Fuc- α -1,6-GlcNAc-Asn	² 26	20	AlfC

1. Rendimiento de la síntesis de los productos sin purificar.
2. Rendimiento final de los productos purificados.
3. Tiempo de la reacción de transfucosilación

La dificultad para la purificación de estos compuestos fucosilados radica en la escasa diferencia que estos tienen con los substratos aceptores en sus tiempos de retención en las condiciones utilizadas. De los seis compuestos que se lograron sintetizar, los disacáridos Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc son los que mejor se separaron del substrato aceptor (GlcNAc) (Fig. 16), permitiendo así obtener la máxima cantidad producida sin que hubiera contaminación por componentes de la reacción. Sin embargo, los tiempos de retención de los disacáridos Fuc-Glu (Fig. 17a) y Fuc-Gal (Fig. 17c) se encuentran muy cercanos a los tiempos de retención de los substratos aceptores (glucosa y galactosa respectivamente), lo que llevó a una pérdida considerable durante el proceso

de purificación de estos dos compuestos (Fig. 17b y 17d). Una mayor pérdida se evidenció en la purificación del trisacárido Fuc-DAQ (Fig. 17f), ya que el tiempo de retención de este compuesto fue muy similar al del azúcar aceptor (N,N'-diacetilquitobiosa) (Fig. 17e), imposibilitando de esta manera la obtención de una mayor cantidad del producto final.

4 Mejora de la actividad de tranfucosilación de la α -L-fucosidasa AlfB

4.1 Mutagénesis aleatoria y selección de variantes AlfB

Los productos de PCR del gen *alfB*, a los cuales se les introdujo mutaciones mediante reacciones de “error-prone” PCR fueron clonados en el vector de expresión pQE80. La detección de variantes de AlfB se realizó en medio de cultivo LB-agar con X-fuc en la cepa *E. coli* DH10 transformada con estos constructos, donde se seleccionaron 100 colonias de color azul claro, cuya tonalidad indicaba expresión de una α -L-fucosidasa con baja actividad hidrolítica en contraste con el azul oscuro de clones expresando el gen silvestre. De estas 100 colonias se seleccionaron 18 mutantes AlfB, cuya actividad hidrolítica fue baja cuando se ensayó con extractos crudos utilizando como substrato *p*NP-fuc. Esto indicaba que los enzimas podrían tener una actividad de tranfucosilación mejorada con respecto a la enzima silvestre. Mediante secuenciación se determinó que estas variantes presentaban distintas mutaciones en sus secuencias, donde uno, dos y hasta tres aminoácidos habían sido sustituidos por otros. La Tabla 11 muestra cada uno de los mutantes y los cambios que estos presentaron con respecto a la secuencia de la α -L-fucosidasa AlfB silvestre.

4.2 Análisis cinéticos de la actividad de hidrólisis de las variantes de la α -L-fucosidasa AlfB

Cada una de las enzimas variantes de AlfB fueron expresadas como proteínas recombinantes, las cuales llevaban una etiqueta de 6 histidinas (6xHis) en el extremo amino-terminal. Esto permitió su purificación en columnas de agarosa con ácido nitrilotriacético-Ni como se describe en el apartado de materiales y métodos. La cantidad de proteína obtenida correspondiendo a cada uno de los variantes fue suficiente

para realizar todos los ensayos enzimáticos, obteniéndose entre 2.5 y 9 mg por cada purificación.

Tabla 11. Variantes de α -L-fucosidasa AlfB, indicando el número de mutaciones, tipo de mutación y posición en la que se ha generado.

Aminoácido N° Cepa	28	46	76	79	110	132	139	149	168	175	182	184	196	199	206	214	226	249	261	264	273	303	342	346	N° de Mutaciones
WT	M	E	L	K	F	T	F	S	N	D	Y	M	N	G	V	V	H	A	V	T	A	A	Q	N	0
M15												I													1
M28				R																					1
M29									G																1
M32												K											R		2
M33					K																	T			2
M40								A																	1
M41															M										1
M43									D																1
M52							L																		1
M54																		T		A					2
M58													S						M					K	3
M60								S																	1
M69	K	G																							2
M75																						T			1
M78			I												M										2
M79																L									1
M92					I																				1
M95										C															1

De las 18 variantes de la enzima α -L-fucosidasa AlfB obtenidas, 12 (M15, M28, M29, M40, M41, M43, M52, M60, M75, M79, M92 y M95) presentaron solo un cambio en su secuencia de aminoácidos; mientras que 5, correspondiendo a las variantes M32, M33, M54, M69 y M78 presentan 2 cambios; y una única variante (M58) mostró 3 cambios en su secuencia.

Los parámetros cinéticos de los 18 mutantes, determinados mediante el uso de *pNP-fuc* como sustrato, mostraron que tanto la V_{max} como la k_{cat} tenían valores inferiores con respecto a los valores de la enzima silvestre con algunas excepciones, mientras que para la K_m sucedía lo contrario.

En general, estas variantes tuvieron una K_m más alta y valores de V_{max} y k_{cat} más bajos con respecto a la enzima silvestre (Tabla 12), reflejando una baja eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) para la hidrólisis de *pNP-fuc*, utilizado como sustrato. Estos datos son consistentes con los que se obtuvieron durante el proceso de selección, donde estas variantes mostraron tener una baja actividad hidrolítica sobre el X-fuc en placas de agar; así como cuando se realizaron ensayos con extractos crudos de *E. coli* utilizando como sustrato el mismo *pNP-fuc* (datos no mostrados). A su vez, los datos evidenciaban que

la baja actividad detectada no era debida a una baja expresión de las variantes mutadas en *E. coli*. Por lo tanto, todos estos resultados sugerían que el rendimiento de estas variantes para la actividad de síntesis podría haber mejorado, ya que la pérdida parcial de su actividad hidrolítica conllevaría, en teoría, una mejor actividad transferasa.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de los variantes de α -L-fucosidasa AlfB, comparado con los valores de la AlfB silvestre.

Mutantes	V_{max} ($\mu\text{mol/mg prot/min}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
M15	1.76 ± 0.18	3.74 ± 0.65	2.25 ± 0.23	610.57 ± 73.03
M28	1.23 ± 0.10	6.00 ± 0.69	1.57 ± 0.14	263.46 ± 8.87
M29	1.14 ± 0.08	4.20 ± 0.94	1.45 ± 0.10	355.71 ± 56.47
M32	1.25 ± 0.04	2.45 ± 0.20	1.60 ± 0.05	654.38 ± 32.51
M33	2.05 ± 0.32	6.40 ± 1.27	2.61 ± 0.41	413.13 ± 50.66
M40	1.54 ± 0.12	4.00 ± 0.54	1.97 ± 0.15	495.66 ± 45.65
M41	1.11 ± 0.22	2.56 ± 0.64	1.42 ± 0.28	562.82 ± 39.55
M43	0.90 ± 0.13	3.45 ± 0.58	1.15 ± 0.16	337.59 ± 25.97
M52	1.07 ± 0.07	7.91 ± 0.40	1.37 ± 0.09	174.24 ± 16.94
M54	1.63 ± 0.15	2.45 ± 0.37	2.09 ± 0.19	858.45 ± 103.38
M58	0.34 ± 0.03	4.31 ± 0.70	0.43 ± 0.04	102.99 ± 16.33
M60	0.48 ± 0.05	4.81 ± 0.59	0.61 ± 0.07	128.30 ± 5.54
M69	2.10 ± 0.21	8.99 ± 1.39	2.68 ± 0.27	282.75 ± 42.33
M75	0.64 ± 0.08	2.11 ± 0.64	0.82 ± 0.11	410.11 ± 94.36
M78	0.73 ± 0.15	1.13 ± 0.16	0.93 ± 0.19	819.93 ± 98.07
M79	0.86 ± 0.12	2.60 ± 0.45	1.10 ± 0.16	426.89 ± 26.66
M92	2.35 ± 0.29	4.85 ± 0.86	3.00 ± 0.37	624.16 ± 68.15
M95	0.61 ± 0.07	1.91 ± 0.35	0.78 ± 0.08	421.14 ± 75.21
WT	3.32 ± 0.27	2.98 ± 0.70	4.24 ± 0.35	1476.03 ± 356.76

4.3 Actividad de transfucosilación de las variantes de la α -L-fucosidasa AlfB

Las reacciones de transfucosilación con las enzimas mutantes de la α -L-fucosidasa AlfB (20U por reacción), mostraron mejora en los rendimientos de síntesis del disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc en diferentes niveles. De los 18 mutantes, 8 (M15, M28, M29, M32, M33, M40, M52 y M92) tuvieron una actividad muy similar a la enzima silvestre (rendimientos del 27–34%); otros 6 mutantes (M41, M43, M54, M60, M69 y M95) mejoraron entre un 4 – 10% con respecto a la enzima silvestre, alcanzando un máximo de 34 a 44% en rendimiento. Finalmente, los rendimientos más altos se lograron con los mutantes M78, M75, M79 y M58, cuyos valores máximos alcanzados

fueron del 52, 55, 64 y 100% respectivamente (Tabla 13). El tiempo en el cual se obtenía el máximo rendimiento varió entre 20-240 minutos, registrándose el menor tiempo (20 min) para la variante M54 y el máximo (240 min) para M60. En la variante M58, el cual es un triple mutante (N196S; V261M; N346K), su máximo rendimiento (100%) en la actividad de transfucosilación fue registrado a los 120 minutos (Tabla 13). Además, se evidenció que ésta no presentaba actividad de hidrólisis del producto, como se pudo comprobar mediante el análisis por HPLC (Fig. 18).

Tabla 13. Rendimiento expresado en porcentaje en la actividad de transfucosilación para la síntesis de Fuc- α -1,3-GlcNAc con cada una de las variantes AlfB y la enzima silvestre, indicando el tiempo (min) de la reacción de transfucosilación en el que se consiguió el máximo rendimiento, así como también se muestra el número y tipo de mutaciones que cada uno de las variantes presenta.

Variantes	Rendimiento (%)	Tiempo (min)	Mutaciones
M15	33	60	M184I
M28	34	240	K79R
M29	27	40	D175G
M32	34	40	M184K; Q342R
M33	30	60	T132K; A303T
M40	32	60	S149A
M41	38	40	V206M
M43	37	40	N168D
M52	33	240	F139L
M54	36	20	A249T; T264A
M58	100	120	N196S; V261M; N346K
M60	39	240	N168S
M69	44	120	M28K; E46K
M75	55	40	A273T
M78	52	40	L76I; V214M
M79	64	40	H226L
M92	34	60	F110I
M95	40	40	Y182C
WT	30	40	-

En negrilla se resalta los variantes con los que se obtuvo rendimientos superiores al 50%.

La alta actividad hidrolítica que presentan las α -L-fucosidasas, es el principal factor que impide obtener altos rendimientos cuando son utilizadas en reacciones de transfucosilación para la síntesis de FUS. Sin embargo, de las variantes AlfB que mostraron una baja actividad de hidrólisis con el substrato *p*NP-fuc con respecto a la

silvestre, no en todas se evidenció una mejora del rendimiento en la síntesis del disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc (Tabla 12), reflejando de esta manera especificidades distintas para cada uno de los substratos. Los cuatro mejores rendimientos obtenidos con las variantes M78, M75, M79 y M58 (Tabla 12) se correlacionaron con los bajos valores de k_{cat} (0,82; 0,93; 1,10 y 0,43 respectivamente) cuando se compararon con la enzima silvestre ($k_{cat} = 4,24$) (Tabla 11). No obstante, la actividad de hidrólisis del producto formado (Fuc- α -1,3-GlcNAc) se evidenció de mayor a menor grado en las variantes M75, M78 y M79; sin apreciarse dicha actividad para la variante M58 (Fig. 18). Esto se reflejó en el alto rendimiento en la síntesis de este compuesto para esta enzima.

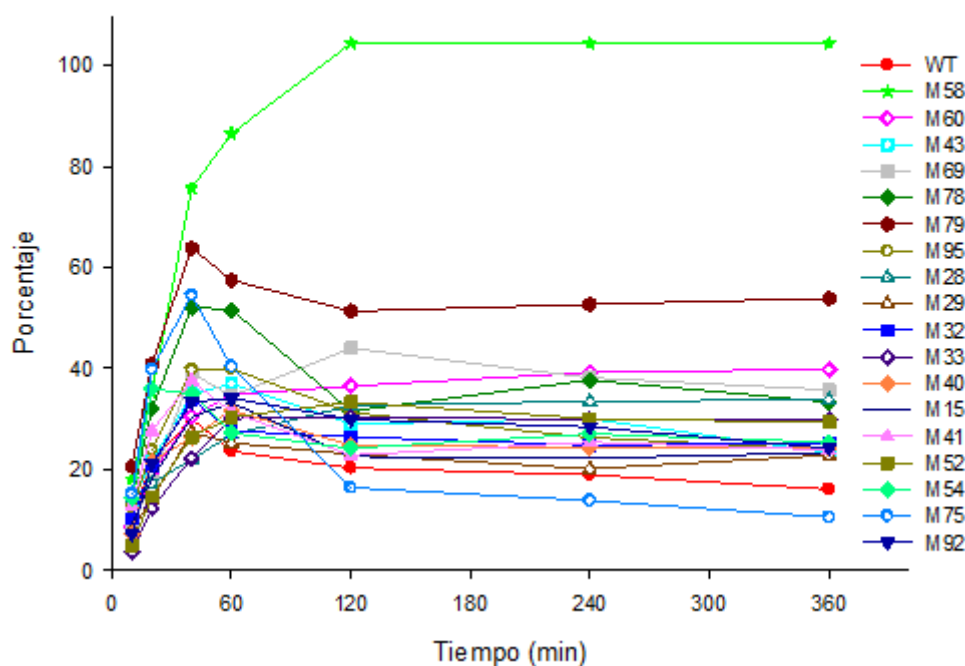


Figura 18. Representación gráfica de la actividad de transfucosilación de los variantes de AlfB. *p*NP-fuc se utilizó como substrato donador y GlcNAc como substrato aceptor. El porcentaje de rendimiento se define como la cantidad de FUS producido respecto al substrato donador (*p*NP-fuc).

5 Mutagénesis dirigida a partir de la variante M58 de la α -L-fucosidasa AlfB

Para conocer si las tres mutaciones portadas por la enzima M58 estaban implicadas en la alta actividad de transfucosilación, se realizaron mutaciones dirigidas encaminadas a obtener tanto mutantes sencillos como dobles en todas las

combinaciones posibles. Los 6 nuevos mutantes obtenidos fueron denominados como M1 (N196S), M2 (V261M), M3 (N346K), M1-2 (N196S; V261M), M1-3 (N196S; N346K) y M2-3 (V261M; N346K). La obtención de estos mutantes se realizó como se describe en la sección de materiales y métodos, logrando aislarse entre 5 y 10 mg de enzima por purificación.

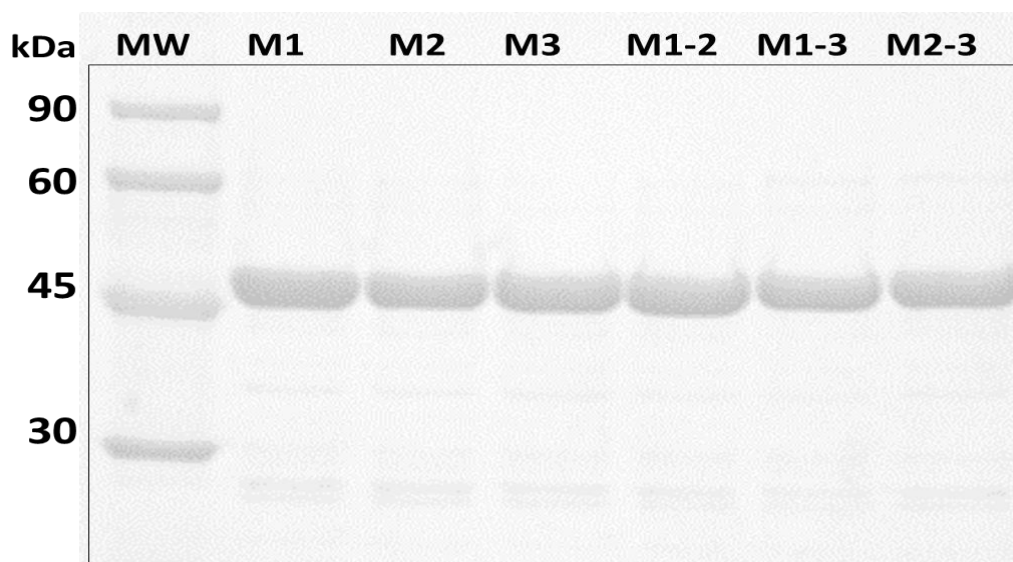


Figura 19. Purificación de proteínas mutantes AlfB. Análisis de 5 μ g de cada una de las mutantes mediante SDS-PAGE y tinción con azul de comassie. Los valores a la izquierda corresponden a peso molecular (MW) de patrones de proteína. Todas las proteínas migran como una única banda con el peso molecular esperado (47 kDa).

De las nuevas variantes generadas, las que presentaron una actividad hidrolítica más baja correspondieron a M1, M1-2 y M1-3, cuyos valores de k_{cat} fueron de 0.80, 0.77 y 0.36 respectivamente, siendo muy cercanos a los del triple mutante M58 (0.43). Las variantes M3 (k_{cat} : 2.24) y M2-3 (k_{cat} : 3.9) reflejaron una actividad hidrolítica media, cuando se compararon con M58 y la enzima silvestre (Tabla 14). Sin embargo, la actividad específica fue muy baja para casi todas las variantes, cuyos valores se encontraban entre 0.25 y 2.25. Estos valores eran muy distantes del valor obtenido con la enzima silvestre (29.5), siendo M2 la única variante con actividad específica relativamente alta, con un valor de 7.1 (Tabla 14). Por otro lado, con respecto al parámetro K_m , en todas las variantes se observaron valores superiores a los de la enzima silvestre (2.98 mM), menos en la variante M2, cuyo valor fue de 2.33 mM, reflejando una alta afinidad por el sustrato. Esto se manifestó en el hecho de que esta

variante fuera la única que se comportó de forma similar a la enzima silvestre en todos los parámetros cinéticos determinados; mientras que las demás variantes, se estarían comportando como la enzima triple mutante M58. Esto sugería que tanto la mutación 1 (N196S) como la mutación 3 (N346K) estarían afectando la actividad hidrolítica, permitiendo de esta manera una alta actividad transferasa en reacciones de transfucosilación.

Los parámetros cinéticos de estas nuevas variantes se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros cinéticos de los variantes de M58 AlfB.

Mutantes	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}/\text{min}$)	K_m (mM)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	Act. Esp. ($\mu\text{mol Fuc}/\text{mgprot}/\text{min}$)
M58	0.34 ± 0.03	4.31 ± 0.70	0.43 ± 0.04	102.99 ± 16.33	0.25
M1	0.62 ± 0.06	3.43 ± 0.58	0.80 ± 0.80	241.06 ± 60.96	0.77
M2	3.88 ± 0.96	2.33 ± 0.88	4.96 ± 1.22	2304.96 ± 812.51	7.1
M3	1.75 ± 0.69	5.69 ± 1.46	2.24 ± 0.89	435.97 ± 259.26	2.25
M1-2	0.60 ± 0.14	5.50 ± 0.48	0.77 ± 0.17	122.63 ± 10.78	0.59
M1-3	0.28 ± 0.11	3.35 ± 0.59	0.36 ± 0.14	87.02 ± 16.876	0.29
M2-3	3.05 ± 0.48	7.00 ± 0.47	3.90 ± 0.61	609.28 ± 41.03	2.15
silvestre	3.32 ± 0.27	2.98 ± 0.70	4.24 ± 0.35	1476.03 ± 356.76	29.5

Para determinar V_{max} y K_m se utilizó como sustrato *p*NP-fuc
Para la actividad específica se utilizó Fuc- α -1,3-GlcNAc

5.1 Actividad de transfucosilación de los mutantes derivados de M58 AlfB

Las reacciones de síntesis de Fuc- α -1,3-GlcNAc con las nuevos variantes de AlfB (M58) revelaron que la mutación implicada en una alta actividad de transfucosilación y la falta de actividad hidrolítica, correspondía exclusivamente al cambio del residuo de asparagina (N) por lisina (K) en posición 346 (N346K) de la secuencia, presente en la variante M3. Todas las variantes que contenían dicha mutación (M3, M1-3, M2-3 y M58), eran capaces de alcanzar el rendimiento máximo (100%), mientras que las que no la contenían, como eran las variantes M1 y M1-2, solo alcanzaron rendimientos máximos de 49 y 54% respectivamente. La variante M2 se comportó de forma muy similar a la enzima silvestre (rendimiento del 30%) (Fig. 20), indicando que el cambio del residuo de valina (V) por metionina (M) en la posición 261 (V261M) no generó ningún efecto con respecto al tipo silvestre, lo cual indica que este aminoácido no es esencial para la actividad de transfucosilación. El tiempo de reacción hasta alcanzar el

máximo rendimiento fue de entre 20 y 60 minutos con cada una de las enzimas mutantes y la de tipo silvestre (Figura 20).

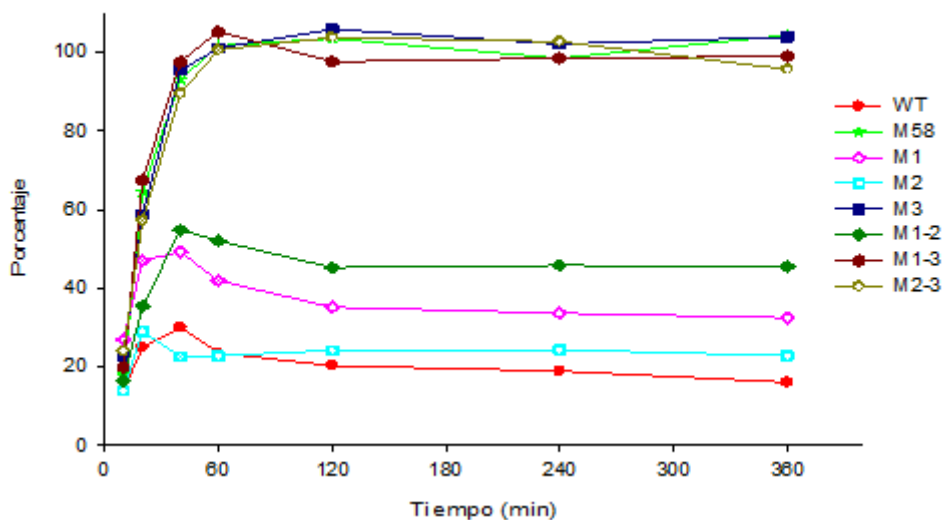


Figura 20. Análisis de la actividad de transfucosilación de los variantes de AlbB M58. *p*NP-fuc se utilizó como sustrato donador y GlcNAc como sustrato aceptor. El porcentaje de rendimiento se define como la cantidad de FUS producido respecto al sustrato donador (*p*NP-fuc).

Por razones prácticas, a pesar de que conocíamos que la mutación 3 (N346K) era la única responsable del alto rendimiento en la actividad de transfucosilación, para ensayos posteriores utilizamos la variante M58 (tres mutaciones) para la síntesis de Fuc- α -1,3-GlcNAc. A pesar de que el rendimiento de esta enzima mutante fue del 100%, el rendimiento en el producto final purificado fue de aproximadamente el 62%, lo que significó una pérdida del 38% de la totalidad del disacárido sintetizado. Esta pérdida se generó en el proceso de purificación, ya que la falta de resolución en la separación de Fuc- α -1,3-GlcNAc y GlcNAc, como se ha mencionado anteriormente, imposibilitó en cierta medida obtener un mayor rendimiento del producto final en estado puro. Sin embargo, la cantidad obtenida con esta enzima mutante fue 3 veces mayor que la que se aislaba mediante la enzima silvestre, logrando producir aproximadamente 13 g/l; una cantidad suficiente para realizar los ensayos de bioactividad posteriores.

Discusión

El cuello de botella en la investigación de los oligosacáridos de la leche humana (OLH) se debe principalmente a la baja disponibilidad comercial de estos compuestos. Por lo tanto, el gran interés en obtener suficientes cantidades de OLH para realizar ensayos biológicos fue uno de los retos planteados en este trabajo, donde se evidenció que la síntesis mediante actividad enzimática es una buena alternativa para producir este tipo de compuestos. En este trabajo se confirmó la eficiencia de las enzimas α -L-fucosidasas de *L. casei* para sintetizar oligosacáridos fucosilados mediante actividad de transfucosilación. Este tipo de compuestos, los cuales se encuentran en una alta proporción en la leche materna humana, han evidenciado varios beneficios en la salud de los recién nacidos (Smilowitz et al 2014). El uso de glicosidasas en la síntesis de carbohidratos tiene la ventaja de proveer un perfecto control de la configuración anomérica y alta regioselectividad, esto permite conseguir el producto con la selectividad deseada (Bojarova & Kren 2009) sin la necesidad de recurrir a la protección y desprotección de grupos reactivos, como ocurre en el proceso de síntesis química (Jain & Matta 1992, Kameyama et al 1991), lo que hace que este último sea un proceso costoso y de bajo rendimiento. Las α -L-fucosidasas provenientes de algunas especies de hongos (Ajisaka et al 1998, Vetere et al 1997) y bacterias (Benesova et al 2015, Eneyskaya et al 2001, Osanjo et al 2007), así como también de moluscos y mamíferos (Berteau et al 2004) se han venido utilizando para la síntesis de compuestos fucosilados mediante la actividad de transfucosilación. Sin embargo, los rendimientos alcanzados con estas enzimas en la mayoría de los casos han sido relativamente bajos (5-35%) (Berteau et al 2004, Eneyskaya et al 2001); además la especificidad para formar enlaces glicosídicos puede en ocasiones estar disminuida, llevando a la obtención de una mezcla de compuestos de todas las combinaciones posibles en una misma reacción, dificultando así la purificación (Osanjo et al 2007). La síntesis de los disacáridos fucosil- α -1,3-GlcNAc y fucosil- α -1,6-GlcNAc mediante reacciones de transfucosilación a pequeña escala ya se había demostrado previamente en nuestro laboratorio, obteniendo rendimientos del 23 y 56% con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC de *L. casei*, respectivamente (Rodríguez-Díaz et al 2013). El hecho de que no sea posible conseguir un 100% de rendimiento en reacciones de transfucosilación con este tipo de enzimas, radica en que su función natural es hidrolizar los enlaces glicosídicos. Por lo tanto, el producto de la síntesis es un substrato que puede ser hidrolizado.

Con el fin de mejorar la actividad transferasa de estas enzimas la reacción se debe realizar bajo condiciones especiales tales como el uso de solventes orgánicos en la reacción (Svensson & Thiem 1990) o la utilización de altas concentraciones de substrato donador (Murata et al 1999). Por otro lado, el tipo de tampón, pH y temperatura deben ser los adecuados. En este trabajo, mediante el escalado a 1 ml en las reacciones de transfucosilación, bajo condiciones similares a las utilizadas por Rodríguez-Díaz et al 2013, se obtuvo una producción de 4,2 mg/ml de fuc- α -1,3-GlcNAc y 9,3 mg/ml de fuc- α -1,6-GlcNAc, utilizando las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC, respectivamente. La síntesis de FUS con estas dos enzimas presenta varias ventajas, que incluyen el provenir de una bacteria probiótica, alcanzar un buen rendimiento en la síntesis y poseer una alta regioselectividad y por lo tanto evitar la formación de posibles isómeros, esto último facilita la purificación de los productos y los ensayos de su bioactividad.

Así mismo, la α -L-fucosidasa AlfC resultó ser eficiente para la síntesis de otros azúcares en reacciones de transfucosilación. Así, cuando los aceptores eran glucosa, galactosa y N,N'-diacetilquitobiosa se obtuvieron los disacáridos fucosil-glucosa y fucosil-galactosa y el trisacárido fucosil-N,N'-diacetilchitobiosa con rendimientos de 19, 8 y 6.6%, respectivamente. Sorprendentemente esta enzima también fue capaz de adicionar una L-fucosa al compuesto Asn-GlcNAc que actuaba como substrato aceptor logrando de esta manera la formación del glicoaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn con un rendimiento del 26%. Esto demuestra que esta enzima además de tener una alta especificidad para la formación de enlaces glicosídicos α -1,6 como ya se ha demostrado anteriormente (Rodríguez-Díaz et al 2013) y confirmado también aquí; puede actuar con diferentes tipos de substratos aceptores dando lugar a la formación de distintos compuestos fucosilados. La razón por la cual esta enzima presenta una alta regioselectividad para distintos substratos aceptores muy probablemente se deba a la flexibilidad de las constricciones topológicas que esta podría presentar dentro o cerca de su sitio activo. Una colaboración con el Grupo de Cristalografía de Macromoléculas (Dr. Alberto Marina, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Valencia, CSIC) ha llevado a la resolución de la estructura tridimensional del enzima AlfC. Los análisis cristalográficos de esta enzima han permitido observar algunos ensanchamientos de área dentro del centro catalítico (anexo 2), indicando que esta característica muy probablemente es la que permite la entrada y acoplamiento de diferentes tipos de substratos. Estos resultados sugieren la posibilidad de explotar estas enzimas en la

síntesis de diferentes tipos de compuestos con aplicación potencial en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica. En este trabajo se demostró que las reacciones de transglucosilación con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC pueden ser eficientemente escaladas y los compuestos fucosilados producidos pueden ser purificados.

El rendimiento de transfucosilación conseguido con la α -L-fucosidasa AlfB fue del 29%, el cual es similar al de otras α -L-fucosidasas silvestres descritas anteriormente (Berteau et al 2004, Osanjo et al 2007). En los últimos años, se han alcanzado avances substanciales en el campo de la ingeniería de enzimas para mejorar o alterar su actividad catalítica y especificidad de sustrato bajo diferentes estrategias, permitiendo así un mejor rendimiento en la síntesis de compuestos importantes para la industria farmacéutica, química y agrícola (Hancock et al 2006). Dichas estrategias, generalmente usan la información estructural de las enzimas, tales como los datos de las estructuras cristalizadas o datos obtenidos a partir de modelos de homología, que permiten identificar residuos específicos que puedan ser mutados y de esta manera mejorar su actividad. Diferente a estas estrategias, la evolución dirigida no se basa en el entendimiento detallado de la relación entre la estructura de la enzima y su función; más bien, ésta se basa en los principios darwinianos de mutación y selección (Johannes & Zhao 2006). Últimamente, la evolución dirigida se ha convertido en una herramienta poderosa para la adaptación de varias funciones de las enzimas tales como especificidad, actividad, estabilidad y solubilidad (Johannes & Zhao 2006). Estrategias de mutagénesis al azar y evolución dirigida han sido usadas en la generación de enzimas alteradas para diversas aplicaciones industriales (Cherry & Fidantsef 2003, Panke & Wubbolts 2005).

Las variantes de AlfB conseguidas en este trabajo mediante la estrategia de mutagénesis al azar, evidenciaron una pérdida de actividad hidrolítica, y la mayoría reflejaron una mejor actividad transferasa con respecto a la enzima silvestre. El análisis de los parámetros cinéticos sugiere que la ganancia de la actividad transfucosidasa se correlaciona negativamente con la actividad hidrolítica. Por ejemplo, en el mutante M58, cuyo rendimiento en la actividad de transfucosilación fue de un 100% para la síntesis de fuc- α -1,3GlcNAc; la actividad de hidrólisis disminuyó más de 100 veces para este mismo disacárido comparado con la enzima silvestre (Tabla 14). Aunque es difícil tener un entendimiento claro de los mecanismos que llevan a la actividad

hidrolítica reducida de las variantes obtenidas, los resultados observados con una sialidasa de *Trypanosoma cruzi* sugieren que dicha actividad reducida podría estar asociada a un aumento en la duración de la interacción enzima-substrato, confirmando así una mayor estabilización de los intermediarios covalentes (Amaya et al 2004). Sin embargo, en algunas de las variantes (M32, M41, M54, M75, M78, M79 y M95) aunque se mejoraron las actividades de transfucosilación, los valores de K_m para *pNP-fuc* fueron igual o más bajos que los obtenidos con la enzima silvestre, sugiriendo que la alta actividad transferasa no siempre está determinada por un alto valor de K_m . Interesantemente, se observó que los valores bajos de k_{cat} para *pNP-fuc* (Tabla 12) de las variantes se correlacionan con una mejora en la actividad de transfucosilación (Fig. 18), lo cual indica que las mutaciones en estas variantes estarían afectando algunas interacciones enzima-substrato que podrían ser esenciales para la actividad hidrolítica. Modelos moleculares sugieren que determinadas mutaciones pueden causar reorientación en los aminoácidos que están en contacto directo con los substratos resultando en una mejor energía de acoplamiento y por lo tanto en una alta actividad transferasa (Osanjo et al 2007).

Las 6 nuevas variantes (M1, M2, M3, M1-2, M1-3 y M2-3) generadas por mutagénesis dirigida a partir del variante M58, que presenta 3 sustituciones puntuales (N196S; V261M; N346K), nos permitieron determinar que la mutación N346K es la responsable de la alta actividad de transfucosilación (Fig. 20). Dado que los parámetros cinéticos (Tabla 14) de todas estas variantes, excepto M2 indicaban un comportamiento similar a la variante parental (M58), pensamos en un principio que al menos dos mutaciones (M1 y M3) estarían involucradas en la alta actividad transferasa, la cual se efectuaría mediante una acción sinérgica. Sin embargo, aunque la mutación 1 (M1; N196S) mostró un efecto mejorado en la actividad transfucosidasa (49% de rendimiento), solamente las enzimas que contenían la mutación 3 (M3, M1-3 y M2-3) fueron capaces de sintetizar el disacárido fuc- α -1,3-GlcNAc con un 100% de rendimiento (Fig. 20), sugiriendo que no hay ningún efecto sinérgico en la actividad de transfucosilación y que el alto rendimiento se debe solamente a la mutación N346K. Por lo tanto, se puede pensar que este único cambio estaría afectando de alguna manera la interacción enzima-substrato, llevando así a la mejora de dicha actividad sin la subsecuente hidrólisis del producto sintetizado como se puede observar en la Fig. 20.

Los estudios de cristalografía de AlfB (Dr. Alberto Marina, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Valencia, CSIC) han mostrado que tanto la mutación 1 (N196S) como la mutación 3 (N346K) se encuentran relativamente cerca del sitio activo de la proteína, que se encuentra en forma tetramérica. La mutación 2 (V261M) está más distante de esta región catalítica (anexo 1), evidenciando así para esta última el efecto nulo en la mejora de la actividad transfucosidasa, cuyo rendimiento fue similar al de la enzima silvestre (Fig. 20). Entre tanto, la mutación N196S (M1), dada su proximidad estaría afectando parcialmente a uno de los residuos catalíticos (Asp166) (anexo 1), cuya función es intervenir en la formación del intermediario covalente enzima-glicosil, permitiendo finalmente la síntesis o hidrólisis (dependiendo de las moléculas aceptoras disponibles) de un determinado azúcar (McCarter & Withers 1994). Por lo tanto, el hecho de que esta mutación permita un rendimiento hasta del 49% en la actividad de transfucosilación (Fig. 20) se debe probablemente a que para la serina, por ser un aminoácido más pequeño que la asparagina, las interacciones serían menores con el residuo catalítico (Asp166) o con otros aminoácidos cercanos al centro activo que comprometerían la alta actividad hidrolítica, lo cual favorecería la reacción de síntesis.

Sorprendentemente, aunque la mutación 3 (N346K) se encuentra en una posición adyacente al centro activo de una subunidad contigua, la proximidad con éste es mediante la entrada de un *loop*, sin evidenciarse ningún tipo de contacto con los residuos catalíticos como ocurre con la mutación N196S. (anexo 1). Aunque el mecanismo de la alta actividad transferasa del mutante N346K aún no se conoce, se puede postular que dicha mutación estaría afectando la forma estructural del *loop*, el cual funcionaría como una “puerta” de entrada de substratos. Por lo tanto, el cambio de la forma estructural de este *loop* muy probablemente conlleva una pérdida de afinidad por fuc- α -1,3-GlcNAc y no por el *p*NP-fuc, lo cual evitaría que este disacárido vuelva a entrar al sitio activo una vez se haya sintetizado y sea hidrolizado nuevamente, aumentando el rendimiento. Estudios estructurales adicionales son necesarios para validar esta hipótesis.

CAPITULO II

**Determinación de las propiedades bioactivas de los fucosil-
oligosacáridos (FUS)**

Determinación de las propiedades bioactivas de los fucosil-oligosacáridos (FUS)

1 Potencial prebiótico

1.1 Fermentación de disacáridos fucosil-*N*-acetilglucosamina por cepas de *Lactobacillus*

El análisis de la secuencia del genoma de lactobacilos ha revelado que los genes que codifican para α -L-fucosidasas están presentes mayoritariamente en el grupo *L. casei/paracasei/rhamnosus*. Por lo tanto, con el fin de ensayar la capacidad de varias cepas de estas especies en utilizar disacáridos fucosil-*N*-acetilglucosamina como fuente de carbono, se determinó el patrón de crecimiento en medio MRS suplementado con Fuc- α -1,3-GlcNAc o Fuc- α -1,6-GlcNAc sintetizados en el capítulo I de esta Tesis. También se evaluaron dos cepas de *Lactobacillus zeae* (Tabla 2), la cual es una especie filogenéticamente cercana a ese grupo de lactobacilos, y una cepa de *Lactobacillus plantarum* (Tabla 2), cuyo genoma no contiene genes para α -L-fucosidasas. Los resultados revelaron que 6 de las 11 cepas de *L. casei* evaluadas fueron capaces de fermentar Fuc- α -1,3-GlcNAc (Fig. 21), incluyendo la cepa BL23, para la cual, la habilidad de fermentar este carbohidrato ya se había demostrado previamente (Rodríguez-Díaz et al 2012), por lo que fue utilizada como control positivo en estos experimentos. La cepa BL93 de *L. casei* mostró una baja tasa de crecimiento en ese disacárido ($0,035 \text{ h}^{-1}$), aunque superior a la del control sin fuente de carbohidrato ($0,028 \text{ h}^{-1}$). Solo la cepa BL87 de *L. casei*, fue capaz de metabolizar Fuc- α -1,6-GlcNAc, con una tasa de crecimiento ($0,042 \text{ h}^{-1}$) más baja que la obtenida para esta cepa con Fuc- α -1,3-GlcNAc ($0,073 \text{ h}^{-1}$). Las cepas BL358 y BL377 de *L. rhamnosus* crecieron utilizando Fuc- α -1,3-GlcNAc, y la cepa BL327 de esta misma especie creció con Fuc- α -1,6-GlcNAc como fuente de carbono (Fig. 22). No se observaron diferencias en el crecimiento para el resto de las cepas evaluadas en presencia de los fucosil-disacáridos con respecto a los controles de cultivo sin fuente de carbono.

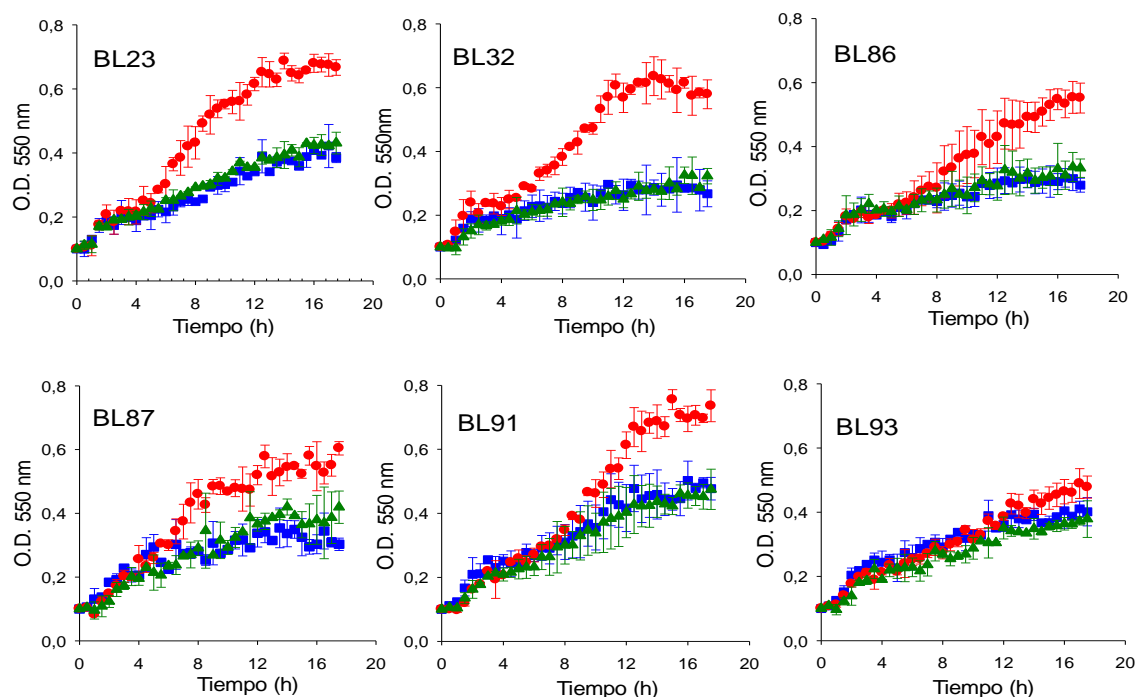


Figura 21. Curvas de crecimiento de cepas de *Lactobacillus casei*. Los cultivos se realizaron en medio MRS basal sin ninguna fuente de carbono (cuadrados), con fuc- α -1,3-GlcNAc (círculos) o fuc- α -1,6-GlcNAc (triángulos) como única fuente de carbono. *L. casei* (BL23) se utilizó como control positivo de crecimiento. Los valores presentados son los valores promedio de tres replicas. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

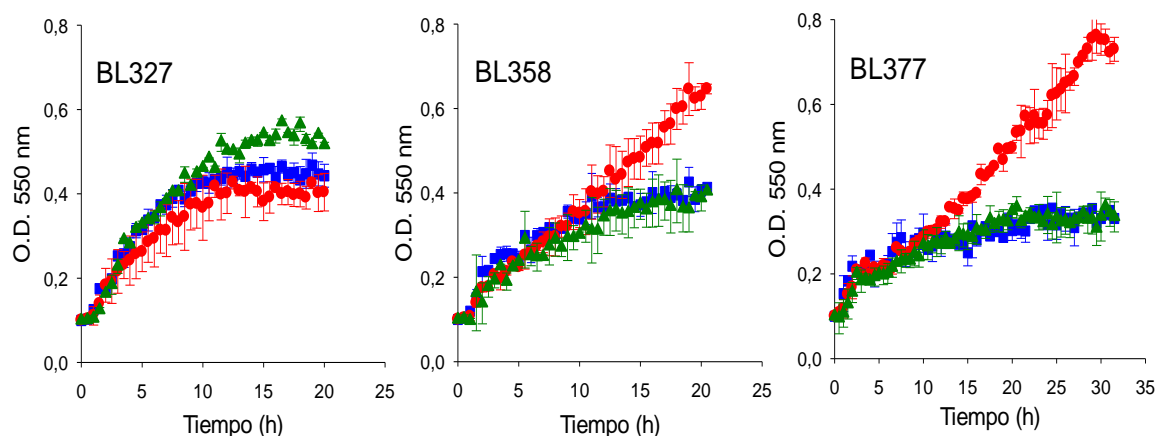


Figura 22. Curvas de crecimiento de cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Los cultivos se realizaron en medio MRS basal sin ninguna fuente de carbono (cuadrados), con fuc- α -1,3-GlcNAc (círculos) o fuc- α -1,6-GlcNAc (triángulos) como única fuente de carbono. Los valores presentados son los valores promedio de tres réplicas. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

En las cepas restantes, correspondiendo a *L. rhamnosus* (BL1, BL2 y BL3), *L. casei* (BL28, BL82, BL83, BL90 y BL94), *L. zeae* (BL95 y BL257), *L. paracasei* (BL133) y *L. plantarum* (BL166) no se evidenció crecimiento con ninguno de los dos disacáridos (Fig. 23).

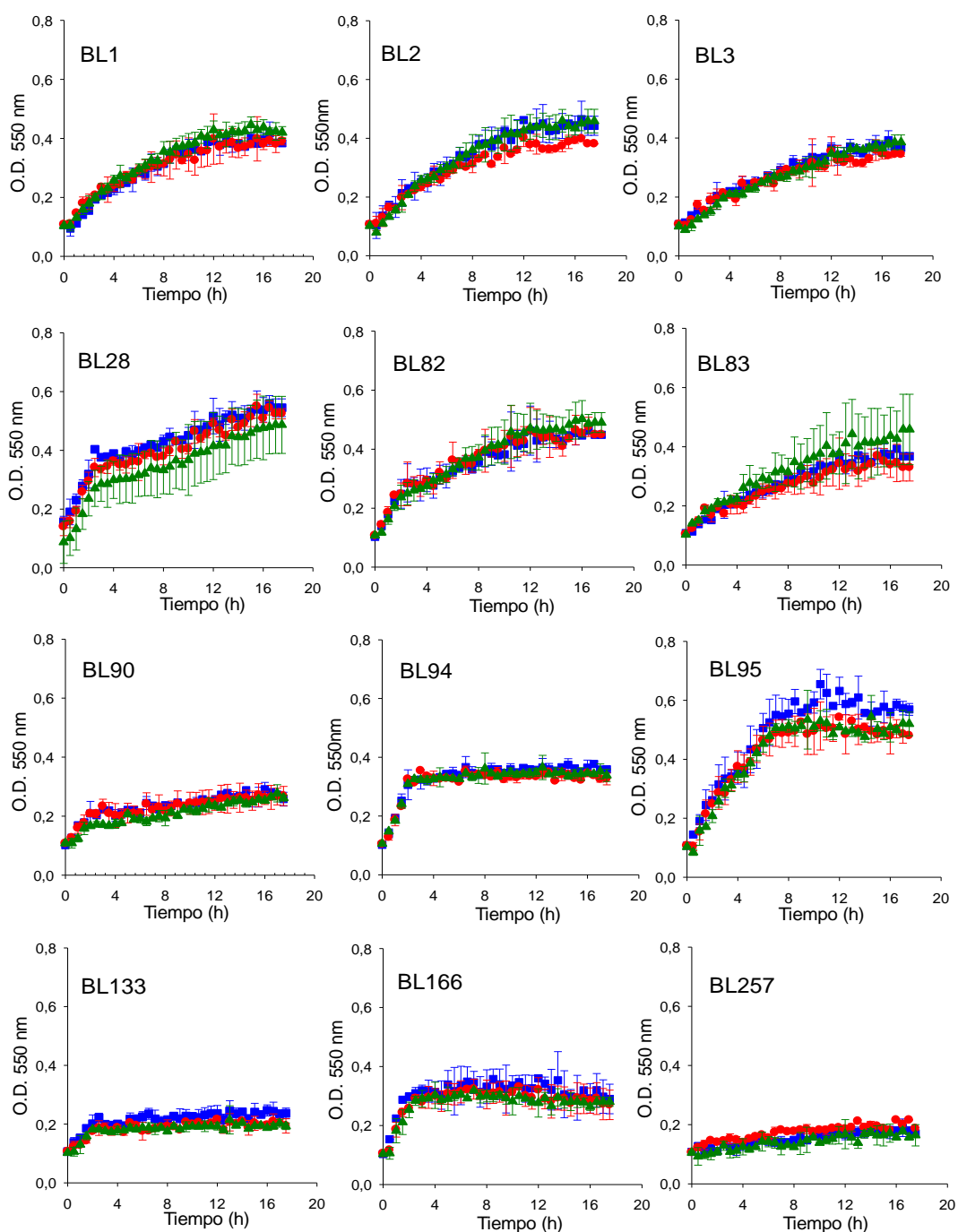


Figura 23. Curvas de crecimiento de cepas de *Lactobacillus* que no utilizaron ninguno de los disacáridos. Los cultivos se realizaron en medio MRS basal sin ninguna fuente de carbono (cuadrados), con fuc- α -1,3-GlcNAc (círculos) o fuc- α -1,6-GlcNAc (triángulos) como única fuente de carbono. Los valores presentados son los valores promedio de tres réplicas. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

1.2 Fermentación de disacáridos fucosil-*N*-acetilglucosamina por cepas de *Bifidobacterium*

Con el fin de determinar la capacidad de las especies de *Bifidobacterium* para utilizar disacáridos fucosil-*N*-acetilglucosamina como fuente de carbono, se analizó su crecimiento en medio MRS basal suplementado con 8 mM de Fuc- α -1,3-GlcNAc o Fuc- α -1,6-GlcNAc. La utilización de estas fuentes de carbono se determinó por la disminución del pH de los sobrenadantes del cultivo como consecuencia de la fermentación (Tabla 15). No se observó ningún crecimiento para ninguna de las cepas evaluadas en los controles de cultivo sin fuente de carbohidratos, cuyos valores de pH oscilaron entre 6.69 y 6.93. Las cepas de *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* fueron capaces de fermentar Fuc- α -1,3-GlcNAc, como se muestra por la disminución de pH en los sobrenadantes de cultivo (Tabla 15).

Tabla 15. Valores de pH de sobrenadantes de cultivo de cepas de *Bifidobacterium*. Los cultivos se realizaron en MRS basal suplementado con carbohidratos a 8 mM

Especies	Sin azúcar	Fuc- α -1,3- GlcNAc	Fuc- α -1,6- GlcNAc	GlcNAc	L-fucosa	Glucosa
<i>B. breve</i>	6.71	5.65	6.55	5.72	6.49	5.61
<i>B. bifidum</i>	6.81	6.74	6.54	6.86	6.82	6.36
<i>B. longum</i>	6.73	6.93	6.5	6.61	6.55	5.77
<i>B. angulatum</i>	6.72	6.68	6.52	6.76	6.76	6.11
<i>B. pseudocatenulatum</i>	6.69	5.72	6.45	5.83	6.54	5.63
<i>B. gallicum</i>	6.9	6.72	6.51	6.76	6.78	5.72
<i>B. adolescentis</i>	6.74	6.95	6.52	6.78	6.78	6.12
<i>B. animalis</i> subsp.						
<i>Lactis</i>	6.93	6.69	6.58	6.83	6.82	5.52

Los valores en negrilla corresponden a los resultados de crecimiento positivos (acidificación).

1.3 Análisis de azúcares en los sobrenadantes de los medios de cultivo

Para confirmar que Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc eran fermentados por las cepas de *Lactobacillus* anteriormente descritas, se analizaron los sobrenadantes de los cultivos y se determinó el contenido de azúcares. Se encontró L-fucosa en los sobrenadantes de las cepas de *L. casei*, BL23, BL32, BL86, BL87, BL91 y BL93 cultivadas en presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc, así como también en los sobrenadantes

de las cepas BL87 y BL327 pertenecientes a *L. casei* y *L. rhamnosus*, respectivamente, cultivadas en Fuc- α -1,6-GlcNAc. Estos hallazgos están de acuerdo con la incapacidad de estas cepas para fermentar L-fucosa en medio MRS conteniendo 0.5% de este azúcar (datos no mostrados). Adicionalmente, estos resultados sugerían que los fucosil-disacáridos eran probablemente transportados, hidrolizados y la L-fucosa resultante era excretada al medio extracelular. Sin embargo, la L-fucosa no fue encontrada en los sobrenadantes de cultivo de las cepas BL358 y BL377 de *L. rhamnosus* cultivadas en Fuc- α -1,3-GlcNAc, indicando que ambos disacáridos constituyentes, GlcNAc y L-fucosa, fueron metabolizados. Esto concuerda con la capacidad de estas cepas de crecer en medio MRS con L-fucosa como fuente de carbono, así como también con la presencia de un operón *fuc* en la cepa BL377, involucrado en el metabolismo de esta hexosa como se describe en el capítulo III de este trabajo.

En *Bifidobacterium*, L-fucosa también fue encontrada en el sobrenadante de las cepas BL217 y BL334 de *B. breve* y *B. pseudocatenulatum*, las cuales habían logrado acidificar el medio (Tabla 15) cuando fueron cultivadas en presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc. Esto sugiere que el disacárido fue hidrolizado por una α -L-fucosidasa y solo la porción de GlcNAc fue metabolizada. Esto estaba de acuerdo con el crecimiento de ambas cepas en GlcNAc pero no en L-fucosa como fuentes de carbono (Tabla 15).

En el análisis de los sobrenadantes de las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en las que no se evidenció crecimiento en presencia de los disacáridos Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc (Tabla 15), no se detectó L-fucosa pero si los disacáridos; lo que permitió corroborar la ineficacia absoluta de su utilización como fuente de carbono bajo las condiciones ensayadas.

El análisis se realizó mediante la determinación de presencia (1) o ausencia (0) de los azúcares (Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc) con los que se había cultivado cada una de las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como también presencia o ausencia de sus componentes (L-fucosa y GlcNAc) (Tabla 16).

Aunque en la mayoría de los sobrenadantes de las cepas que crecieron en presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc se detectaba solamente L-fucosa; en el sobrenadante de la cepa BL93 de *L. casei*, se detectó tanto L-fucosa como Fuc- α -1,3-GlcNAc (Tabla 16), indicando que este disacárido estaba siendo parcialmente metabolizado, lo cual se reflejaba en el bajo crecimiento ($OD_{550} = 0.45$) (Fig. 21). Un caso similar ocurrió con

los sobrenadantes de las cepas BL87 (*L. casei*) y BL327 (*L. rhamnosus*) cultivadas en presencia de Fuc- α -1,6-GlcNAc, detectándose tanto L-fucosa como el disacárido (Tabla 16), lo cual también se reflejó en un bajo crecimiento ($OD_{550} = 0.40$ y 0.5 respectivamente).

Tabla 16. Presencia de azúcares en los sobrenadantes de los medios de cultivo. El análisis se realizó tras el crecimiento con los disacáridos Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc

Género	Cepa	Fuc- α -1,3-GlcNAc			Fuc- α -1,6-GlcNAc		
		Fuc	GlcNAc	F3	Fuc	GlcNAc	F6
	BL1	0	0	1	0	0	1
	BL2	0	0	1	0	0	1
	BL3	0	0	1	0	0	1
	BL23	1	0	0	0	0	1
	BL28	0	0	1	0	0	1
	BL32	1	0	0	0	0	1
	BL82	0	0	1	0	0	1
	BL83	0	0	1	0	0	1
	BL86	1	0	0	0	0	1
	BL87	1	0	0	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>1</u>
<i>Lactobacillus</i>	BL90	0	0	1	0	0	1
	BL91	1	0	0	0	0	1
	BL93	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	0	0	1
	BL94	0	0	1	0	0	1
	BL95	0	0	1	0	0	1
	BL133	0	0	1	0	0	1
	BL166	0	0	1	0	0	1
	BL358	0	0	0	0	0	1
	BL257	0	0	1	0	0	1
	BL327	1	0	0	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>1</u>
	BL377	0	0	0	0	0	1
	BL217	1	0	0	0	0	1
	BL331	0	0	1	0	0	1
	BL333	0	0	1	0	0	1
<i>Bifidobacterium</i>	BL334	1	0	0	0	0	1
	BL336	0	0	1	0	0	1
	BL360	0	0	1	0	0	1
	BL335	0	0	1	0	0	1
	BL330	0	0	1	0	0	1

Presencia (1); ausencia (0)

Subrayado y en negrilla se resalta las cepas que metabolizaron los disacáridos (Fuc- α -1,3-GlcNAc o Fuc- α -1,6-GlcNAc) de forma parcial.

Fuc = L-fucosa; GlcNAc = N-acetilglucosamina; F3 = Fuc- α -1,3-GlcNAc y F6 = Fuc- α -1,6-GlcNAc.

2 Presencia de genes homólogos para *alfB* y *alfC* en cepas de *Lactobacillus*

Previamente se había demostrado que la capacidad de *L. casei* BL23 para fermentar Fuc- α -1,3-GlcNAc estaba asociada con la actividad de la α -L-fucosidasa AlfB codificada por el gen *alfB* (Rodríguez-Díaz et al 2012). Para determinar si las demás cepas de *Lactobacillus* que metabolizan Fuc- α -1,3-GlcNAc también contienen un homólogo para el gen *alfB*, se realizó un análisis por *Southern blot* (Fig. 24a). Los resultados mostraron que todas las cepas de *L. casei* (BL32, BL86, BL87, BL91 y BL93) y cepas de *L. rhamnosus* (BL358 y BL377) que crecen en presencia de ese disacárido presentaron señales de hibridación, sugiriendo que en estas cepas el metabolismo de Fuc- α -1,3-GlcNAc también depende de una α -L-fucosidasa homóloga a AlfB. Curiosamente, aunque la cepa BL257 de *L. zeae* no crece en la presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc, mostró una banda de hibridación, sugiriendo que en esta cepa el homólogo de *alfB* no es funcional o alguna otra etapa metabólica puede estar truncada.

La α -L-fucosidasa AlfC aislada de *L. casei* BL23 mostró una actividad específica alta en la hidrólisis de Fuc- α -1,6-GlcNAc (Rodríguez-Díaz et al 2011), aunque esta cepa y la mayoría de las cepas evaluadas anteriormente no pueden crecer usando este carbohidrato como fuente de carbono. La presencia de genes homólogos de *alfC* se analizó en cepas de *Lactobacillus*, y los resultados mostraron que la sonda del gen *alfC* de *L. casei* BL23 hibridó con el DNA cromosomal de 8 de las 10 cepas de *L. casei* y de 4 de las 6 cepas de *L. rhamnosus* (Fig. 24b), sugiriendo que las enzimas relacionadas con AlfC están ampliamente distribuidas entre estas dos especies. Las cepas BL87 de *L. casei* y BL327 de *L. rhamnosus*, las cuales dieron positivo en la hibridación, indicando que contienen un gen homólogo a *alfC*, mostraron la capacidad para metabolizar el disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc aunque con baja eficiencia. Sin embargo, el resto de las cepas de *Lactobacillus* que contienen un gen homólogo para *alfC* no crecieron en presencia de Fuc- α -1,6-GlcNAc, sugiriendo inicialmente que este azúcar no es el substrato natural de AlfC, o que el gen *alfC* y/u otros genes necesarios (por ejemplo: genes que codifican para proteínas transportadoras) no son expresados, o que, en las condiciones fisiológicas evaluadas, estas cepas no eran capaz de utilizar este disacárido. Todas estas cuestiones son discutidas en el capítulo IV de esta Tesis.

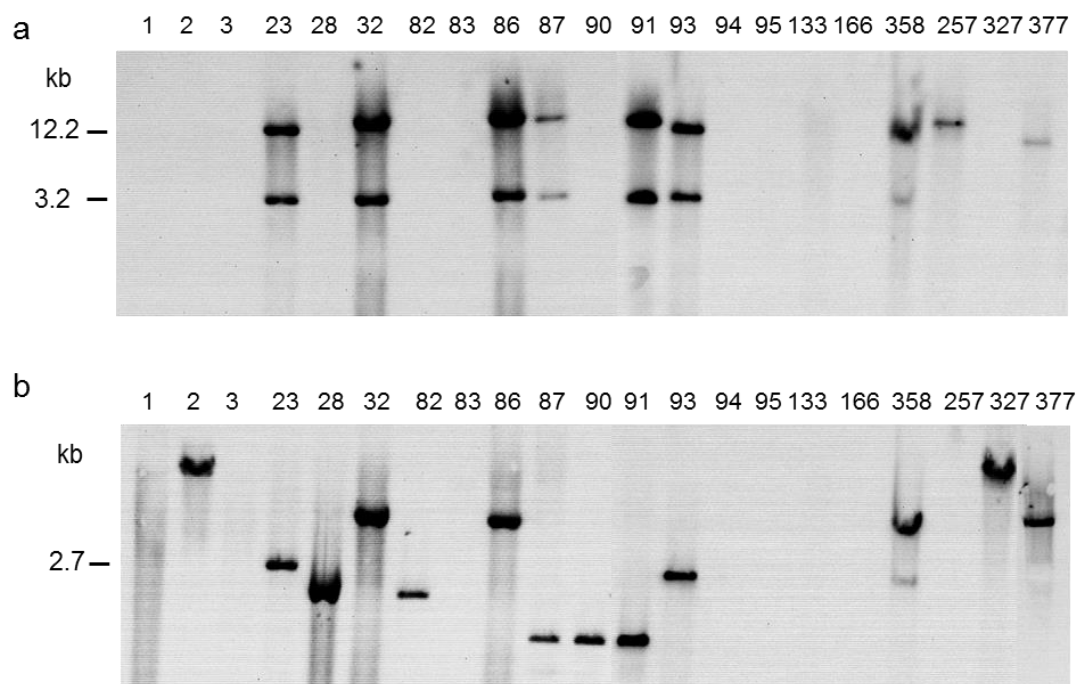


Figura 24. Análisis por *Southern blot*. El análisis se realizó con el DNA genómico digerido con *EcoRI* de las cepas de *Lactobacillus rhamosus* (BL1, BL2, BL3, BL327, BL358, BL377), cepas de *Lactobacillus casei* (BL23, BL28, BL32, BL82, BL83, BL86, BL87, BL90, BL91, BL93, BL94), cepas de *Lactobacillus zaeae* (BL95, BL257), cepa de *Lactobacillus paracasei* (BL133) y cepa de *Lactobacillus plantarum* (BL166). Un fragmento de DNA correspondiendo a *alfB* (a) o *alfC* (b) de la cepa de *Lactobacillus casei* BL23 fue usado como sonda. El DNA genómico de esta cepa fue usado como control positivo. Los números en la izquierda indican el tamaño en kb de los fragmentos de DNA de la cepa BL23.

3 Inhibición de la adherencia de bacterias enteropatógenas *E. coli* (EPEC) por disacáridos fucosil-*N*-acetilglucosamina

Los fucosil-disacáridos sintetizados y purificados aquí (Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc) y sus componentes monosacáridos, GlcNAc y L-fucosa, fueron ensayados para determinar su capacidad de inhibir la adhesión de bacterias EPEC a la línea celular epitelial humana HT-29. Ambos fucosil-disacáridos forman parte de los glicoconjugados de la mucosa y la leche humana; por lo tanto, cinco cepas EPEC con diferentes serotipos y aisladas de infantes con gastroenteritis (Tabla 3) fueron escogidas para probar el potencial anti-adhesivo. Adicionalmente también se ensayó la cepa tipo *E. coli* (CECT 515), la cual es un enteropatógeno de pollos, evidenciándose que su adherencia no fue afectada por ninguno de los cuatro carbohidratos probados (Fig. 25). Como control (100% de adhesión) se utilizó PBS sin carbohidratos añadidos. Los

resultados mostraron que ambos fucosil-disacáridos inhibieron la adhesión de ciertas cepas EPEC en diferentes grados a las células HT-29, mientras que la unión de otras cepas EPEC no fue inhibida (Fig. 25), aunque para la mayoría de los casos la inhibición no fue estadísticamente significativa. Notablemente, se pudo apreciar que la adherencia de la cepa CECT 816 a las células HT-29 sí fue significativamente inhibida por Fuc- α -1,6-GlcNAc (Inhibición de $66.8\% \pm 12.2\%$, $P = 0.011$). Además, la unión de esta cepa también fue inhibida por Fuc- α -1,3-GlcNAc, aunque en este caso el valor no fue estadísticamente significativo (inhibición de $23.5\% \pm 4.6\%$, $P = 0.072$) (Tabla 17). La disminución de la adhesión tampoco fue significativa para la cepa CECT 352, aunque sí se observó que dicha adhesión fue afectada por ambos fucosil-disacáridos y por sus constituyentes monosacáridos, GlcNAc y L-fucosa (Fig. 25). El carbohidrato con la más alta inhibición para esta cepa (CECT 352) fue el Fuc- α -1,6-GlcNAc (inhibición de $64.2\% \pm 10.1\%$, $P = 0.095$) (Tabla 17, Fig. 25).

Tabla 17. Porcentaje de inhibición con cada uno de los FUS y sus componentes

FUS y Componentes	% de inhibición de adhesión para cada cepa EPEC					
	CECT515	CECT352	CECT727	CECT729	CECT816	CECT817
fuc-α-1,3-GlcNAc	0	52 ± 14	62 ± 9	0	24 ± 5	24 ± 20
fuc-α-1,6-GlcNAc	7 ± 24	64 ± 10	59 ± 17	29 ± 15	67 ± 12	22 ± 30
GlcNAc	0	53 ± 10	0	0	35 ± 16	0
L-fucosa	0	43 ± 22	75 ± 7	0	0	0

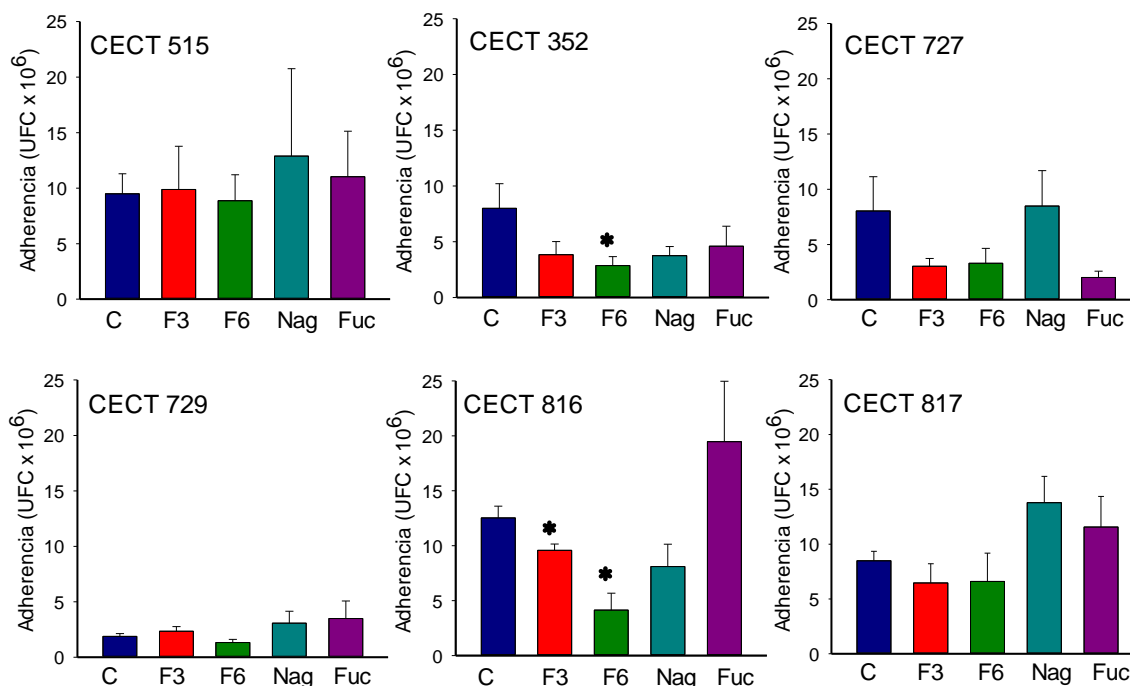


Figura 25. Inhibición de la adhesión de bacterias EPEC. Adherencia de las cepas de *Escherichia coli* CECT 515, CECT 352, CECT 727, CECT 729, CECT 816 Y CECT 817 a las células HT29 en presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc (F3), Fuc- α -1,6-GlcNAc (F6), GlcNAc (Nag) o L-fucosa (Fuc) a 1 mM. C indica el control en la ausencia de carbohidratos. Los datos se determinaron por recuento en placa de unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos representados son los valores medios basados en al menos tres réplicas independientes. Las barras indican los errores estándar. Los valores de las diferencias significativas ($P < 0.1$) entre cada carbohidrato y el control se muestran con un asterisco.

Estos resultados demuestran que hay una tendencia a la inhibición de unión de cepas EPEC con Fuc- α -1,3-GlcNAc y dicha tendencia fue mucho más marcada con Fuc- α -1,6-GlcNAc, evidenciando una inhibición de la adhesión principalmente de la cepa CECT 816, la cual fue estadísticamente significativa. Dado que el efecto anti-adhesivo de estos dos disacáridos, así como el de sus monosacáridos constituyentes (L-fucosa y GlcNAc) se dio a distintos niveles, es probable que tanto su estructura como su composición sean determinantes para la inhibición.

La inhibición de la unión fue también observada por visualización mediante microscopia de fluorescencia de las bacterias adheridas al cultivo celular (Fig. 26a). Las bacterias de la cepa CECT 352 adheridas a las células humanas HT-29 eran observadas en ausencia del disacárido fuc- α -1,6-GlcNAc, mientras que en presencia de este azúcar fue evidente la inhibición (Fig. 26b), lo cual corrobora los resultados anteriores.

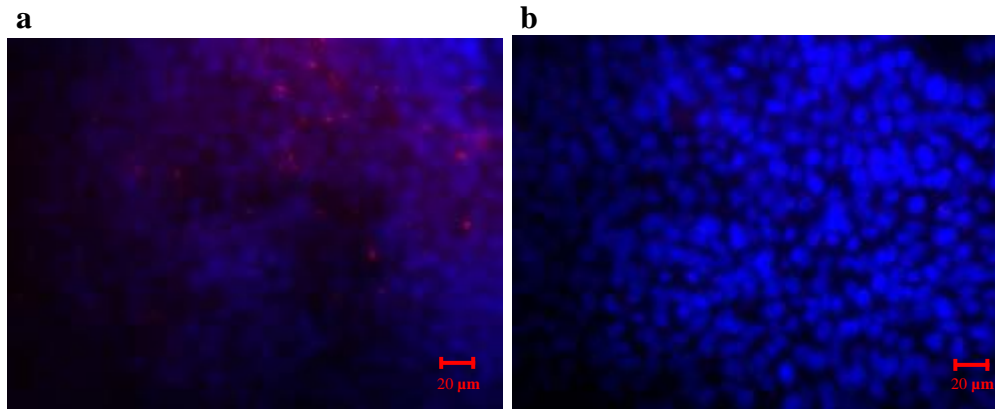


Figura 26. Inhibición de la adhesión de la cepa CECT 352 detectada por FISH. Adherencia de la cepa de *Escherichia coli* enteropatogénica CECT 352 a las células HT29 en la ausencia de fucosil-disacáridos (a) y en la presencia de 1 mM de Fuc- α -1,6-GlcNAc (b). Las células bacterianas (rojo) fueron detectadas por FISH y los núcleos de las HT29 fueron teñidos con DAPI (azúl). Objetico 40x; escala bar 20 μ m.

Discusión

Los glicanos de la leche humana, los cuales incluyen oligosacáridos libres, glicoproteínas y glicolípidos, se están proponiendo como los principales promotores del desarrollo de la microbiota intestinal infantil. Estos glicanos pueden actuar como prebióticos, contribuyendo al crecimiento de bacterias beneficiosas, y como anti-adhesinas protegiendo contra patógenos infecciosos (De Leoz et al 2015, Liu & Newburg 2013, Newburg 2013). Más del 50% de los oligosacáridos de la leche humana (OLH) son fucosilados (Bode 2012) y la L-fucosa es además uno de los monosacáridos más abundantes en las glicoproteínas y glicolípidos de la mucosa intestinal. Además, muchas vías de señalización celular son mediadas por oligosacáridos ligandos de la superficie de las células que contienen L-fucosa en el extremo terminal (Levander et al 2009). A pesar de la importancia de la L-fucosa en la ecología microbiana del tracto gastrointestinal, los lactobacilos tienen una capacidad limitada para usar compuestos fucosilados. Dos de los principales OLH fucosilados presentes en la leche humana, 2'-fucosillactosa y 3'-fucosillactosa, no son fermentados por especies de *L. casei* y *L. rhamnosus*. Por otro lado, *Lactobacillus delbrueckii* mostró un leve crecimiento en presencia de estos carbohidratos y una débil actividad fucosidasa (Rodríguez-Díaz et al 2012, Yu et al 2013b). Estos resultados son consistentes con la baja capacidad de las especies de *Lactobacillus* para crecer usando los OLH totales (Underwood et al 2014, Ward et al 2006). En este capítulo se analizó el potencial prebiótico y el efecto anti-adhesivo de dos fucosil-disacáridos, los cuales fueron sintetizados en nuestro laboratorio como se describe en el capítulo I de esta Tesis. El disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc forma parte de muchos oligosacáridos de la leche humana, ya sea de forma libre o como glicoconjugados de proteínas, y el Fuc- α -1,6-GlcNAc forma parte de los *N*-glicanos presentes en la mucosa humana y en glicoproteínas de la leche (De Leoz et al 2015, Garrido et al 2013). Estos disacáridos pueden ser químicamente sintetizados con un coste muy alto para cantidades del orden de miligramos, lo cual limita la investigación acerca de su funcionalidad y su eventual aplicación. Por lo tanto la síntesis enzimática eficiente, como se describe en el capítulo I de esta Tesis, ofrece la posibilidad de obtener suficientes cantidades para llevar a cabo ensayos bioquímicos y microbiológicos.

En nuestro laboratorio se ha demostrado anteriormente que la bacteria probiótica *L. casei* BL23 puede utilizar Fuc- α -1,3-GlcNAc como carbohidrato fermentable (Rodríguez-Díaz et al 2012). Curiosamente, la L-fucosa se excreta al medio de cultivo, metabolizándose únicamente la GlcNAc. La reacción de hidrólisis de fuc- α -1,3-GlcNAc ha de producirse intracelularmente, ya que AlfB es una enzima no secretada y *L. casei* BL23 tiene genes que codifican transportadores implicados en la internalización de este disacárido (Rodríguez-Díaz et al 2012). Ocho de las 17 cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus* que se ensayaron aquí, fueron capaces de crecer en presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc, lo que estaría de acuerdo con la presencia de genes homólogos que codifican para la α -L-fucosidasa AlfB. Sin embargo, la presencia de genes que codifican para la α -L-fucosidasa AlfC, la cual mostró una alta especificidad *in vitro* por Fuc- α -1,6-GlcNAc (Rodríguez-Díaz et al 2011), no fue suficiente para el catabolismo de este carbohidrato en la mayoría de las cepas que se probaron. Un análisis del genoma de la cepa BL23 alrededor de los genes *alfH* (codificando una putativa permeasa) y *alfC* (codificando para la α -L-fucosidasa C, AlfC) mostró que de forma divergente a ellos se encuentran genes que codifican para un regulador transcripcional, para una putativa quinasa y tres genes que codifican para tres hipotéticas enzimas respectivamente. Estas últimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos, incluyendo una putativa glicosilasparaginasa. El disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc se encuentra unido a asparagina en la estructura básica *N*-glicano de glicoproteínas (Hagglund et al 2007). Por tanto, cabría suponer que la actividad de este regulador y las enzimas catabólicas que se encuentran en este *cluster* estarían involucradas en el metabolismo de componentes glicoproteicos. Este supuesto se estudiará en el capítulo IV de esta Tesis Doctoral. Además de las α -L-fucosidasas, *L. casei* también expresa una β -galactosidasa específica que cataboliza estructuras básicas de lacto-*N*-biosa y galacto-*N*-biosa que se encuentran en los glicoconjugados de las mucosas y la leche humana (Bidart et al 2014). Esto sugiere que las especies de *L. casei* tienen las herramientas metabólicas necesarias para aprovechar muchos carbohidratos que provienen tanto de la dieta como del epitelio intestinal, permitiéndole finalmente una mejor supervivencia y desarrollo en el tracto intestinal infantil.

Curiosamente, a diferencia de las cepas de *L. casei*, las cepas de *L. rhamnosus* GG y HN01 (BL377 y BL358 respectivamente), mostraron la capacidad para la utilización del disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc completo (Fig. 22), metabolizando tanto la L-fucosa

como la GlcNAc, por lo que estas cepas dispondrían de la maquinaria enzimática necesaria para el metabolismo de estos dos componentes. Aunque *L. rhamnosus* GG (LGG) es una de las especies de *Lactobacillus* más documentada y comercializada como probiótico (Douillard et al 2013) no se han encontrado trabajos en la literatura que describan la utilización de compuestos fucosilados. Tan solo en algunos estudios previos se ha demostrado que esta especie era capaz de crecer en presencia de GlcNAc o L-fucosa como única fuente de carbono (Douillard et al 2013, Sanchez et al 2010). También se observó actividad hidrolítica por la presencia de α -L-fucosidasas; lo cual sugiere que estas enzimas podrían participar en el proceso de adaptación al intestino por parte de esta bacteria (Monteagudo-Mera et al 2011). Esta es la primera vez en la que se demuestra la utilización de FUS por parte de este microorganismo, lo cual abre la posibilidad de su estudio más detallado en cuanto a metabolismo y genes implicados en la utilización de estos compuestos fucosilados que le permiten colonizar diversos hábitats, principalmente el tracto gastrointestinal humano.

En contraste a los lactobacilos, varias especies de *Bifidobacterium* han mostrado su capacidad de crecer eficientemente en OLH (Garrido et al 2013). Esto se correlaciona con la presencia de un conjunto de genes contenidos en sus genomas, los cuales están involucrados en la unión, transporte e hidrólisis de estos carbohidratos. Sin embargo, α -L-fucosidasas sólo se han descrito para algunas pocas especies de *Bifidobacterium*, entre ellas, la α -L-fucosidasa AfcA de *B. bifidum*, caracterizada por la capacidad de hidrolizar enlaces α -1,2 de 2'-fucosillactosa (Katayama et al., 2004) y AfcB, la cual juega un importante papel en la degradación de oligosacáridos fucosilados de la leche humana con enlaces α -1,3/4 (Ashida et al. 2009). El genoma de la cepa CECT 4551 (ATCC 15697) de *B. longum* contiene muchos genes que codifican para glicosidasas activas en OLH, incluyendo cinco α -L-fucosidasas con diferente especificidad de enlace *in vitro* (Sela et al 2012). Sin embargo, estas especies no metabolizaron los fucosil-disacáridos analizados en este trabajo, sugiriendo que estos carbohidratos no son sustratos naturales para estas hidrolasas o que otros pasos metabólicos para su utilización están incompletos. En contraste, la cepa BL217 (CECT 4839) de *B. breve* y la cepa BL334 (CECT 5776) de *B. pseudocatenulatum* son capaces de crecer usando la porción GlcNAc de Fuc- α -1,3-GlcNAc como fuente de carbono. Al igual de lo que ocurre en *L. casei*, estas cepas excretan la porción de L-fucosa al medio de cultivo. El mecanismo por el cual la L-fucosa se excreta al medio se desconoce y sólo se puede

presuponer que los genes implicados en su metabolismo no están presentes o no son funcionales en estos microorganismos. Además, el análisis de sus secuencias genómicas reveló que no hay α -L-fucosidasas homólogas a las de *L. casei* BL23 anotadas en estas dos especies. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la cepa BL217 de *B. breve* tiene una α -L-fucosidasa que pertenece al grupo de las glicosil hidrolasas (GH) de la familia 95, la cual no hidroliza 2'-fucosillactosa o 3'-fucosillactosa (Ruiz-Moyano et al 2013). El catabolismo de Fuc- α -1,3-GlcNAc por *B. breve* muy probablemente podría depender de la actividad de esta enzima. Con respecto a esto, un trabajo reciente ha correlacionado el incremento del número de especies de *Bifidobacterium* en el tracto gastrointestinal de infantes con el consumo de OLH fucosilados (De Leoz et al 2015). Entre las especies de *Bifidobacterium* detectadas en un infante particular, la presencia de *B. breve* incrementó después de 13 semanas de vida (De Leoz et al 2015) y especies de *B. pseudocatenulatum* son frecuentemente encontradas en las heces de infantes que se alimentan de leche materna. Por lo tanto Fuc- α -1,3-GlcNAc en el tracto gastrointestinal de los recién nacidos puede ser un buen candidato como sustrato que contribuya a la proliferación no sólo de *Lactobacillus* del grupo *L. casei/rhamnosus* sino también de las poblaciones de *B. breve* y *B. pseudocatenulatum*.

La principal ventaja del uso de carbohidratos prebióticos es que al no ser absorbidos en el intestino delgado llegan intactos al colon, donde estimulan el crecimiento de los microorganismos nativos de él, sin necesidad de introducir una especie microbiana en un alimento (como es el caso de los probióticos). Una ventaja adicional es que los oligosacáridos son más fáciles de introducir en la formulación de un alimento que los microorganismos, ya que estos últimos pueden perder su viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento. En consecuencia, los prebióticos pueden ser una estrategia práctica y eficiente para modular la microbiota intestinal.

Cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC) son la principal causa de diarreas infantiles y la tasa de mortalidad puede llegar hasta el 30% en países en vía de desarrollo (Nataro & Kaper 1998, Ochoa & Contreras 2011, Senerwa et al 1989). La adherencia de EPEC a las células epiteliales es debido a varios factores (Nougayrede et al 2003), incluyendo la expresión de lectinas que reconocen receptores que contienen carbohidratos localizados en la superficie de las células epiteliales del hospedador (Hyland et al 2008). Adicionalmente, *E. coli* también puede formar en su superficie estructuras antigénicas

basadas en glicanos, las cuales son reconocidas por lectinas humanas (Stowell et al 2010). En ambos casos, la inhibición de la adherencia de *E. coli* puede ocurrir en presencia de carbohidratos libres similares a los receptores del hospedador e interferir en la unión. La ingestión de prebióticos como los FOS y GOS disminuye significativamente la presencia de patógenos intestinales de los géneros *Clostridium*, *Enterobacter* y de *Staphylococcus aureus* (Boehm et al., 2004). Una acción directa y específica de estos compuestos para prevenir la infección, es su capacidad de actuar como análogos de los receptores de tracto gastrointestinal a los cuales se pueden unir ciertos patógenos (Morrow et al., 2004). 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 (Heithoff et al., 1997). Este es el mecanismo que siguen, además de *E. coli*, cepas de *Helicobacter jejuni*, y géneros como *Salmonella* y *Shigella* (Ofek y Sharon 1990; Sharon 2006). Estudios realizados por Martin-Sosa et al (2002) mostraron el efecto de la fracción de oligosacáridos de leche humana en la inhibición de la adhesión de cepas de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y de *E. coli* uropatogénica (UPEC) a tejidos celulares. Las adhesinas de estos microorganismos reconocieron oligosacáridos que contienen galactosa y ácido siálico (Sharon 2006). Por otro lado, se ha demostrado que la L-fucosa presente en los OLH inhibe la adhesión de la toxina termoestable de *E. coli* (STa) a sus receptores intestinales (Crane et al 1994). Además, también se ha demostrado la importancia de los FUS en la prevención de diarrea por *Campylobacter jejuni*, calicivirus y ETEC en niños neonatos alimentados con leche materna (Morrow & Rangel 2004). Los fucosil-disacáridos (Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc) que se ensayaron en este trabajo y sus monosacáridos constituyentes, L-fucosa y GlcNAc, inhibieron la adhesión a diferentes niveles de ciertas cepas EPEC a las células intestinales humanas HT-29 en ensayos *in vitro* (Fig. 25), sugiriendo que tanto la estructura como la composición de estos azúcares son determinantes para su potencial antiadhesivo. Ambos monosacáridos son constituyentes comunes de los antígenos O- y K- caracterizados de *E. coli* (Feng et al 2005, Larsson et al 2004, Samuel & Reeves 2003, Shao et al 2003, Wang et al 1998, Whitfield 2006). La presencia de estos antígenos, además de permitir clasificar las diferentes cepas de *E. coli* por serotipos, los cuales pueden ir o no asociados a una patología concreta (Rodríguez-Angeles 2002), son de gran importancia en la respuesta inmune del hospedador (Samuel & Reeves 2003). Las bacterias que expresan antígenos

del grupo sanguíneo humano en su superficie pueden evadir la respuesta inmune en individuos que no generan anticuerpos contra estos epítomos bacterianos. Las lectinas que se expresan en el tracto intestinal reconocen y matan bacterias *E. coli* que expresan antígenos del grupo sanguíneo humano, confiriendo así una protección directa contra estas bacterias que evaden la respuesta inmune adaptativa. Por ejemplo, el serotipo O86 de *E. coli*, el cual presenta un epítomo B idéntico al del grupo sanguíneo humano se une *in vitro* a una galectina específica causando la muerte a la bacteria (Stowell et al 2010). Interesantemente, la lactosa, pero no la sacarosa, ha mostrado inhibir la muerte directa de estas bacterias inducida por galectina (Stowell et al 2010). En este trabajo se demostró que la adherencia de la cepa CECT 816 de *E. coli* (serotipo O86), a las células HT-29 fue significativamente inhibida por Fuc- α -1,6-GlcNAc, sugiriendo que este disacárido también puede afectar a otros tipos de interacciones célula-bacteria.

Los disacáridos Fuc- α -1,3-GlcNAc y Fuc- α -1,6-GlcNAc mostraron poseer un potencial prebiótico para determinadas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* así como también la capacidad de actuar como anti-adhesinas contra patógenos intestinales, responsables de gastroenteritis infantil. Ambos disacáridos forman parte de los glicanos de la leche humana y podrían ser biomoléculas relevantes para la salud de los infantes. Aunque todavía se necesita realizar más estudios, esos carbohidratos pueden ser unos buenos candidatos para el desarrollo de nuevas leches de fórmula funcionales.

CAPITULO III

**Análisis molecular y funcional del operon implicado en la
utilización de L-fucosa en *Lactobacillus rhamnosus* GG
(LGG)**

Análisis molecular y funcional del operón implicado en la utilización de L-fucosa en *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)

1 Genes involucrados en el catabolismo de L-fucosa

1.1 Operón *fuc* de LGG

En el genoma de LGG (genes LGG_02680 a LGG_02685) está anotado un operón que codifica para enzimas que conformarían una ruta completa para el catabolismo de L-fucosa (Fig. 27). Los genes *fucI*, *fucK*, *fucP* y *fucU* codificarían respectivamente para una L-fucosa isomerasa, L-fuculosa quinasa, un *simporter* L-fucosa/H⁺ de la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) y una L-fucosa mutarotasa, una enzima que acelera la conversión del anómero β de la L-fucosa al anómero α , el cual sería sustrato para la enzima FucI (Higgins, 2011). El gen *fucR* codifica para un regulador transcripcional de la familia DeoR, mientras que *fucA* codificaría una L-fuculosa-1-fosfato aldolasa, la cual escinde la L-fuculosa-1-fosfato en dihidroxiacetona fosfato y L-lactaldehído. Esta última se transcribe en dirección opuesta a los genes *fucIKPU*.

1.2 Genes *fuc* en *E. coli* y otras bacterias intestinales homólogos a los de LGG

En *E. coli*, el L-lactaldehído formado durante el catabolismo de L-fucosa es transformado en 1,2-propanodiol por la acción de la L-1,2-propanodiol oxidoreductasa codificada por el gen *fucO* que se encuentra dentro del *cluster* de los genes *fuc* (Baldoma, 1988). Ningún gen *fucO* homólogo fue encontrado en el *cluster fuc* de LGG, sin embargo dos genes, los cuales codifican proteínas con 50% (LGG_00757) y 42% (LGG_02124) de identidad a FucO de *E. coli* se encuentran presentes en otro locus del cromosoma de LGG. Alternativamente, en *E. coli*, el L-lactaldehído puede ser transformado en ácido láctico por la acción de la enzima lactaldehído deshidrogenasa codificada por el gen *aldA* (Chen et al 1987b). En LGG, el gen LGG_02286 codifica para una proteína con el 32% de identidad para AldA de *E. coli*, la cual posee una actividad aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD(+).

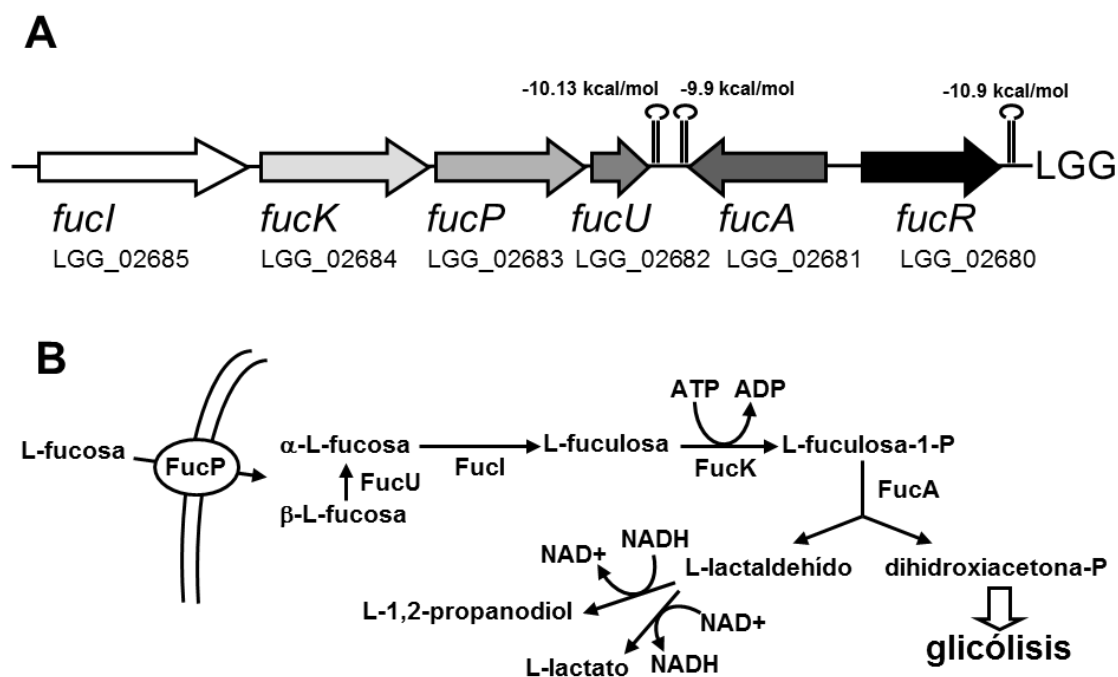


Figura 27. Metabolismo de L-fucosa en LGG. (A) Representación esquemática del operón *fuc*. (B) Vía catabólica propuesta para la utilización de L-fucosa en LGG. El L-lactaldehído puede seguir dos rutas diferentes, llevando a la producción de L-1,2-propanodiol o L-lactato.

Clusters fuc que codifican vías catabólicas similares a la de LGG fueron encontrados en los genomas de algunos comensales intestinales (e.g. *E. coli*) y patógenos, aunque la estructura genética varía y los genes *fucO* y *fucU* no siempre están presentes (Fig. 6). Un segundo tipo de regulador transcripcional, con un dominio N-terminal de unión al DNA y un dominio C-terminal de unión a ligandos, el cual pertenece al dominio de los transportadores ABC de unión a azúcares, sustituye a FucR de la familia DeoR en *Bacteroides* (Hooper et al 1999). Además, los operones *fuc* de las cepas de *S. pneumonie* son más complejos, y estos carecen de genes para codificar la permeasa, que funciona como simporter L-fucosa/H⁺, la cual es reemplazada por genes que codifican transportadores del tipo PTS (*Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems*) de la clase manosa o transportadores de azúcares de tipo ABC. A su vez, contienen genes para glicosil hidrolasas intra y extracelulares (Fig. 6) (Higgins et al 2014).

1.3 Genes *fuc* en otras especies de *Lactobacillus*

La inspección del genoma del resto de especies de *Lactobacillus* reveló que *clusters fuc* se encuentran exclusivamente en algunos aislados de *L. rhamnosus* (por ejemplo las cepas GG, HN001, LRHMDP2 y LRHMDP3), *L. casei* y *L. zeae* (dos cepas secuenciadas: ATCC393 y ATCC15820, respectivamente). De acuerdo a esto, la cepa ATCC15820 fue capaz de fermentar la L-fucosa (datos no mostrados). Por el contrario la cepa ATCC393 no formó ácido a partir de este azúcar (datos no mostrados). Esta inhabilidad se debe probablemente a la presencia de un *frameshift* en el gen *fucK* de esta cepa (resultando en dos genes diferentes anotados: LBCZ_2453 y LBCZ_2454) que dan lugar a L-fuculosa quinasa truncadas carentes de 328 amino ácidos de la región N-terminal y 181 de la región C-terminal, respectivamente. Entre el resto de los lactobacilos, sólo se encontraron algunas secuencias homólogas a los genes *fuc* en los genomas provisionales de especies recientemente descritas: *Lactobacillus shenzhenensis* LY-73T, *Lactobacillus composti* JCM14202 y *Lactobacillus herbinensis* DSM16991. Sin embargo, estos no se encuentran agrupados en un *cluster fuc* identificable. Por lo tanto, esto indica que dentro de las especies de *Lactobacillus*, la presencia de un conjunto de genes *fuc* organizado en una estructura de operón es exclusiva para *L. rhamnosus* y *L. casei/zeae*. A pesar del elevado número de cepas secuenciadas de *Lactobacillus paracasei* (Broadbent et al 2012), no se encontraron genes *fuc* en estas especies, las cuales forman parte del grupo filogenéticamente relacionado *L. casei/paracasei/rhamnosus*.

Otra característica importante de la región *fuc* de LGG es la presencia de un grupo de genes adyacentes (LGG_02687 a LGG_02692) que codifican una L-rhamnulosa-1-fostato aldolasa, L-rhamnosa isomerasa, L-rhamnosa mutarotasa, L-rhamnuloquinasa, una permeasa MFS (*Major Facilitator Superfamily*) y un regulador transcripcional de la familia AraC para la utilización de la rhamnosa (6-deoxi-L-manosa), análogos a la vía catabólica de L-fucosa. Por consiguiente, al parecer esta región cromosomal de LGG contiene genes para el catabolismo de L-deoxi-azúcares.

2 La mutación en genes catabólicos *fuc* impide el crecimiento en L-fucosa

Con el fin de demostrar la implicación de los genes *fuc* en el catabolismo de L-fucosa, se construyeron mutantes en *fucI*, *fucP* y *fucR* (Fig. 28). Las tres cepas mutantes (BL395, BL394 y BL396) generadas mediante un *frameshift*, deleción e inserción en cada uno de sus genes, respectivamente, se cultivaron en medio MRS basal suplementado con L-fucosa y sus fenotipos fueron determinados.

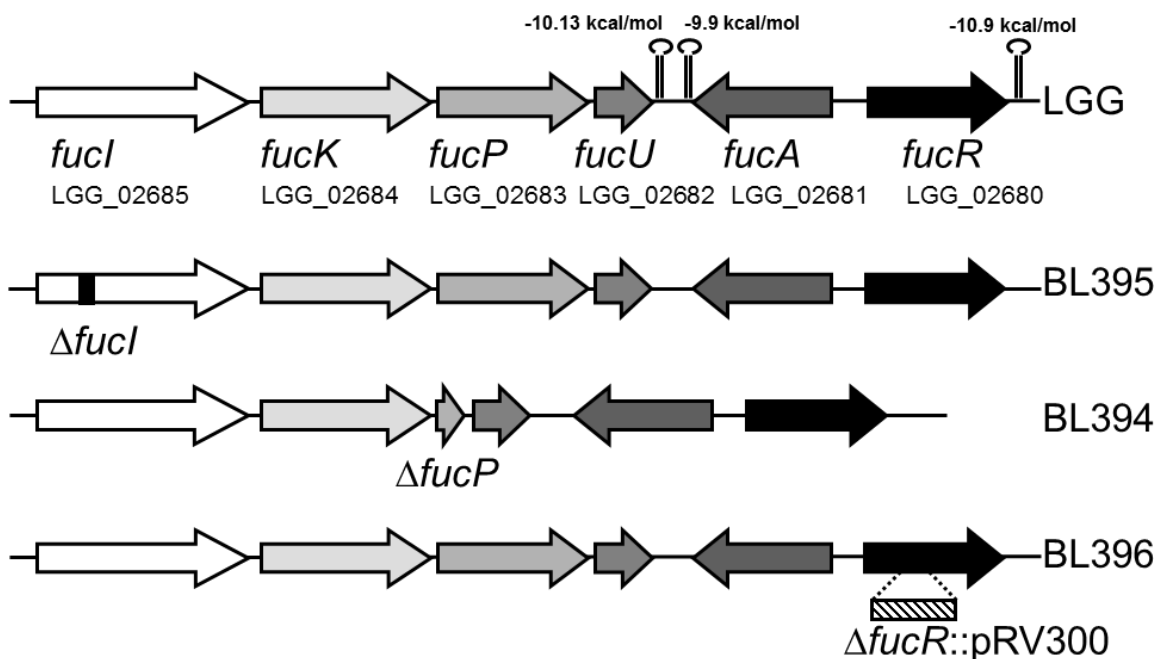


Figura 28. Representación esquemática del operón *fuc* de LGG tipo silvestre y estructuras genéticas de los diferentes mutantes. Las mutaciones en genes de este operón se realizaron mediante *frameshift* (*fucI*; cepa BL395), deleción ($\Delta fucP$; cepa BL394) e inserción con el plásmido pRV300 (*fucR*; cepa BL396).

2.1 Análisis de fenotipos

2.1.1 Crecimiento de LGG con L-fucosa

La cepa mutante *fucI* fue incapaz de acidificar el medio de crecimiento cuando éste era suplementado con L-fucosa, mientras que en el mutante *fucP*, la acidificación fue más baja cuando se comparó con la cepa silvestre. Bajo nuestras condiciones experimentales, LGG mostró un crecimiento lento en MRS basal sin ningún tipo de suplemento, probablemente debido al consumo de fuentes de carbono residuales presentes en este medio complejo, como se ha descrito anteriormente (Landete et al

2013). Cuando el medio fue suplementado con L-fucosa, la cepa silvestre mostró una tasa de crecimiento ($0.114 \pm 0.022 \text{ h}^{-1}$) compatible con la utilización de este monosacárido, mientras que en la cepa mutante *fucI* la tasa de crecimiento ($0.077 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$, $P = 0.048$) fue significativamente más baja que la de la cepa silvestre, con valores de absorbancia igual a los encontrados en MRS sin ninguna fuente de carbono (Fig. 29a). En el mutante *fucP*, la L-fucosa fue aún capaz de mantener un crecimiento reducido ($0.078 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$, $P = 0.048$) (Fig. 29b), sugiriendo que aunque FucP es el transportador principal de L-fucosa en LGG, en la ausencia de esta permeasa, es probable que este azúcar entre a las células por transportadores alternativos menos eficientes. El mutante *fucR*, al igual que la cepa mutante *fucI*, mostró un severo defecto en el crecimiento (Fig. 29c), sugiriendo que este gen estaría codificando para un activador transcripcional del operón *fuc*.

2.2 Crecimiento de LGG con Fuc- α -1,3-GlcNAc

En trabajos anteriores se ha demostrado que *L. casei* BL23 es capaz de utilizar el fucosil-disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc, el cual es transportado por una permeasa específica de la clase PTS e hidrolizado en L-fucosa y GlcNAc por la acción de la α -L-fucosidasa AlfB (Rodríguez-Díaz et al 2012). Sin embargo esta cepa no es capaz de utilizar L-fucosa y solo la porción GlcNAc del Fuc- α 1,3-GlcNAc es catabolizada, mientras que la L-fucosa es expulsada al medio de crecimiento. LGG es también capaz de crecer en 4 mM de Fuc- α 1,3-GlcNAc como se ha descrito en el capítulo II de esta Tesis (Fig. 22) y, de acuerdo con la presencia de una vía catabólica de L-fucosa, este monosacárido no fue encontrado en los sobrenadantes. Por el contrario, en comparación con la cepa silvestre, los mutantes LGG *fucI* y *fucR*, alcanzaron una OD más baja cuando se cultivaron con Fuc- α 1,3-GlcNAc como fuente de carbono fermentable (Fig. 30a y 30c).

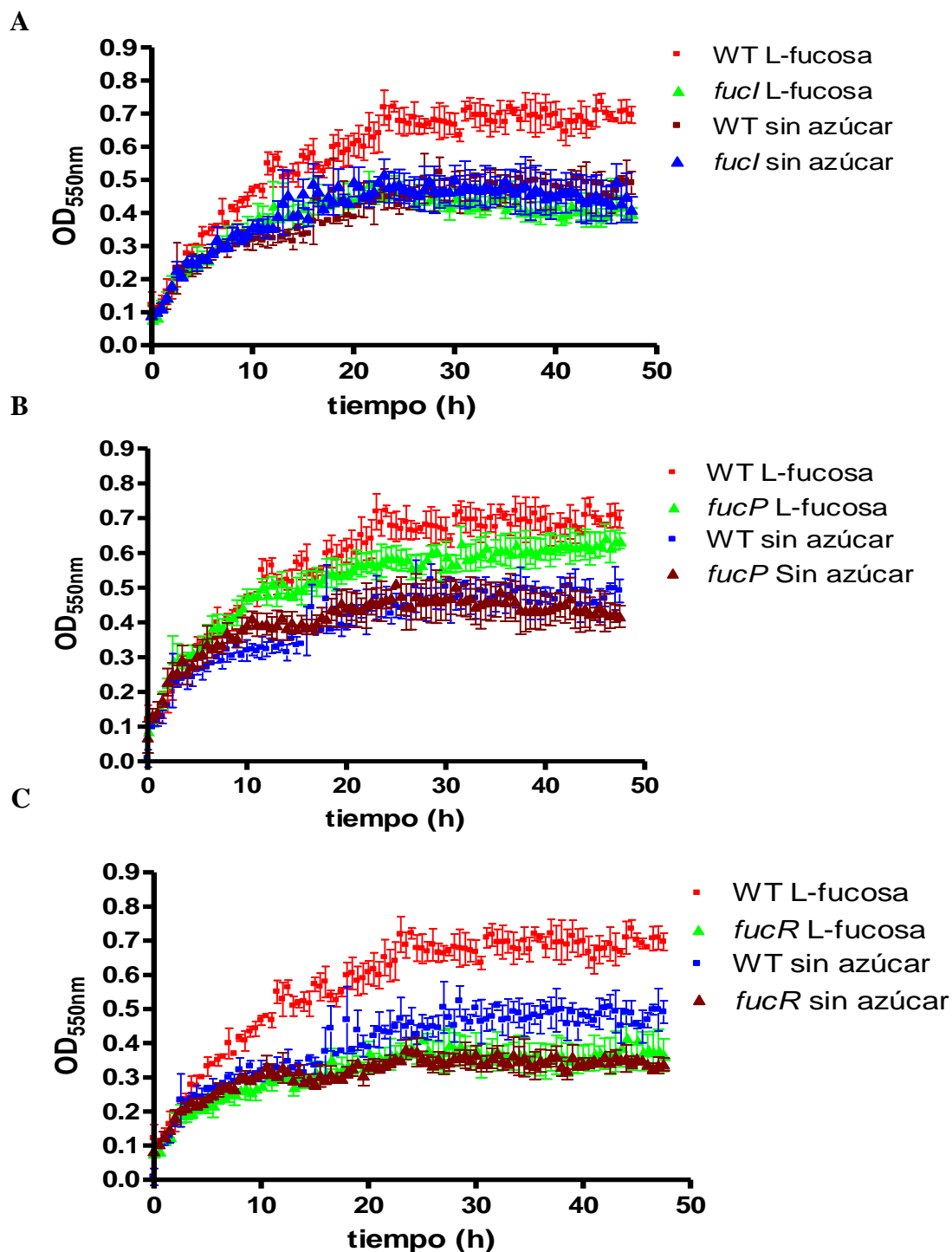


Figura 29. Crecimiento de LGG en L-fucosa. (A) mutante *fucI*; (B) mutante *fucP*; (C) mutante *fucR*. En todos los gráficos, el perfil de crecimiento de la cepa silvestre (WT) es representado para una mejor comparación. La concentración de L-fucosa fue del 0.5% (30 mM). Los datos presentados son los valores promedio de un mínimo de tres réplicas. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

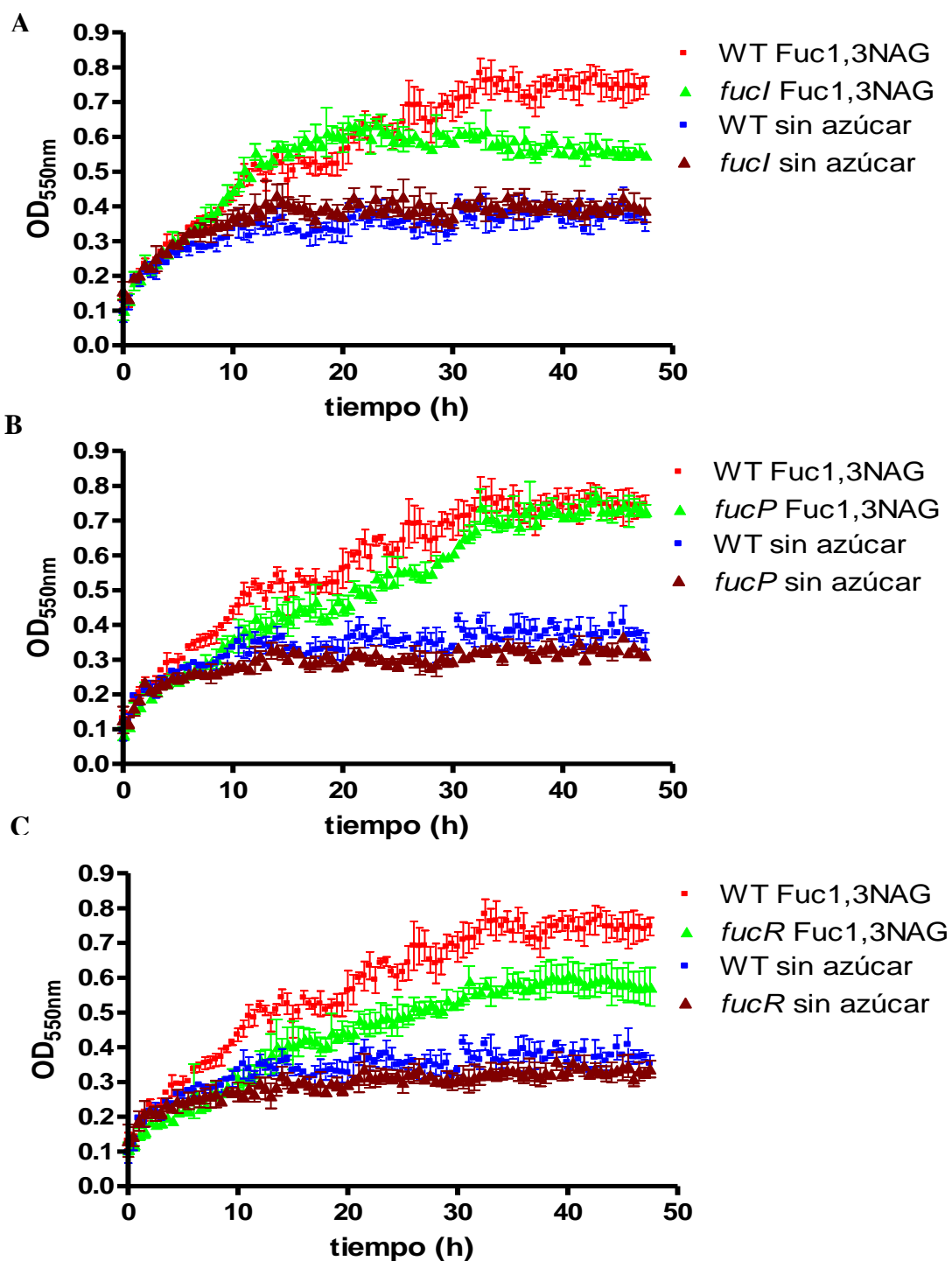


Figura 30. Crecimiento de LGG en Fuc- α -1,3-GlcNAc (Fuc1,3NAG). (A) mutante *fucI*; (B) mutante *fucP*; (C) mutante *fucR*. En todos los gráficos, el perfil de crecimiento de la cepa silvestre (WT) es representado para una mejor comparación. La concentración de Fuc- α -1,3-GlcNAc fue de 4 mM. Los datos presentados son los valores promedio de un mínimo de tres réplicas. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

En estos experimentos, $110\pm 6\%$ (mutante *fucI*) y $70.8\pm 1.4\%$ (mutante *fucR*) de la L-fucosa teórica proveniente de Fuc- α -1,3-GlcNAc (4 mM) fue detectada en los sobrenadantes bacterianos en la fase estacionaria (Fig. 31). Esto era consistente con el hecho de que solo la GlcNAc del disacárido fue eficientemente metabolizada en estos mutantes. El mutante *fucP* deficiente de la permeasa de L-fucosa, mostró un patrón de crecimiento en Fuc- α 1,3-GlcNAc similar al del tipo silvestre (Fig. 30b) y solo $3.1\pm 0.3\%$ de la L-fucosa teórica generada del disacárido fue detectada en los sobrenadantes. Estos datos indicaron que la L-fucosa intracelularmente generada, posiblemente por la acción del homólogo de AlfB (codificado por LGG_02652), fue metabolizada, y que el transportador FucP no es necesario para este proceso.

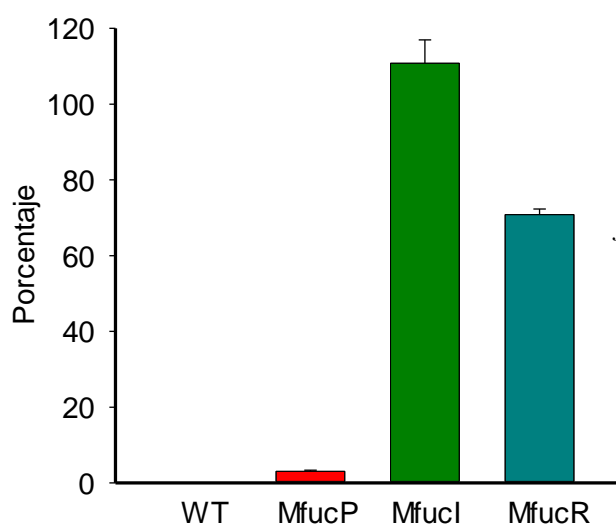


Figura 31. Análisis de los contenidos de L-fucosa en los sobrenadantes de *L. rhamnosus* cepa silvestre (WT) y mutantes *fucP* (MfucP), *fucI* (MfucI) y *fucR* (MfucR) cultivadas con el disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc a 4 mM. Los datos presentados son los valores promedio de un mínimo de tres réplicas. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

3 Expresión de los genes *fuc* en LGG en presencia de L-fucosa

El análisis de la expresión génica del operón *fuc*, reveló que todos estos genes fueron inducidos por la presencia de L-fucosa. Los niveles variaron desde valores bajos (12 veces para el gen *fucR*) hasta muy altos (9400 veces para el gen *fucU*), obteniéndose valores de expresión intermedios para los demás genes (*fucI*, *fucK*, *fucP* y *fucA*). Sin embargo, la presencia de glucosa además de L-fucosa causó una fuerte represión por catabolito de todos los genes *fuc* (Fig. 32). La expresión relativa se determinó con respecto a la expresión de estos mismos genes cuando la cepa fue cultivada en medio con glucosa como fuente de carbono fermentable.

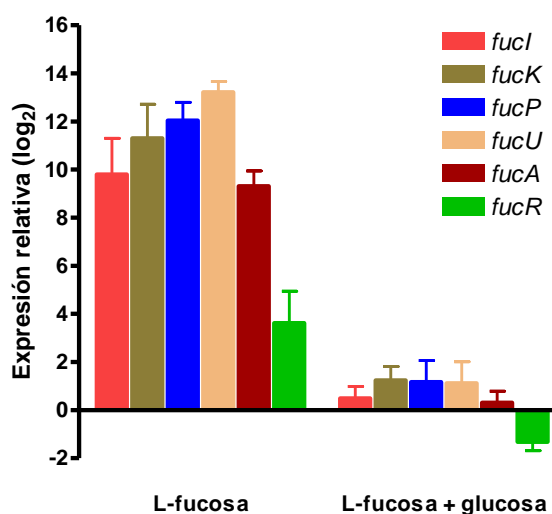


Figura 32. Expresión de los genes *fuc* en LGG cultivada en L-fucosa. La cepa silvestre fue crecida con 0.5% de L-fucosa o 0.5% de L-fucosa más 0.2% de glucosa, y la expresión de los genes *fuc* fue determinada por RT-qPCR. La expresión relativa hace referencia a los valores de las células bacterianas cultivadas con 0.5% de glucosa. Los genes de LGG *pyrG* (LGG_02546), *recG* (LGG_01660) y *leuS* (LGG_00848) fueron usados como referencia. Los datos representados son los valores medios basados en al menos seis réplicas técnicas de dos réplicas biológicas independientes. Las barras indican las desviaciones estándar.

4 Expresión de los genes *fuc* en LGG en presencia de Fuc- α 1,3-GlcNAc

De acuerdo con los resultados de RT-qPCR, el crecimiento con Fuc- α 1,3-GlcNAc indujo la expresión de los genes *fuc*, aunque el uso de concentraciones más bajas del disacárido (4 mM) provocó una bajada en los niveles de expresión (Fig. 33) comparada con la expresión tras el crecimiento con el 0.5% (30 mM) de L-fucosa (Fig. 32). También, bajo estas condiciones el gen *fucR* mostró una desregulación en comparación con las células que crecieron con glucosa. En la cepa mutante $\Delta fucP$, la expresión de los genes *fuc* después del crecimiento con Fuc- α 1,3-GlcNAc fue comparable con lo encontrado en la cepa silvestre (Fig. 33), apoyando además el hecho de que *fucP* es dispensable para el metabolismo de Fuc- α 1,3-GlcNAc. En los mutantes *fucI* y *fucR* no se observó inducción después del crecimiento en Fuc- α 1,3-GlcNAc (Fig. 33), lo cual estaba de acuerdo con la excreción observada de L-fucosa en estas cepas cuando las células eran cultivadas con el fucosil-disacárido.

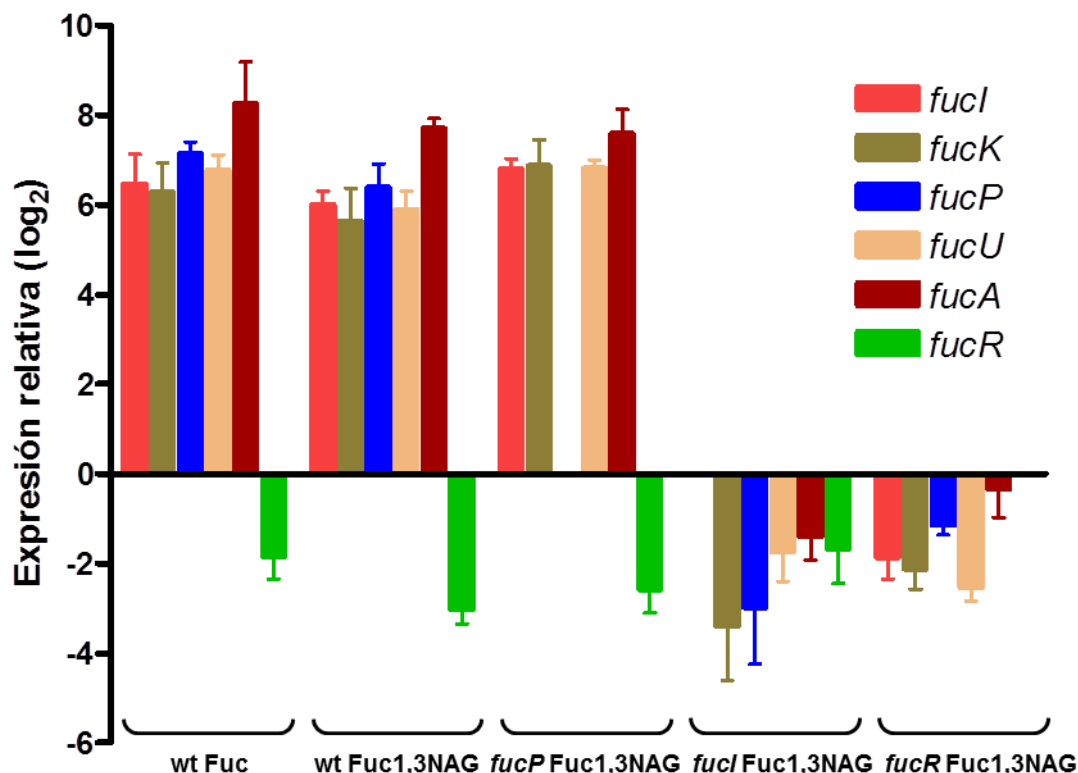


Figura 33. Expresión de genes *fuc* en LGG cultivado en Fuc- α -1,3-GlcNAc (Fuc1,3NAG). Las cepas silvestre (wt), *fucP*, *fucI* y *fucR* fueron cultivadas en presencia de 4 mM de Fuc- α 1,3-GlcNAc y la expresión de los genes *fuc* fue monitoreada por RT-qPCR. Para cada cepa bacteriana, la expresión relativa hace referencia a los valores de la misma cepa cultivada con 4 mM de glucosa. La expresión en la cepa silvestre en presencia de 4 mM de L-fucosa también se muestra en esta gráfica. Los genes de LGG *pyrG* (LGG_02546), *recG* (LGG_01660) y *leuS* (LGG_00848) fueron usados como referencia. Los datos representados son los valores medios basados en al menos seis réplicas técnicas de dos réplicas biológicas independientes. Las barras indican las desviaciones estándar.

5 Regiones promotoras del operón *fuc*

De acuerdo a la estructura del *cluster* de genes *fuc* en LGG, al menos tres promotores diferentes son necesarios para la transcripción de todos los genes (Fig. 34). Nuestros resultados indican que los tres promotores serían sensibles a L-fucosa y que FucR autorregula su propia transcripción, aunque su gen mostró un bajo nivel de inducción comparado con el resto de los genes *fuc* (Fig. 32). Para determinar mecanismos de regulación de los genes *fuc*, las secuencias de estos promotores de 218 y 153 pb correspondiendo a la región 5' de *fucI* y a la región intergénica *fucR-fucA*, respectivamente, fueron amplificadas. La purificación de la proteína FucR recombinante

fue muy problemática. A pesar de esto se obtuvo cantidad soluble suficiente para realizar algunos experimentos de retardo en gel. FucR fue capaz de unirse, aunque con muy poca eficiencia, a la región intergénica promotora de los genes *fucR-fucA* como se muestra la Fig. 35, sugiriendo así su papel regulatorio directo en la expresión de los genes *fuc*, tal y como indican los datos genéticos. FucR no fue capaz de interactuar con la región promotora del gen *fucI*, indicando posiblemente la falta de la molécula efectora co-inductora para la unión en estos ensayos *in vitro*.

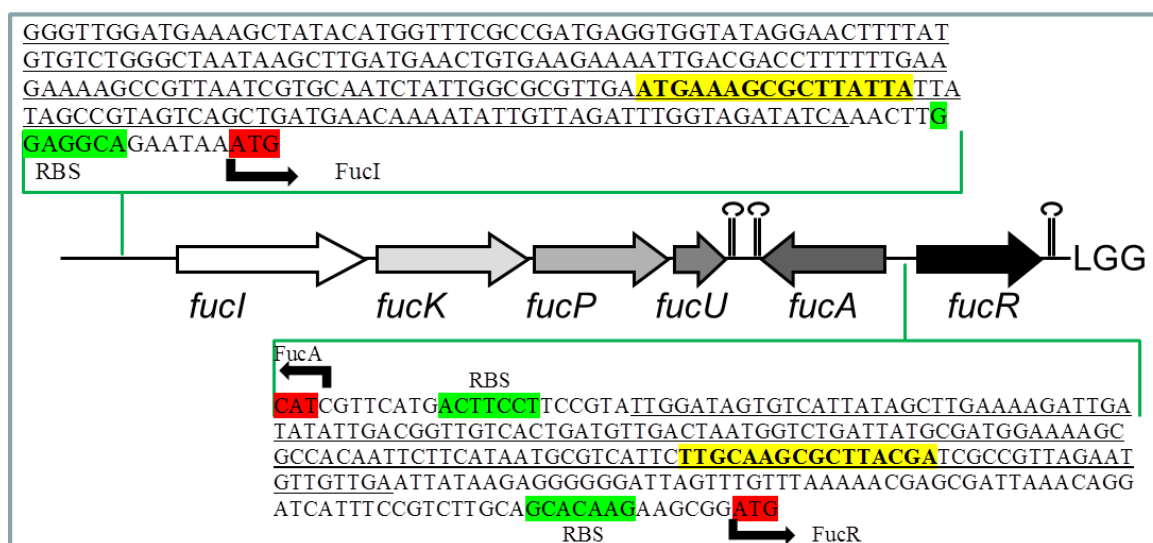


Figura 34. Representación esquemática del operón *fuc* con las secuencias de las regiones promotoras (*fucA-fucR* y *fucI*) en LGG. En cada una de las secuencias se resalta los codones de inicio (rojo), los sitios putativos de unión al ribosoma; RBS (verde) y los sitios de elementos sensibles a catabolito; *cre* (amarillo). La región subrayada corresponde a la región amplificada por PCR para cada una de las secuencias.

La presencia de glucosa además de L-fucosa causó una fuerte represión por catabolito de todos los genes *fuc*, cuyos niveles de expresión fueron cercanos a los encontrados durante el crecimiento en glucosa. De acuerdo con esta observación, sitios de elementos sensibles a catabolito (*cre*; *catabolite responsive element*), los cuales se ajustaban a la secuencia definida para *Lactococcus lactis* (Zomer et al 2007), se encontraron por encima del gen *fucI* (⁻⁵⁷ATGAAAGCGCTTATTA) o en la región intergénica *fucA-fucR* (⁻⁸⁷TTGCAAGCGCTTACGA; el número es relativo a *fucR*) (Fig. 34). Estos sitios son los blancos para la unión del regulador transcripcional global CcpA, el cual controla la represión por catabolito en bacterias Gram-positivas de bajo contenido en G+C (Deutscher et al 2014).

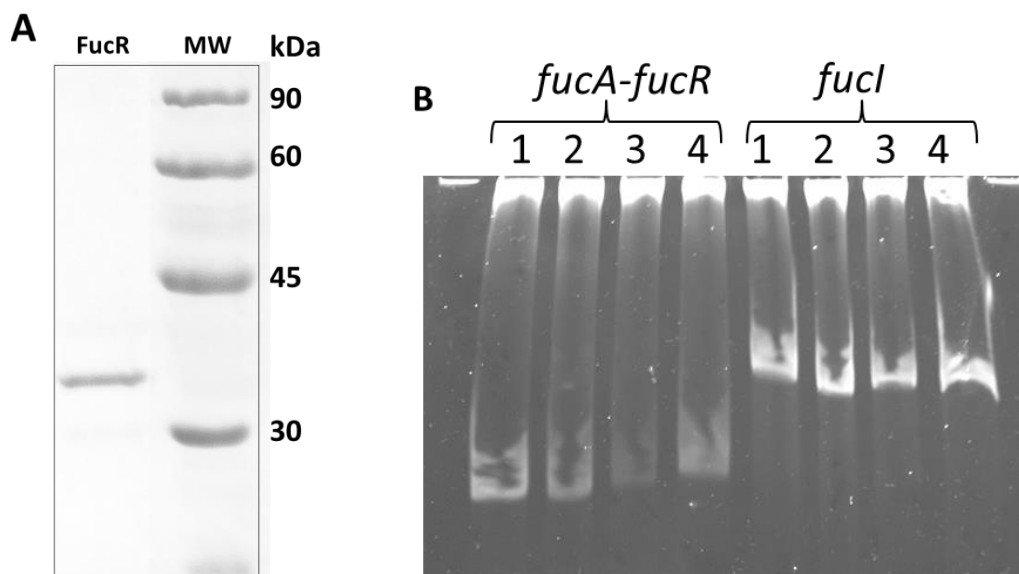


Figura 35. Análisis de la unión de la proteína FucR a las regiones promotoras del operón *fuc* (*fucA-fucR* y *fucI*) en LGG. (A) Análisis la proteína 6X(His)FucR purificada mediante SDS-PAGE y teñido con azul de comassie. Los valores a la derecha corresponden a peso molecular (MW) de patrones de proteína. FucR migra como una única banda con el peso molecular esperado (35 kDa). (B) Experimento de retardo en gel con diferentes cantidades de proteína FucR (0, 25, 50 y 75 ng) en los carriles 1, 2, 3 y 4, respectivamente para cada una de las regiones promotoras (50 ng de DNA). El análisis fue realizado en gel de acrilamida/bisacrilamida (19:1/29:1) al 6% y teñido con bromuro de etidio.

6 El catabolismo de L-fucosa permite la producción de 1,2-propanodiol en LGG

El análisis de los sobrenadantes de la cepa silvestre evidenció la producción de 1,2-propanodiol cuando las células fueron cultivadas con L-fucosa bajo condiciones de anaerobiosis (Tabla 18). Este compuesto no fue detectado en los sobrenadantes de células que crecieron en presencia de glucosa. Esto confirmó que en LGG, el L-lactaldehído formado por la acción de la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa a partir de L-fuculosa-1-fosfato, podría ser metabolizado por una L-1,2-propanodiol oxidoreductasa como ocurre en *E. coli*. La producción de lactato a partir de L-fucosa bajo condiciones anaeróbicas fue más baja en comparación con las células cultivadas en glucosa. Las condiciones aeróbicas durante el crecimiento con glucosa no dieron lugar a un fuerte impacto en la producción de ácido láctico. Además, estas condiciones no favorecieron la utilización de L-fucosa, la cual fue muy ineficiente e incompleta después de 24 h.

Tabla 18. Formación de productos y características de crecimiento de LGG con L-fucosa o D-glucosa bajo diferentes condiciones

	anaerobiosis ^a		aerobiosis ^a	
	L-fucosa	D-glucosa	L-fucosa	D-glucosa
1,2-Propanodiol ^b	10.0 ± 0.1	ND ^c	1.3 ± 0.1	ND
Lactato ^b	10.0 ± 1.3	33.8 ± 1.3	0.7 ± 0.1	35.7 ± 6.7
Azúcar residual ^b	0.10 ± 0.06	ND	12.73 ± 0.63	ND
OD _{550nm} final	1.20 ± 0.14	1.75 ± 0.07	0.75 ± 0.06	1.65 ± 0.07
pH final	5.36 ± 0.01	5.02 ± 0.01	7.09 ± 0.14	5.09 ± 0.01

^aEl crecimiento fue llevado a cabo en medio MRS basal suplementado con 20 mM de L-fucosa o 20 mM de D-glucosa durante 24 horas a 37°C; ^bLos resultados están presentados en milimolar (mM); ^cND: no detectado.

Discusión

La cepa *L. rhamnosus* GG (LGG) es ampliamente usada como probiótico y tiene la habilidad de sobrevivir y colonizar transitoriamente el tracto gastrointestinal en modelos animales y en humanos (Kankainen et al 2009, Lebeer et al 2010). En este contexto la presencia de genes en LGG involucrados en la utilización de glicanos derivados del hospedador constituye una ventaja competitiva para que esta cepa persista en el intestino. LGG codifica para aproximadamente 40 glicosidasas putativas, muchos transportadores de carbohidratos y enzimas catabólicas que le proporcionan posiblemente una ventaja para la utilización de las fuentes de carbohidrato de la mucosa (Douillard et al 2013, Kankainen et al 2009). Así, LGG es capaz de crecer con mucina como fuente de carbono (Sanchez et al 2010) y posee factores extracelulares que regulan la producción de mucina en el epitelio del colon (Wang et al 2014). Algunos autores han descrito que LGG, aún siendo capaz de usar glicanos derivados de las mucosas, no era capaz de fermentar L-fucosa (Sanchez et al 2010). Sin embargo, resultados obtenidos por otros (Douillard et al 2013) y nuestros resultados muestran que LGG fermenta L-fucosa. La explicación para esto puede derivar de las diferencias entre aislados de LGG de diferentes laboratorios. Así, se ha reportado que aislados de LGG de diversos productos probióticos comerciales presentan heterogeneidad en las secuencias de sus genomas, en las cuales se incluye mutaciones puntuales y deleciones de grandes porciones del cromosoma (Sybesma et al 2013).

En este trabajo se estableció que los genes *fuc* presentes en el genoma de LGG son los responsables de la capacidad fermentativa de L-fucosa observada en esta cepa. La presencia de genes *fuc* específicos, el análisis de mutantes y el hecho de que 1,2-propanodiol fuera encontrado en el sobrenadante de cultivos del crecimiento de LGG en L-fucosa, apoya la idea de que la utilización de este azúcar en LGG sigue la misma vía que está descrita en *E. coli*. Dependiendo de las condiciones de crecimiento (anaerobio o aerobio), *E. coli* dirige el lactaldehído resultante del catabolismo de L-fucosa hacia 1,2-propanodiol (actividad FucO) o lactato (actividad AldA) (Baldoma & Aguilar 1988). Aunque los genes de LGG responsables para el metabolismo del lactaldehído aún no han sido identificados, es posible que el estado redox dirija su metabolismo hacia estos dos compuestos en *L. rhamnosus*. Sin embargo, pudimos comprobar que el

catabolismo de L-fucosa sólo era favorecido bajo condiciones anaeróbicas, lo cual sugiere que la conversión de lactaldehído a L-lactato no es eficiente en esta cepa.

La utilización de fuentes de carbohidratos típicamente encontrados en el nicho gastrointestinal es una característica de miembros de la microbiota intestinal, tales como *Bacteroides* o *Bifidobacterium*, pero también de *Lactobacillus* intestinales. Consecuentemente, los genomas de especies tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii* o *Lactobacillus gasseri*, contienen genes que codifican para muchas vías catabólicas de carbohidratos, aunque carecen de sialidasas, α -fucosidasas, o N-acetilglucosaminidasas, las cuales son típicas de otros comensales intestinales o patógenos (Altermann et al 2005, Azcarate-Peril et al 2008, Pridmore et al 2004). Al respecto, el grupo *L. casei/L. paracasei/L. rhamnosus* presenta características únicas, ya que estas especies son los únicos lactobacilos donde α -L-fucosidasas y genes para la utilización de L-fucosa están presentes. Un reciente análisis de 100 cepas de *L. rhamnosus* aislados de varias fuentes mostró que pueden ser agrupadas en base a su capacidad fermentativa de azúcares (Douillard et al 2013). Las cepas con un fenotipo positivo para la fermentación de L-fucosa provenían de los hábitats intestinal y oral, mientras que las cepas de origen lácteo son L-fucosa negativo. Esto concuerda con la hipótesis de que los *Lactobacillus* evolucionaron por la pérdida y adquisición de genes impulsada por los nichos particulares que habitan. En algunos casos, esto resultó en la reducción del genoma después de la adaptación a ambientes menos complejos, tales como la leche (Broadbent et al 2012). Queda por esclarecer si los genes *fuc* de *L. rhamnosus* estuvieron presentes en el ancestro del grupo *L. casei/L. paracasei/L. rhamnosus* y se perdieron más recientemente en *L. paracasei* y en algunas cepas de *L. rhamnosus* o tienen su origen en una adquisición reciente. Interesantemente, el locus *fuc* de LGG está localizado en una región del genoma la cual parece ser específica para el catabolismo de L-deoxi azúcares, ya que también contiene un *cluster* con genes (*rha*) putativamente involucrado en el catabolismo de L-rhamnosa, el azúcar del cual se ha derivado el nombre de la especie. Sin embargo, datos previos y resultados propios (datos no mostrados) evidenciaron que la cepa LGG no es capaz de utilizar L-rhamnosa (Douillard et al 2013, Kankainen et al 2009).

Los genes *fuc* de LGG están sujetos a una regulación dual: la inducción por el crecimiento en L-fucosa activada por FucR y la represión catabólica que probablemente depende del regulador transcripcional CcpA. En *B. thetaiotaomicron*, la L-fucosa es el

inductor de los genes *fuc* a través de su unión al represor transcripcional de la superfamilia GntR (Hooper et al 1999). El análisis transcripcional durante el crecimiento de LGG con Fuc- α -1,3-GlcNAc, en el cual se conduce a la generación intracelular de L-fucosa, excluye el hecho de que este azúcar sea el efector de FucR, ya que los genes *fuc* no fueron inducidos en el mutante deficiente en el gen que codifica para una proteína esencial en los primeros pasos de la ruta catabólica (*fucI*). Por otra parte, FucP no participa en la regulación de los genes *fuc*, ya que la mutación del gen que codifica para esta permeasa no evitó la expresión del resto de genes catabólicos de L-fucosa cuando las cepas se cultivaron en presencia de Fuc- α -1,3-GlcNAc. Estudios genéticos en *E. coli* señalaron que la fuculosa-1-fosfato podría funcionar como la molécula inductora del operón *fuc* a través de la proteína reguladora FucR, aunque no existen datos experimentales al respecto. La misma situación probablemente exista para *L. rhamnosus*, ya que el regulador de ambas especies pertenece a la misma clase (DeoR). Los sitios de unión de FucR al DNA no han sido experimentalmente establecidos para *E. coli* u otras bacterias. En enterobacterias, una secuencia consenso para la unión puede ser derivada de los alineamientos de varios promotores *fuc* resultando en una secuencia repetida invertida e imperfecta de 36 pb. En *S. pneumoniae* la regulación de los genes *fuc* ha sido recientemente estudiada, encontrándose que la secuencia 5'-ATTTGAACATTATTCAAGT-3' de la zona promotora es la responsable de la inducción mediada por FucR (Manzoor et al 2015). La inspección de los promotores *fuc* de LGG no reveló secuencias similares, pero dos repeticiones en tándem de la secuencia TGAAGAAA, separadas por 14 pb, están presentes en el promotor *fucI*, y otra secuencia similar está presente en la región intergénica *fucA-fucR*. Los ensayos de retardo en gel con FucR, sin aún ser concluyente, indican que al menos este regulador se estaría uniendo débilmente a la región intergénica promotora de *fucR-fucA*, activando de esta manera su propia expresión y la del gen adyacente (*fucA*). Aunque tal efecto no fue observado para la región promotora de *fucI*, es improbable que FucR no se una a dicha región. La no inclusión de fuculosa-1-fosfato (no disponible comercialmente) en nuestros ensayos de retardo en gel puede ser la causa de la baja o falta de unión de FucR a los promotores *fuc* de LGG *in vitro*.

L. casei BL23 y LGG, junto con las cepas estudiadas en el capítulo II de este trabajo, son las únicas cepas de *Lactobacillus* descritas hasta ahora que tienen capacidad para usar oligosacáridos fucosilados (Rodríguez-Díaz et al 2011, Rodríguez-Díaz et al 2012).

L. casei BL23 y LGG comparten el mismo set de α -fucosidasas (AlfA, AlfB y AlfC), las cuales pueden actuar en oligosacáridos específicos derivados de glicoconjugados presentes en las superficies de las mucosas, tales como antígenos de Lewis^X, así como también en oligosacáridos de la leche humana (Rodríguez-Díaz et al 2011). Adicionalmente, el operón *alfRB-EFG*, responsable del transporte e hidrólisis de Fuc- α -1,3-GlcNAc, está presente en ambas cepas (Rodríguez-Díaz et al 2012). Sin embargo BL23 no posee una vía para el catabolismo de L-fucosa y, similar a los mutantes de LGG en *fucI* y *fucR* excreta la porción de L-fucosa de Fuc- α -1,3-GlcNAc. Una mínima cantidad de L-fucosa derivada de este disacárido fue detectada en los sobrenadantes del mutante *fucP* de LGG (3%), mientras que este azúcar estaba totalmente ausente en los sobrenadantes de la cepa silvestre cultivada bajo las mismas condiciones. Esto sugiere que parte de la L-fucosa generada intracelularmente difunde al medio extracelular y que, en ausencia de FucP, este azúcar liberado no puede volver a entrar a la célula para que sea metabolizado. De acuerdo con el papel activador de FucR, no se detectó inducción de los genes *fuc* en el mutante *fucR* cuando este fue cultivado con el disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc. En este mutante, solo el 30% de la L-fucosa intracelular derivada del disacárido fue utilizada, lo cual sugiere que la transcripción basal de los genes catabólicos *fuc* en la ausencia del activador FucR, permite un metabolismo limitado de L-fucosa cuando este azúcar es producido intracelularmente.

Bacterias intestinales de los generos *Bifidobacterium* y *Bacteroides* están bien adaptadas para aprovechar las fuentes de carbohidratos intestinales, y poseen α -L-fucosidasas que les permiten obtener L-fucosa de la mucosa (Sakurama et al 2012b, Sela et al 2012). Sin embargo, comensales intestinales, tales como *E. coli*, que no expresan α -L-fucosidasas dependen de otros grupos de bacterias para liberar la L-fucosa de glicanos que contienen este azúcar. Los genes *fuc* de LGG aquí estudiados probablemente representan una adaptación de esta cepa para habitar en el nicho particular del tracto gastrointestinal. Sin embargo, puesto que las α -L-fucosidasas de LGG son enzimas intracelulares, esta cepa probablemente depende de las actividades de fucosidasas y glicosidasas de otros miembros de la microbiota intestinal para proveerse de L-fucosa y fucosil-oligosacáridos en el intestino.

CAPITULO IV

**Análisis molecular y funcional del operón implicado en la
utilización del glicoaminoácido fucosil- α -1,6-N-
acetilglucosamina-asparagina en *Lactobacillus casei* BL23**

Análisis molecular y funcional del operón implicado en la utilización del glicoaminoácido fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina en *Lactobacillus casei* BL23

1 Operón *alf2* de *L. casei* BL23

Un *cluster* de genes que se encuentra anotado en el genoma de *L. casei* BL23 (genes LCABL_29280 a LCABL_29340) y que comprende el gen que codifica para la α -L-fucosidasa AlfC fue identificado y denominado operón *alf2* (Fig. 36).

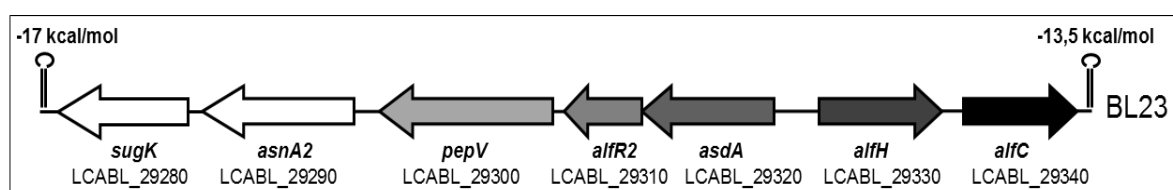


Figura 36. Representación esquemática del operón *alf2* de *L. casei* BL23

Dos de estos genes han sido previamente descritos, *alfH* (LCABL_29330) y *alfC* (LCABL_29340), y codifican para una hipotética permeasa MFS (*Major Facilitator Superfamily*) y la α -L-fucosidasa AlfC, respectivamente (Rodríguez-Díaz et al 2011). Sin embargo, en cuanto a la función biológica de estas dos proteínas, solo se ha determinado parcialmente para AlfC, evidenciando una alta actividad de hidrólisis del disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc (Rodríguez-Díaz et al 2011). Los demás genes de este operón: *sugK* (LCABL_29280), *asnA2* (LCABL_29290), *pepV* (LCABL_29300), *alfR2* (LCABL_29310) y *asdA* (LCABL_29320) se encuentran en dirección opuesta a los genes *alfH* y *alfC* y están anotados como una quinasa de carbohidrato, una glicosilasparaginasa, una peptidasa V, un regulador transcripcional y una aspartato descarboxilasa/aminotransferasa, respectivamente. Las actividades de estas enzimas putativas podrían estar implicadas en el catabolismo de componentes fucosil-glicoproteicos presentes en las glicoproteínas de la leche y en la mucosa humana. Con el objeto de analizar si *L. casei* BL23 era capaz de fermentar compuestos fucosilados presentes en los glicanos que constituyen la *N*-glicosilación proteica, se cultivó en presencia de los compuestos sintetizados en el capítulo I de esta Tesis: fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina (Fuc-GlcNAc-Asn), fucosil-glucosa (Fuc-Glu), fucosil-galactosa (Fuc-Gal) y fucosil-*N,N'*-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ) (Figs. 14 y 17). Los

resultados mostraron que *L. casei* BL23 era capaz de fermentar únicamente Fuc-GlcNAc-Asn (Fig. 37). Un análisis de los sobrenadantes confirmó la presencia de los fucosil-oligosacáridos sin consumir, y en el caso del cultivo con Fuc-GlcNAc-Asn estaba presente únicamente la L-fucosa, ya que *L. casei* BL23 como se ha descrito en los capítulos anteriores no es capaz de metabolizarla y la excreta al exterior. Curiosamente, aunque GlcNAc-Asn es la fracción del glicoaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn catabolizado; cuando se utiliza como fuente de carbono en el medio de cultivo no es utilizada por esa cepa (Fig. 37).

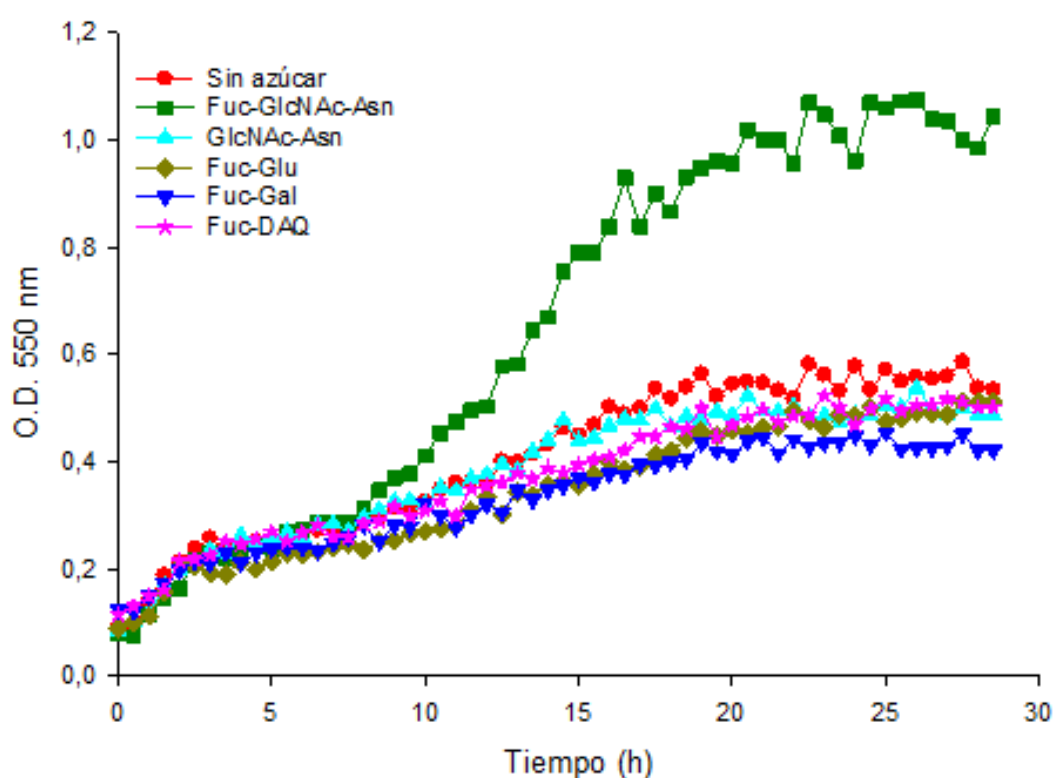


Figura 37. Curva de crecimiento de *L. casei* BL23 en presencia de diferentes FUS a 4 mM. Los cultivos se realizaron en medio MRS basal sin ninguna fuente de carbono (sin azúcar), con fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina (Fuc-GlcNAc-Asn), *N*-acetilglucosamina-asparagina (GlcNAc-Asn), Fucosil-glucosa (Fuc-Glu), Fucosil-galactosa (Fuc-Gal) o fucosil-*N,N'*-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ) como única fuente de carbono.

2 Genes homólogos a los del operón *alf2* presente en otras especies

Un análisis de secuencias permitió detectar que este operón se encuentra bien conservado en el grupo *L. casei/L. paracasei/L. rhamnosus*, tanto en contenido de genes

como en su estructura, evidenciando una vez más la estrecha relación filogenética que existe entre estas especies (Fig. 38). Sin embargo, *L. rhamnosus* carece del gen que codifica para la aspartato descarboxilasa/aminotransferasa (*asdA*; LCABL_29320).

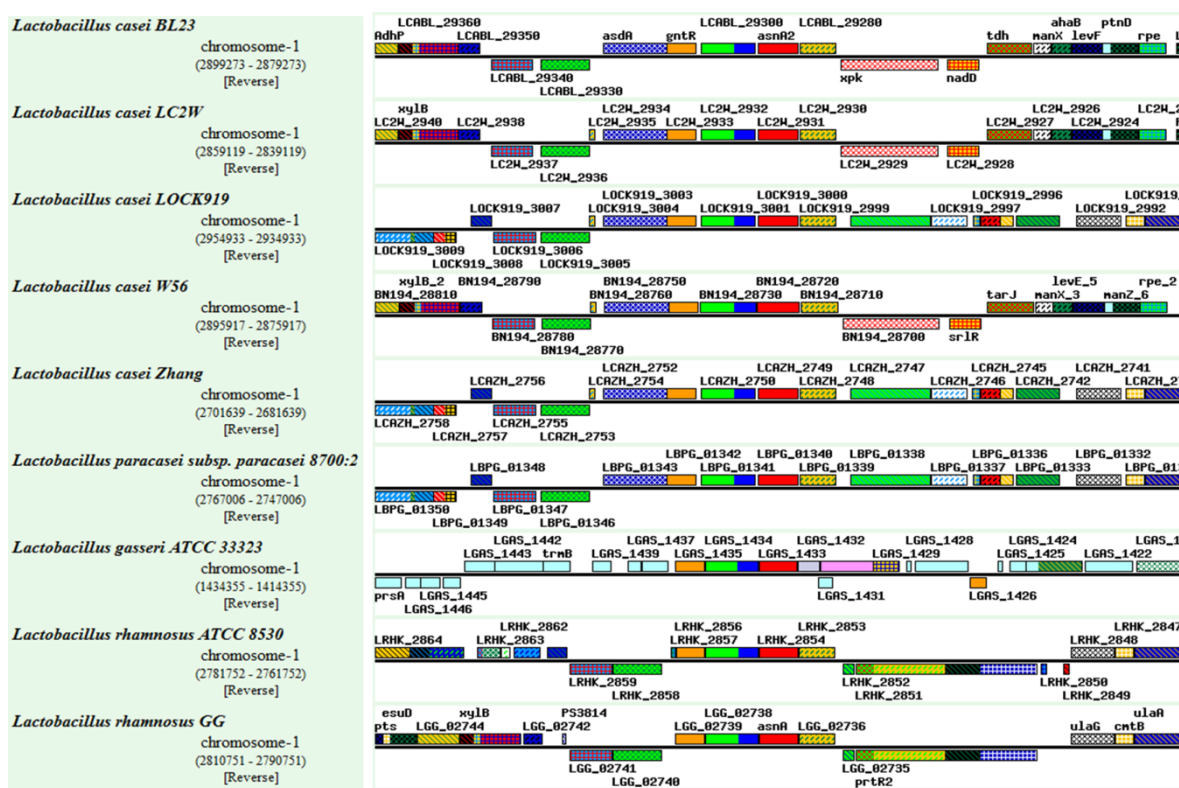


Figura 38. Análisis comparativo de la estructura génica del operón *alf2* en el grupo *L. casei*/*L. paracasei*/*L. rhamnosus*. Cada uno de los genes representados se muestra por colores. ■ *sugK* , ■ *asnA2* , ■ *pepV* , ■ *alfR2* , ■ *asdA* , ■ *alfH* y ■ *alfC*. Este esquema fue extraído tras la búsqueda de homología de los genes *alfC2* en MBGD (*Microbial Genome Database for Comparative Analysis*).

A pesar de que la mayoría de los genes de este operón también están presentes en otras especies de bacterias; estos se encuentran distribuidos a lo largo de sus genomas sin formar un *cluster* como ocurre en *L. casei*. Sin embargo, el análisis de las secuencias proteicas homólogas (70-40% de identidad), permitió observar que en *Lactobacillus gasseri* (ATCC 33323), así como en cepas de *Enterococcus faecalis*, los genes que codifican para la glicosilparaginasa, peptidasa V y el regulador transcripcional, se encuentran agrupados en un pequeño *cluster* siguiendo el mismo patrón estructural que se encuentra en *L. casei*. Estos mismos genes (*asnA2*, *pepV* y *alfR2*) agrupados, pero con una organización estructural diferente también se observaron en *Lactobacillus sakei*, cuyas homología respecto a las proteínas de *L. casei* fueron del 67, 43 y 40% respectivamente. Agrupaciones de solo dos genes homólogos de este operón

(*AsnA2/pepV* y *AsnA2/alfR2*) fueron encontradas en *Clostridium difficile* y *Carnobacterium maltaromaticum*, respectivamente, cuyas secuencias de aminoácidos deducidas presentaban una identidad de aproximadamente el 60% con respecto a las secuencias de *L. casei*. Es de destacar que en la mayoría de las especies que contienen la agrupación de los genes que codifican para la glicosilasparaginasa, la peptidasa V y el regulador transcripcional, a excepción de las que pertenecen al grupo *L. casei/L. paracasei/L. rhamnosus*, se observó un gen conservado adyacente al operón que codifica para uno de los componentes (IIC) de un sistema PTS de la familia lactosa/celobiosa. Esto sugiere que en este grupo de bacterias (*L. gasseri*, *L. sakei*, *E. faecalis*, *C. difficile* y *C. maltaromaticum*), los substratos catabolizados por este operón podrían ser también componentes de glicoproteínas o glicopéptidos. El hecho de que la estructura génica (bien sea parcial o total) se encuentre conservada en todo este grupo de bacterias, incluidas las especies *L. casei/L. paracasei/L. rhamnosus*, sugiere que estarían compartiendo un nicho particular, donde los productos de la expresión génica tendrían funciones muy similares, lo cual permitiría el aprovechamiento de substratos específicos como son las glicoproteínas.

3 Análisis fenotípico de los mutantes del operón *alf2*

3.1 El gen *alfR2* codifica para un represor transcripcional

El gen *alfR2* (LCABL_29310) codifica para una hipotética proteína con homología a reguladores transcripcionales. *AlfR2* presenta un dominio conservado HTH (*helix-turn-helix*) en el extremo N-terminal y un dominio de oligomerización y/o unión al efector (E-b/O; *Effector-binding/Oligomerization*) en el extremo C-terminal. Para determinar la implicación de *AlfR2* en la regulación del metabolismo del glicoaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn en *L. casei* BL23, se construyó un mutante en *alfR2* (Fig. 41). Curiosamente los resultados demostraron que este mutante no solo es capaz de utilizar el Fuc-GlcNAc-Asn sino que también se puede cultivar en presencia de los disacáridos Fuc- α -1,6-GlcNAc, Fuc-Glu, Fuc-Gal y el trisacárido Fuc-DAQ (Fig. 39). Esto sugeriría a que *AlfR2* estaría actuando como un represor transcripcional. En ausencia de este represor, la expresión constitutiva de los genes que posiblemente se hallan bajo su control (resto de genes del operon *alf2*) permitiría el transporte de estos carbohidratos y su posterior metabolismo. Al igual que la cepa silvestre, la cepa mutante

para el regulador no puede metabolizar GlcNAc-Asn (Fig. 39), sugiriendo que la presencia L-fucosa es necesaria para el transporte de GlcNAc-Asn.

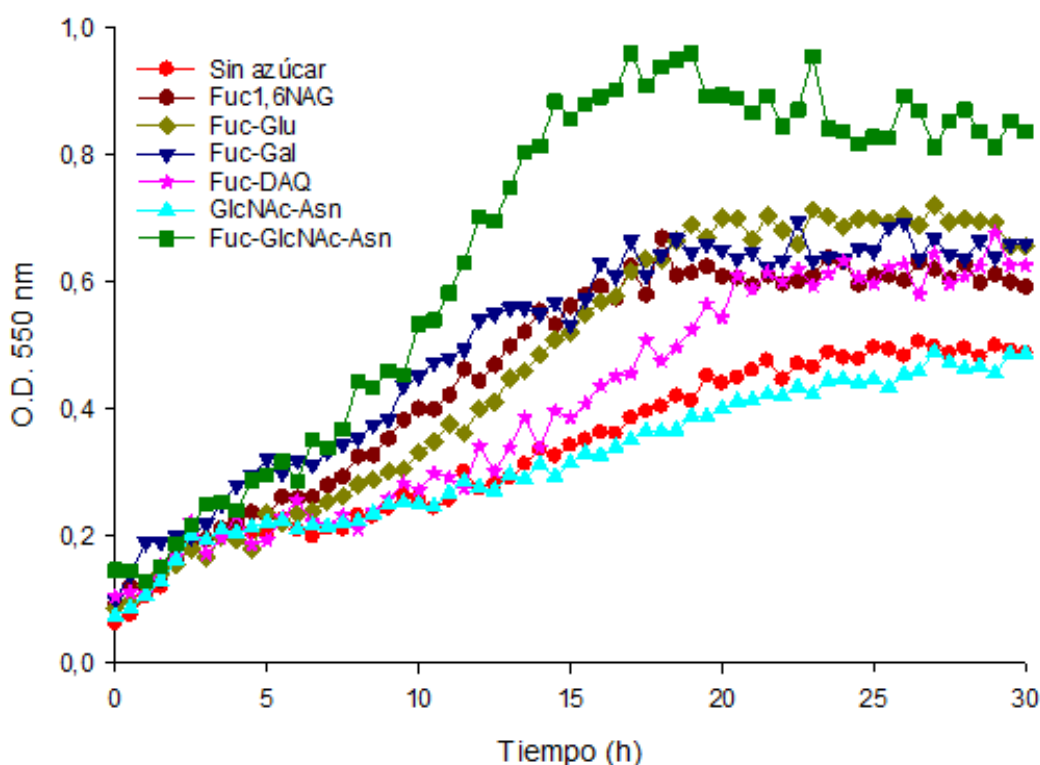


Figura 39. Curvas de crecimiento de *L. casei* BL405 (mutante en *alfR2*) con distintas fuentes de carbono. Los cultivos se realizaron en medio MRS basal sin ninguna fuente de carbono (sin azúcar), con 4 mM de Fuc- α -1,6-GlcNAc (Fuc1,6NAG), fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina (Fuc-GlcNAc-Asn), *N*-acetilglucosamina-asparagina (GlcNAc-Asn), Fucosil-glucosa (Fuc-Glu), Fucosil-galactosa (Fuc-Gal) ó 2 mM de fucosil-*N,N'*-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ) como única fuente de carbono.

Con el objeto de confirmar el efecto represor de *AlfR2* sobre el operón *alf2*, se llevaron a cabo análisis transcripcionales mediante RT-qPCR con RNA aislado de la cepa mutante para *alfR2* cultivada en Fuc- α -1,6-GlcNAc, GlcNAc y glucosa. Tomando como referencia la cepa silvestre cultivada en glucosa se observó que todos los genes *alf2* se expresaban en la cepa mutante y en los tres carbohidratos ensayados (Fig. 40). Estos resultados indican que *AlfR2* actúa como un represor transcripcional de los genes *alf2*.

Como se ha descrito arriba, *L. casei* BL23 fue capaz de crecer con Fuc-GlcNAc-Asn como única fuente de carbono fermentable pero no con sus componentes GlcNAc-Asn or Fuc- α -1,6-GlcNAc (Fig. 37 y Fig. 21 respectivamente). Esto sugiere que Fuc-GlcNAc-Asn es un substrato natural de los productos del operón *alf2* y podría,

directamente o mediante sus metabolitos, actuar como una molécula inductora de éste a través del regulador AlfR2. La incapacidad de la cepa silvestre BL23 para utilizar GlcNAc-Asn o el disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc (Fig. 37 y Fig 21 respectivamente) sugiere que tanto la presencia de L-fucosa como de L-asparagina en la molécula son imprescindibles para el transporte y catabolismo de componentes glicoproteicos en *L. casei* BL23. Aunque la L-fucosa no es utilizada por la cepa BL23 (Rodríguez-Díaz et al 2012), al encontrarse unida a este compuesto estaría actuando como una molécula señalizadora como ocurre en la bacteria patógena *S. pneumoniae*, lo que le permite transportar y aprovechar los carbohidratos de las glicoproteínas del hospedador para su invasión y proliferación (Higgins et al 2014).

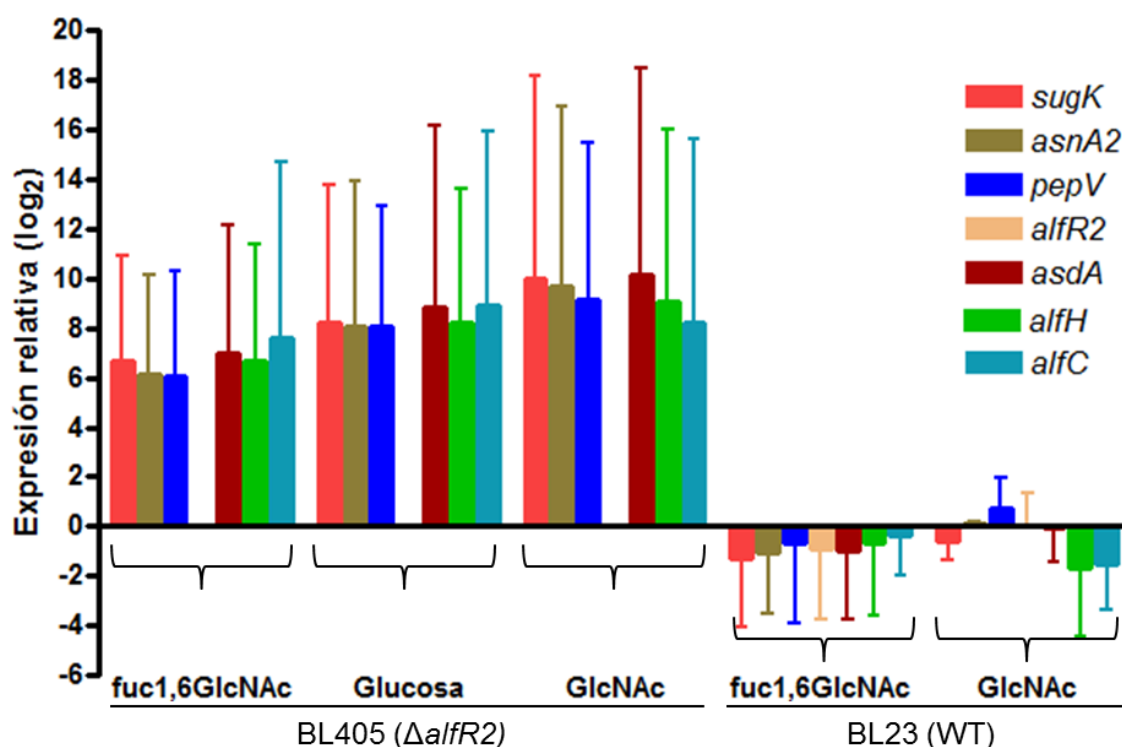


Figura 40. Expresión de los genes *alf2* en *L. casei* BL23 y la cepa mutante *alfR2* con distintas fuentes de carbono. Los cultivos se realizaron en presencia de Fuc- α -1,6-GlcNAc (fuc1,6GlcNAc), glucosa o *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) a 4 mM, y la expresión de los genes *alf2* fue determinada por RT-qPCR. La expresión relativa está referida a la expresión en la cepa silvestre (WT) cultivada en glucosa 4mM. Los genes *pyrG* (LCABL_27380), *ileS* (LCABL_15110) y *lepA* (LCABL_17760) fueron usados como referencia. Los datos presentados son la media de 6 réplicas tomadas de 2 repeticiones biológicas independientes. Las barras indican las desviaciones estándar.

3.2 La permeasa AlfH y la α -L-fucosidasa AlfC están implicadas en la utilización de Fuc-GlcNAc-Asn y otros compuestos fucosilados

Con el objeto de analizar si la permeasa AlfH y la α -L-fucosidasa AlfC están implicadas en el metabolismo de Fuc-GlcNAc-Asn se construyeron mutantes para los genes *alfH* y *alfC*, respectivamente (Fig. 41). Ambos mutantes fueron incapaces de crecer en presencia de ese glicoaminoácido (Fig. 42), indicando que estas proteínas son imprescindibles para su utilización por *L. casei* como fuente de carbono y energía, y que no hay más genes que codifiquen proteínas que puedan realizar la mismas funciones (transporte e hidrólisis, respectivamente). Esto se confirmó con mutaciones en los genes *alfH* o *alfC* en un fondo Δ *alfR2* (Fig. 41). La permeasa, perteneciente a la familia MFS, es responsable del transporte de Fuc-GlcNAc-Asn, probablemente mediante el acoplamiento a un flujo de protones (H^+), el cual facilitaría su entrada al interior celular (Madej 2014). Por otro lado, la α -L-fucosidasa AlfC, sería la encargada de hidrolizar la L-fucosa una vez que la molécula Fuc-GlcNAc-Asn se encuentra en el interior de la bacteria.

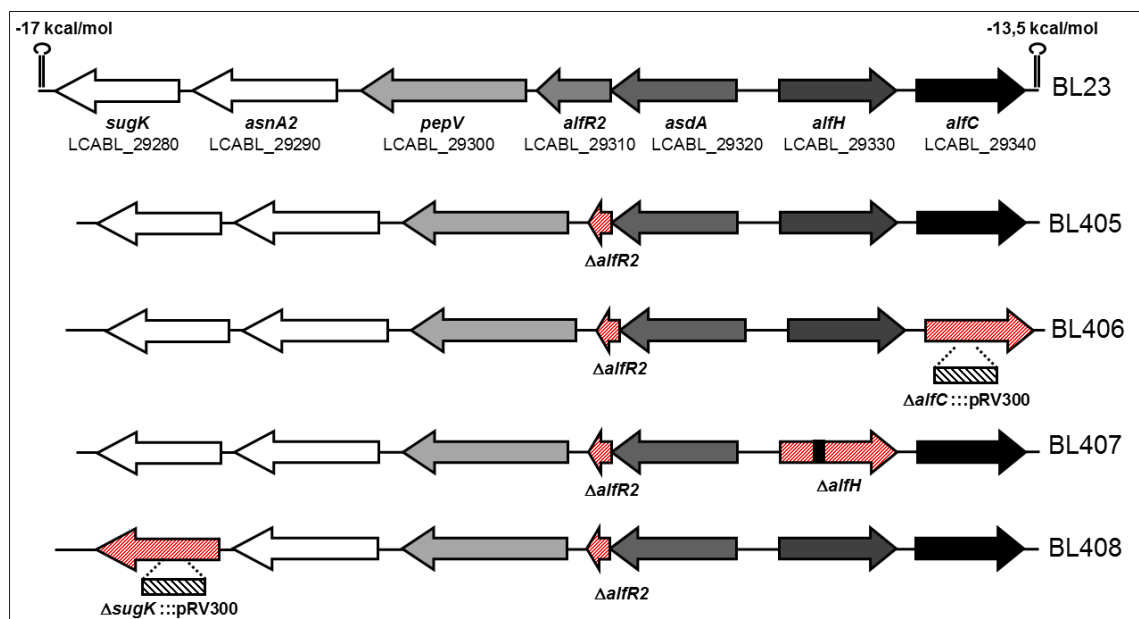


Figura 41. Representación esquemática del operón *alf2* de *L. casei* BL23 silvestre y estructura genética de los diferentes mutantes. Las cepas mutantes se denominaron como BL405 (mutante con deleción del gen *alfR2*); BL406 (doble mutante con deleción del gen *alfR2* e inserción de pRV300 en el gen *alfC*); BL407 (doble mutante con deleción del gen *alfR2* y frameshift en el gen *alfH*); BL408 (doble mutante con deleción del gen *alfR2* e inserción de pRV300 en el gen *sugK*).

Como se ha descrito arriba, además del disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc, *L. casei* también fue capaz de utilizar otros azúcares fucosilados como son fucosil-glucosa (Fuc-Glu), fucosil-galactosa y fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ) cuando el represor transcripcional AlfR2 se eliminó (Fig. 39). Al igual que para Fuc-GlcNAc-Asn, en las cepas con dobles mutaciones [BL407 (*alfR2/alfH*) o BL406 (*alfR2/alfC*)] no se observó crecimiento en presencia de Fuc- α -1,6-GlcNAc ni en cualquiera de los otros azúcares fucosilados (Fuc-Glu, Fuc-Gal o Fuc-DAQ) (Fig. 42), lo cual indicó que AlfH y AlfC son también las responsables del transporte e hidrólisis de estos compuestos. Esto evidencia la capacidad de esta bacteria para la utilización de un amplio rango de sustratos fucosilados, los cuales podrían favorecer su crecimiento en el tracto intestinal humano. Por otro lado, el hecho de que *L. casei* solo pudiera crecer con Fuc-Glu, Fuc-Gal y Fuc-DAQ tras la mutación en *alfR2* indicó que, a pesar de que estos compuestos puedan ser sustratos de la permeasa AlfH; ellos, o productos de su metabolismo no actúan como efectores de AlfR2.

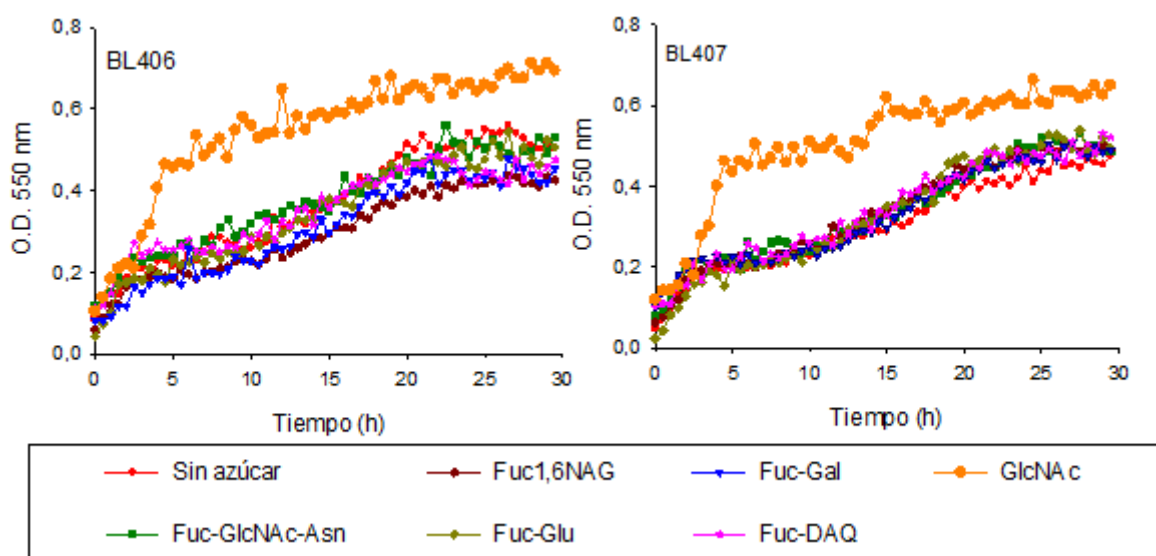


Figura 42. Curvas de crecimiento de *L. casei* dobles mutantes BL406 (*alfR2/alfC*) y BL407 (*alfR2/alfH*). Los cultivos se realizaron en medio MRS basal sin ninguna fuente de carbono (sin azúcar), o con fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina (Fuc-GlcNAc-Asn), *N*-acetilglucosamina-asparagina (GlcNAc-Asn), Fuc- α -1,6-GlcNAc (Fuc1,6NAG), fucosil-glucosa (Fuc-Glu), fucosil-galactosa (Fuc-Gal) a 4 mM o con fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ) 2 mM como única fuente de carbono. *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) 4 mM fue utilizado como control positivo del crecimiento.

3.3 La función de la putativa quinasa (SugK) puede ser sustituida por otra enzima

El gen *sugK* (LCABL_29280), el cual codifica para una hipotética proteína perteneciente a la familia ROK (Del inglés: *Represor, ORF, Kinase*) incluye represores transcripcionales, quinasas de azúcares y marcos de lectura abierta de proteínas bacterianas. Su presencia en el operón *alf2* podría estar relacionada con la fosforilación de la GlcNAc resultante del metabolismo de Fuc-GlcNAc-Asn, Fuc- α -1,6-GlcNAc o fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa. Se construyó una cepa doble mutante Δ *alfR2-sugK* (BL408) (Fig. 41) en la que no se evidenció ninguna ineficiencia para el crecimiento con Fuc- α -1,6-GlcNAc cuando éste se comparó con la cepa Δ *alfR2* (BL405) (Fig. 43), sugiriendo que probablemente otra enzima quinasa podría estar supliendo su función. El genoma de *L. casei* BL23, además de contener el gen *sugK*, también tiene otros dos genes anotados como *glK* (LCABL_18750) y *ypbG* (LCABL_28340) que codifican para una hipotética glucoquinasa y quinasa de *N*-acetilmanosamina, respectivamente, las cuales presentan una identidad del 28% con SugK. Sin embargo, en un estudio realizado previamente, la mutación independiente tanto de *sugK* como de *glK* no mostró ningún defecto para el crecimiento de *L. casei* en presencia de galacto-*N*-biosa (GNB) o lacto-*N*-biosa (LNB), sugiriendo que éstas pueden tener actividad redundante (Bidart et al 2014). Por lo tanto, en nuestro caso la actividad de fosforilación de la GlcNAc podría ser también sustituida por cualquiera de las otras quinasas (G1K o YpbG) que posee *L. casei*, evitando de esta manera un bloqueo del metabolismo de la GlcNAc.

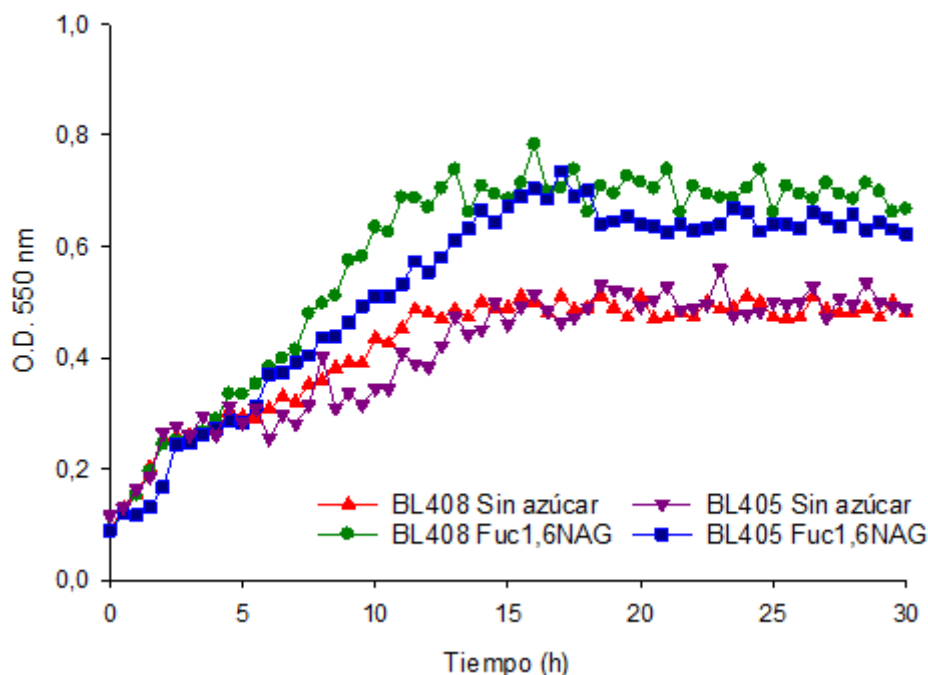


Figura 43. Curvas de crecimiento de *L. casei* mutante (BL405; $\Delta alfR2$) y doble mutante (BL408; $(\Delta alfR2-sugK)$). Los cultivos se realizaron en medio MRS basal sin ninguna fuente de carbono (sin azúcar) o con Fuc- α -1,6-GlcNAc (Fuc1,6NAG) a 4 mM como única fuente de carbono.

4 Ruta catabólica propuesta para el glicoaminoácido fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina en *Lactobacillus casei* BL23

Basándose en los resultados descritos arriba para el operon *alf2* y la homología de la secuencia deducida de aminoácidos de los genes *asdA*, *pepV* y *asnA2* con proteínas previamente caracterizadas en otras bacterias, hemos propuesto un modelo para el catabolismo del glicoaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn en *L. casei* BL23 (Fig. 44). El Fuc-GlcNAc-Asn funcionaría como una molécula efectora de los genes *alf2* a través del regulador AlfR2 y permitiría la expresión de todas las enzimas responsables tanto de su transporte como de su degradación. Además de Fuc-GlcNAc-Asn, otras moléculas más complejas como por ejemplo Fuc-GlcNAc-Asn-Xxx-Ser/Thr (secuencia peptídica consenso para la *N*-glicosilación donde Xxx puede ser cualquier aminoácido excepto prolina) podrían ser también sustratos naturales, ya que toda la maquinaria enzimática para su catabolismo estaría codificada por los genes del operón *alf2*. En este sentido, las enzimas homólogas a PepV de *Lactococcus lactis* (Hellendoorn et al 1997), *Lactobacillus sakei* (Montel et al 1995), *Lactobacillus delbrueckii* (Jozic et al 2002,

Vongerichten et al 1994) y *Lactobacillus helveticus* (Tan et al 1995) han sido caracterizadas por degradar diferentes tipos de dipéptidos. Las secuencias de aminoácidos de estas enzimas en las especies mencionadas tienen una identidad entre el 57–y 28% con la secuencia de PepV de *L. casei*; siendo la de *L. helveticus* la que presenta un porcentaje mayor (57%). *L. helveticus* es una bacteria del ácido láctico considerada de gran importancia en la elaboración de productos de leche fermentada, cuya actividad dipeptidasa ha sido determinada, mostrando una amplia especificidad de sustrato (Tan et al 1995). Esto sugiere que la expresión de PepV en *L. casei* BL23 podría estar implicada en la degradación de dipéptidos que provienen de glicoproteínas bien sea de la dieta o del epitelio intestinal.

La putativa glicosilasparaginasa codificada por el gen *asnA2*, cuya expresión fue detectada solo en el mutante *alfR2*, mostró homología con muchas glicosilasparaginasa de diferentes grupos de bacterias. El análisis de secuencias *AsnA2* de *L. casei* BL23 reveló una similitud moderada (39% de identidad) con varias glicosilasparaginasa de *Flavobacterium sp.* A pesar de que pocas de estas enzimas han sido caracterizadas, el estudio de una aspartilglucosaminidasa (AGA) presente en *Flavobacterium meningosepticum*, ha mostrado su papel fundamental en la degradación de *N*-glicoproteínas, ya que tiene la capacidad de hidrolizar el enlace de GlcNAc-Asn con la subsecuente producción de aspartato, GlcNAc y amonio (Liu et al 1998, Norris et al 1994, Tretter et al 1991). Por otro lado, la identificación e inactivación del gen homólogo a *asnA2* en *Lactobacillus sakei*, (67% de identidad con *AsnA2* de *L. casei*) condujo a una reducción del crecimiento de este mutante en carne; sugiriendo que en estas bacterias además de jugar un importante papel en la degradación de glicoproteínas, podría generar amonio a partir de asparagina por su actividad asparaginasa, lo que favorecería el desarrollo al controlar la acidificación del medio (Hufner et al 2007).

El L-aspartato producido por la putativa actividad L-asparaginasa de *AsnA2* podría ser el sustrato de la enzima aspartato descarboxilasa/aminotransferasa, la cual está codificada por el gen *asdA* en *L. casei* BL23. La expresión de este gen, al igual que los otros genes que pertenecen al operón *alf2* fue constitutiva tras la delección de *alfR2* (Fig. 40). Esta enzima no solo cataliza la β -descarboxilación de L-aspartato sino que también tiene actividad aminotransferasa (AT) (Meister 1990). Estudios previos han mostrado que esta enzima es capaz de catalizar la descarboxilación del carbono 4 de L-

aspartato para formar alanina en presencia de piruvato; y en una menor medida es capaz de realizar transaminación para formar L-glutamato en presencia de α -cetoglutarato (Novogrodsky et al 1963). Este tipo de enzimas (Asd/AT) son dependientes de pirodoxal 5'-fosfato (PLP), y los cetoácidos presentes pueden actuar como activadores en la reacción de β -descarboxilación (Nishimura et al 1962) y como sustratos en la reacción de transaminación (Wang & Lee 2007). A pesar de existir muchas secuencias en las bases de datos que codifican para aspartato descarboxilasa/aminotransferasas (Asd/AT) putativas pertenecientes a diferentes microorganismos, solo se han caracterizado dos de estas enzimas: las de las bacterias *Alcaligenes faecalis* CCR 11585 y *Pseudomonas sp.* ATCC 19121, con actividad tanto descarboxilasa como aminotransferasa (Chen et al 2000, Wang & Lee 2006). Las secuencias aminoacídicas de Asd en *A. faecalis* y *Pseudomonas* presentan una similitud del 43 y 44% respectivamente con AsdA de *L. casei*, sugiriendo que ésta podría tener una función similar, en la que su actividad permitiría convertir el L-aspartato mediante descarboxilación o transaminación, respectivamente, en L-alanina o L-glutámico; aminoácidos que son esenciales para el crecimiento de lactobacilos (Fernandez & Zuniga 2006).

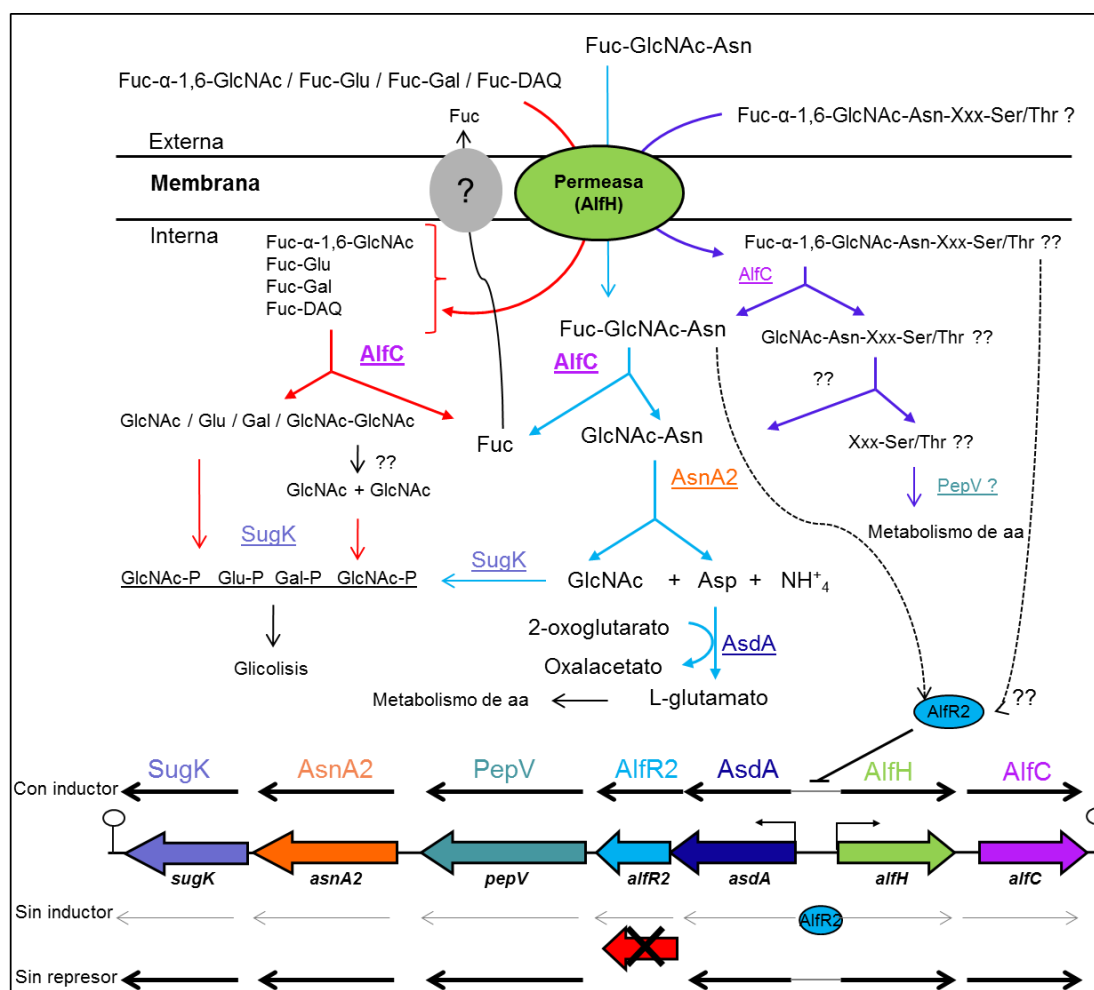


Figura 44. Ruta catabólica propuesta para la utilización de componentes fucosilados de glicoproteínas en *L. casei* BL23. Fuc-GlcNAc-Asn, un sustrato natural utilizable por esta cepa, estaría actuando como la molécula inductora para la expresión de los genes *alf2* a través del regulador AlfR2, llevando al subsecuente metabolismo de este compuesto por las enzimas catabólicas (flechas azules). Todas las proteínas codificadas por el operón *alf2* se transcriben cuando el represor AlfR2 está ausente, permitiendo la utilización de Fuc- α -1,6-GlcNAc, Fucosil-glucosa (Fuc-Glu), Fucosil-galactosa (Fuc-Gal) y fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa (Fuc-DAQ) (flechas rojas). En presencia de AlfR2, sin la molécula inductora, todos los genes *alf2* están reprimidos (flechas tenues). Es probable que Fuc- α -1,6-GlcNAc-Asn-Xxx-Ser/Thr también sea un sustrato natural e induzca la expresión de los genes *alf2* a través de AlfR2, ya que un gen que codifica para una dipeptidasa (PepV) se encuentra dentro de este operón, lo que permitiría el aprovechamiento de moléculas más complejas (flechas moradas).

Discusión

Un factor importante para la determinación de la composición microbiana en el tracto gastrointestinal humano es la disponibilidad de nutrientes que se puedan encontrar en éste, principalmente derivados de la dieta, pero también en secreciones de las mucosas o de las células epiteliales del intestino, siendo los glicanos la fuente de nutrientes más consistente para muchos microorganismos (Salyers et al 1977). Estos glicanos se presentan a las bacterias en el lumen intestinal como *O*-glicanos (principal componente del mucus), unidos a glicoproteínas secretadas o mucina asociada a la célula, o como *N*-glicanos, presentes en la superficie de las células epiteliales. La habilidad de ciertos microorganismos para degradar este tipo de nutrientes (*O/N*-glicanos) permite asegurar su persistencia en este nicho particular (Martens et al 2008). Muchos enlaces glicosídicos pueden ser incorporados dentro de un solo polímero, lo cual requiere que los microorganismos intestinales produzcan consecuentemente muchas enzimas degradativas de enlaces específicos para utilizar efectivamente estos compuestos heterogéneos. Desde una perspectiva ecológica, especies de microorganismos con amplia habilidad para degradar glicanos pueden ser consideradas como “generalistas”, las cuales cambian su metabolismo dependiendo del tipo de nutriente disponible, mientras que las especies con un potencial degradativo bajo pueden ser consideradas “especialistas”, las cuales se centran en la utilización de uno o pocos glicanos. Los especialistas corren el riesgo de llegar a extinguirse en un hospedador si sus nutrientes preferidos escasean durante demasiado tiempo; o de otra manera, también es probable que estos microorganismos ante una presión selectiva, evolucionen para adquirir la capacidad de degradar abundantes glicanos de la dieta o mucinas derivadas del hospedador (Koropatkin et al 2012).

Uno de los microorganismos más estudiado por su capacidad de aprovechar muchos glicanos de la dieta y del hospedador es *B. thetaiotaomicron*, un miembro prominente de la microbiota humana, donde la habilidad para utilizar este tipo de sustratos reside en la presencia de 88 *loci* para la utilización de polisacáridos (PULs; *polysaccharide utilization loci*), encontrándose dentro de éstos genes que codifican para complejos proteicos de membrana capaces de cosechar glicoproteínas, principalmente mucina *O*-glicosilada (Martens et al 2008). Sin embargo, los sistemas para aprovechar estas glicoproteínas aún no han sido bien caracterizados.

La hidrólisis de glicoproteínas del hospedador, además de ser considerada como un mecanismo para la obtención de nutrientes por parte de muchos microorganismos, es una característica importante para la evasión inmune de varias bacterias patógenas (Cao et al 2014). Por ejemplo, *Streptococcus pyogenes* secreta una glicosilhidrolasa, EndoS, la cual puede eficientemente hidrolizar los glicanos de la IgG y reducir significativamente su muerte en sangre mediada por estas inmunoglobulinas (Collin & Olsen 2001). *Capnocytophaga canimorsus*, un miembro del *phylum* Bacteroidetes, es capaz de deglicosilar fetuina e IgG; actividad necesaria para mantener su crecimiento en cultivos *in vitro* con células de mamífero (Renzi et al 2011). Entre tanto, en *Bacteroides fragilis* la presencia de genes *don*, que forman parte de los *loci* PULs homólogos a los de *B. thetaiotamicron*, juegan un papel muy importante en la utilización de transferrina, una glicoproteína encargada del transporte del hierro en plasma (Cao et al 2014). Se ha demostrado que *Streptococcus oralis* y *S. pneumoniae* son capaces de hidrolizar y metabolizar complejos N-glicanos de glicoproteínas y utilizarlos como fuente de carbono (Burnaugh et al 2008, Byers et al 1999). En *S. oralis* se observó que durante su crecimiento en presencia de una alpha-1-ácido glicoproteína, todos los monosacáridos constituyentes (ácido sialico, galactosa, fucosa, N-acetilglucosamina no terminal y manosa) eran liberados secuencialmente mediante la actividad de diferentes exoglicosidasas, siendo todos metabolizados, excepto la fucosa. Sin embargo, el residuo GlcNAc unido a Asn permaneció en el medio de cultivo sin hidrolizarse hasta el final del crecimiento (Byers et al 1999), sugiriendo que estas especies no contienen enzimas que sean capaces de degradar y metabolizar algunos componentes de glicoproteínas como la fucosa y el compuesto GlcNAc-Asn.

En estudios previos se ha demostrado que la enzima responsable de la hidrólisis de GlcNAc-Asn corresponde a una glicosil-asparaginasa. Para este tipo de enzimas, aunque se encuentran en varios organismos, incluidos mamíferos, plantas y bacterias (Noronkoski et al 1997, Norris et al 1994, Plummer et al 1984, Plummer & Tarentino 1991, Tarentino et al 1985, Tretter et al 1991), se han realizado pocos trabajos referentes a su mecanismo. Entre las pocas glicosil-asparaginasa caracterizadas, se encuentran una PNGasa F (Peptide:N-glicosidase F) perteneciente a *Flavobacterium meningosepticum* y una PNGasa A de *Prunus amygdalus* (almendro dulce) (Plummer et al 1984, Tretter et al 1991), las cuales están comercialmente disponibles y presentan especificidades distintas sobre sustratos GlcNAc-Asn que pueden estar o no

fucosilados. PNGasa F actúa únicamente si la GlcNAc de este compuesto está libre de fucosa o si este azúcar se encuentra unido solamente mediante el enlace glicosídico α -1,6; mientras que PNGasa A puede actuar tanto si GlcNAc está fucosilado mediante enlace α -1,3 como α -1,6 (Tretter et al 1991). Entre tanto, se observó que una glicosilasparaginasa humana puede actuar solamente cuando GlcNAc-Asn está libre de fucosa, ya que se demostró que este monosacárido unido a GlcNAc mediante un enlace α -1,6 evitaba su hidrólisis. Esto sugiere que el catabolismo de Fuc-GlcNAc-Asn puede ocurrir por la acción consecutiva de una fucosidasa seguido por una glicosilasparaginasa (Noronkoski & Mononen 1997). Estos hallazgos demuestran que las glicosilasparaginasas, dependiendo de su origen pueden tener distintas especificidades y la presencia de este tipo de enzimas en bacterias comensales/probióticas de la microbiota humana puede contribuir a un mejor aprovechamiento de substratos específicos para su crecimiento y proliferación, repercutiendo en un efecto beneficioso para el hospedador.

L. casei es una bacteria del ácido láctico capaz de colonizar diferentes ambientes, incluidos la cavidad oral, tracto gastrointestinal y tracto genital de humanos; donde muchas cepas han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades para promover la salud (de Vrese & Schrezenmeir 2008, Kleerebezem & Vaughan 2009). La identificación y el estudio de un *cluster* de genes de *L. casei* BL23 involucrados en la utilización de compuestos que pertenecen a glicoproteínas derivadas del hospedador, permite comprender mejor los mecanismos de los que está dotada esta especie para tener una ventaja competitiva y persistir en el hospedador humano. En este trabajo se estableció que los genes *alf2* presentes en el genoma de *L. casei* BL23 son los responsables para la utilización de Fuc-GlcNAc-Asn así como también de otros tipos de substratos fucosilados.

A pesar de que existen varios microorganismos ya descritos capaces de utilizar componentes de glicoproteínas que forman parte tanto de la superficie de células epiteliales como de fluidos corporales (Burnaugh et al 2008, Byers et al 1999, Cao et al 2014, Collin & Olsen 2001, Martens et al 2008, Renzi et al 2011), esta es la primera vez que se caracteriza parcialmente en una bacteria un operón (*alf2*) implicado en el transporte y metabolismo de glicoaminoácidos que forman parte de las N-glicoproteínas. Aunque los mecanismos moleculares aún no están completamente elucidados, los resultados obtenidos en este trabajo han permitido proponer una ruta

para el catabolismo de este tipo de compuestos (Fig. 44). El análisis de mutantes para el operón *alf2* en esta Tesis permitió determinar que este *cluster* de genes es controlado mediante un regulador transcripcional perteneciente a la familia GntR codificado por el gen *alfR2*; siendo las enzimas permeasa y α -L-fucosidasa AlfC codificadas por los genes *alfH* y *alfC* las responsables del transporte de los compuestos fucosilados y la subsecuente hidrólisis de la L-fucosa, respectivamente. El hecho de que *L. casei* BL23 sea capaz de usar oligosacáridos fucosilados solamente cuando el regulador AlfR2 se encuentra ausente, indica que esta proteína estaría actuando como un represor transcripcional. El crecimiento de la cepa silvestre de *L. casei* en presencia de Fuc-GlcNAc-Asn, sugiere que éste podría actuar como una molécula inductora de la expresión de los genes *alf2* a través de AlfR2. Sin embargo, no se descarta que una molécula de mayor complejidad como es el compuesto Fuc-GlcNAc-Asn-Xxx-Ser/Thr (secuencia peptídica consenso de la *N*-glicosilación, donde Xxx puede ser cualquier aminoácido excepto prolina) pueda ser también un substrato natural de *L. casei* e inducir los genes de *alf2*. Tal consideración responde al hecho de que dentro de este operón además de hallarse los genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos (*asnA2* y *asdA*), los cuales codificarían hipotéticas glicosilasparaginasa y aspartato descarboxilasa/aminotransferasa, también se encuentran genes hipotéticamente implicados en la degradación de dipéptidos y fosforilación de azúcares (*pepV* y *sugK*).

El análisis transcripcional de *L. casei* BL23 y la cepa mutante *alfR2* (BL405) cultivados en Fuc- α -1,6-GlcNAc y el monosacárido constituyente GlcNAc permitió demostrar que la expresión del operón *alf2* pasó a ser constitutiva para todos los genes en la cepa mutante, corroborando una vez más que el carácter represor de AlfR2. Análisis de secuencias indican que AlfR2 pertenece a la familia de reguladores GntR, la cual está ampliamente distribuida en todas las bacterias y participa en el control de diversos procesos biológicos. Este tipo de reguladores está siempre localizado en el cromosoma adyacente a los genes que controlan, lo que permite en muchos casos intuir los metabolitos que pueden actuar como efectores (Hoskisson & Rigali 2009). En general, estas proteínas contienen un dominio HTH (del inglés *helix-turn-helix*) en el extremo N-terminal y un dominio de oligomerización y/o unión al efector (E-b/O; *Effector-binding/Oligamerization*) en el extremo C-terminal. Tras la unión de una molécula efectora en el dominio C-terminal, ocurre un cambio conformacional que influye en las propiedades de unión del regulador al DNA, resultando en la represión o activación de

la transcripción. El dominio de unión al DNA es conservado a lo largo de la familia GntR, sin embargo las regiones fuera de este dominio son más variables, lo cual refleja la diversidad de moléculas a las que se puede unir (Rigali et al 2002). A pesar del gran número de reguladores tipo GntR identificados, hay pocos ejemplos donde sus moléculas efectoras sean conocidas y el circuito de regulación completo haya sido elucidado (Hoskisson & Rigali 2009). Se ha demostrado que en *Streptomyces coelicolor* un intermediario del metabolismo de GlcNAc, la GlcN-6-fosfato (GlcNAc-6-P), estaría actuando como molécula efectora del regulador DasR perteneciente a la familia GntR, permitiendo el transporte y utilización de este aminoazúcar (Rigali et al 2006). En *Bacillus subtilis* se ha propuesto que la molécula efectora del regulador NagR-GntR para el metabolismo de GlcNAc, podría ser también GlcNAc-6-P como ocurre en *S. coelicolor*, aunque no se descarta que pueda existir un efector más potente para este regulador (Fillenberg et al 2015). Las secuencias de aminoácidos, tanto de DasR como de NagR, presentan una homología del 29% y 30%, respectivamente, con la proteína codificada por el gen *alfR2* de *L. casei*, lo cual sugiere que podrían tener una función similar. Aunque se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales AlfR2 estaría controlando la transcripción de los genes *alf2* en *L. casei*, de acuerdo a trabajos previos (Hoskisson & Rigali 2009) se puede intuir que este regulador mediante el dominio N-terminal se estaría uniendo a la región promotora entre los genes *asdA* y *alfH* dando lugar a la represión de todos los genes de este operón. Su activación solamente tendría lugar cuando Fuc-GlcNAc-Asn (molécula efectora) interactuase con el dominio C-terminal de AlfR2, provocando así un cambio conformacional en su estructura que llevaría a su disociación del DNA.

El operón *alf2*, además de encontrarse en *L. casei* BL23, también está conservado en las especies *L. paracasei* y *L. rhamnosus*. Sorprendentemente en *L. rhamnosus* el gen *asdA* que codifica para la aspartato descarboxilasa/aminotransferasa (AsdA) está ausente. Esto sugiere que probablemente este gen estaba presente en el ancestro del grupo *L. casei/L. paracasei/L. rhamnosus* y su pérdida se originó después de la diversificación. La presencia de genes homólogos en otras especies distintas a las de ese grupo, que también se desarrollan en mucosas intestinales, sugiere una función en la adaptación a ambientes complejos. Interesantemente, en las especies de *L. gasseri*, *L. sakei*, *E. faecalis*, *C. difficile* y *C. maltaromaticum*, con algunas excepciones, los genes homólogos a *asnA2*, *pepV* y *alfR2* se encuentran en una misma región cromosómica

formando un pequeño *cluster* y en algunos casos conservando la misma estructura génica que se encuentra en *L. casei*. Son necesarios análisis filogenéticos para determinar si esto sugiere la presencia en algún ancestro común (en Firmicutes) o es fruto de una transferencia génica horizontal, dado que la mayoría de las especies comparten nichos similares. Curiosamente, un gen adyacente a los genes homólogos a *asnA2*, *pepV* y *alfR2*, es encontrado en la mayoría de estas especies, el cual codificaría para uno de los componentes (IIC) hipotéticos de un sistema PTS de la familia lactosa/celobiosa. Esto sugiere que probablemente esta región cromosómica esté dedicada al transporte y catabolismo de carbohidratos presentes en las glicoproteínas o glicopeptidos.

El hecho de que *L. casei* BL23 sea capaz de crecer sobre varios compuestos fucosilados, sugiere que el transportador en esta cepa presenta una amplia especificidad de sustratos, siendo muy probable que también tenga capacidad de facilitar la entrada de otros compuestos con mayor complejidad. AlfH pertenece a la familia MFS, que ha sido extensivamente estudiada y presenta un amplio espectro de sustratos, incluyendo iones, carbohidratos, lípidos, aminoácidos, péptidos, etc (Madej 2014, Saier 2000). Esto y la caracterización del crecimiento del doble mutante *alfR2-alfH* apoya la idea de que la vía de entrada de todos los compuestos fucosilados estudiados (Fuc-GlcNAc-Asn, Fuc- α -1,6-GlcNAc, Fuc-Glu, Fuc-Gal y Fuc-DAQ) se produce a través de AlfH. Así, la presencia de fucosa en la molécula mediante un enlace α 1-6 parece ser el único requerimiento para el transporte. Sin embargo el sistema sólo sería inducido vía AlfR2 cuando la molécula que se transporta posee una estructura GlcNAc-Asn. Esto está apoyado por el hecho de que en el resto de especies donde genes del *cluster* están presentes, éste sólo conserva el regulador AlfR y los genes que se encargarían de metabolizar GlcNAc-Asn, careciendo de transportadores tipo AlfH o α -L-fucosidasas homólogas a AlfC. Así, es probable que la molécula inductora de AlfR2 sea GlcNAc-Asn, aunque este compuesto no pueda ser utilizado por *L. casei* BL23, probablemente al no ser un sustrato transportado por AlfH.

Todo sugiere que *L. casei* estaría adaptado al metabolismo de glicopéptidos fucosilados (transportados por AlfH), cuyo primer paso en su catabolismo consistiría en la eliminación de la porción de L-fucosa por AlfC. A pesar de que la L-fucosa no es metabolizada por *L. casei*, como se ha demostrado anteriormente (Rodríguez-Díaz et al 2012), los otros componentes derivados del compuesto transportado (e.g. GlcNAc o

glucosa y galactosa en el caso de Fuc-Gluc y Fuc-Gal) sí que pueden ser canalizados hacia la glucólisis y ser utilizados para el crecimiento. Dado que la entrada de los compuestos fucosilados se produce mediante una permeasa independiente de fosforilación, muy probablemente la quinasa perteneciente a la familia ROK codificada por el gen *sugK* jugaría un papel en la fosforilación de los azúcares constituyentes. Aunque la familia ROK también está formada por reguladores que poseen un dominio N-terminal que se une al DNA; tanto la especificidad como el papel funcional de la mayoría sigue sin conocerse (Kazanov et al 2013). En contraste a los reguladores, un gran número de quinastas que son activas en varios azúcares hexosas incluyendo D-glucosa, D-alosa, D-manosa y D-fructosa, pero también en aminoazúcares, han sido caracterizadas (Conejo et al 2010, Titgemeyer et al 1994). El nivel de selectividad de sustrato puede variar entre diferentes quinastas; por ejemplo: la fructoquinasa de *Bacillus subtilis* es específica para fosforilar D-fructosa, mientras que la glucoquinasa de *T. maritima* tiene una amplia especificidad para varias hexosas incluyendo D-manosa y GlcNAc (Rodionova et al 2012). En *L. casei* BL23, además del gen *sugK*, otros dos genes (*glK* y *ypbG*) están presentes en su genoma que codificarían hipotéticas quinastas (glucoquinasa y quinasa de *N*-acetilmanosamina respectivamente) de azúcares. Estas presentan una similitud del 28% entre ellas, sugiriendo que pueden tener especificidad por los mismos sustratos. Esta inferencia además de ser suscitada por la similitud que ellas presentan, corresponde más al hecho de que la mutación del gen *sugK* en la cepa carente del represor AlfR2 no afectó a su crecimiento en presencia de Fuc- α -1,6-GlcNAc. Un caso similar también fue observado en un estudio realizado previamente, donde la mutación independiente tanto de *sugK* como de *glK* no mostró ningún efecto para el crecimiento de *L. casei* en presencia de LNB o GNB, dos disacáridos que tiene GlcNAc y GalNAc en su estructura, sugiriendo que éstas pueden tener actividad redundante (Bidart et al 2014).

Por otro lado, la actividad de la hipotética PepV sería la responsable de la degradación de dipéptidos que forman parte de glicoproteínas. Este planteamiento se hace debido a que esta enzima presenta similitud con algunas peptidasas ya caracterizadas en otros lactobacilos, que pertenecen a la familia de las peptidasas M20 y tienen la capacidad de degradar dipéptidos, algunas de ellas con una amplia especificidad de sustrato (Jozic et al 2002, Montel et al 1995, Tan et al 1995, Vongerichten et al 1994). Las enzimas del tipo PepV incluyen carboxipeptidasas y aminopeptidasas, las cuales poseen un único

sitio activo cerrado y por lo tanto son especializadas para la actividad dipeptidasa (Jozic et al 2002). Un ejemplo claro de este tipo de enzimas es la PepV de *Lactobacillus delbrueckii*, cuya eficiencia para la degradación de carnosina (β -Ala-His) y otros dipéptidos así como también tripéptidos ha sido demostrada (Jozic et al 2002, Vongerichten et al 1994). Una PepV que corresponde a *L. helveticus*, con una identidad del 57% respecto a PepV de *L. casei*, tiene actividad sobre multitud de dipéptidos; entre ellos, Ser-Leu y Ala-Ser (Tan et al 1995), los cuales podrían formar parte de la secuencia Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx es cualquier aminoácido excepto la prolina). Esto sugiere que en esta bacteria PepV podría estar implicada en la hidrólisis de péptidos que forman parte de glicoproteínas.

La posible actividad glicosilasparaginasa de AsnA2 de *L. casei* no se ha confirmado, pero podría ser similar a la encontrada en *F. meningosepticum*, ya que sus secuencias presentan un identidad del 39%. Tal como se ha descrito antes; esta glicosilasparaginasa es específica para GlcNAc-Asn o para Fuc- α -1,6-GlcNAc-Asn pero no para Fuc- α -1,3-GlcNAc-Asn (Tretter et al 1991). El hecho de que una α -L-fucosidasa también esté presente en esta especie con un 30% de similitud a AlfC de *L. casei*, sugiere que probablemente el catabolismo de este complejo ocurra vía las actividades consecutivas α -L-fucosidasa y glicosilasparaginasa, tal y como postulamos para *L. casei*. Algo similar ha sido encontrado en una glicosilasparaginasa humana, la cual tiene actividad solamente si el substrato GlcNAc-Asn estaba desprovisto de L-fucosa, sugiriendo que una fucosidasa ha liberado previamente este monosacárido (Noronkoski & Mononen 1997). De acuerdo con esto, estudios realizados indican que el substrato de la glicosilasparaginasa corresponde a la GlcNAc-Asn defucosilada, la cual es hidrolizada produciendo L-aspartato, GlcNAc y amonio (Liu et al 1998).

La secuencia para la degradación y/o transformación de intermediarios metabólicos como el aminoácido L-aspartato producido por la acción de la glicosilasparaginasa, se realizaría mediante la actividad de la enzima aspartato descarboxilasa/aminotransferasa (AsdA), la cual, no solo cataliza la β -descarboxilación de este aminoácido sino que también tiene actividad aminotransferasa (AT) (Meister 1990). A pesar de que el *cluster alf2* de *L. rhamnosus* carece del gen que codifica para esta enzima, esta especie debe de poder metabolizar el L-aspartato generado a partir de GlcNAc-Asn mediante la intervención de otra enzima. Varios estudios muestran que las bacterias del ácido láctico pueden metabolizar todos los aminoácidos (Liu et al 2003, Tammam et al 2000), aunque

la habilidad para degradarlos puede variar grandemente entre especies e incluso las vías metabólicas, aunque presentes en algunos casos, pueden estar incompletas o defectuosas. No obstante, en este último caso el crecimiento no suele afectarse, ya que los compuestos intermediarios requeridos para el desarrollo de estas bacterias pueden ser obtenidos por rutas alternativas (Fernandez & Zuniga 2006). Esto sugiere que el catabolismo de L-aspartato en *L. rhamnosus* también se podría dar por otras vías. En *L. casei* BL23 el L-aspartato que se generaría tras el catabolismo de GlcNAc-Asn, sería el sustrato para la enzima AsdA, la cual presenta homología del 43% con las ya caracterizadas en *Alcaligenes faecalis* (CCR 11585) y *Pseudomonas sp.* (ATCC 19121) con actividad tanto descaboxilasa como aminotransferasa (Chen et al 2000, Wang & Lee 2006). En estudios previos se ha demostrado que la actividad aminotransferasa convierte de forma reversible el L-aspartato más α -cetoglutarato en glutamato y oxalacetato, donde este último es degradado a piruvato (Fernandez & Zuniga 2006), lo cual sugiere que una ruta similar podría encontrarse en *L. casei*.

En conclusión, el aprovechamiento por parte de *L. casei* BL23 de los componentes de glicoproteínas que se encuentran en la mucosa y en la leche humana, se relaciona con la presencia de los genes *alf2*. Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido demostrar que estos genes están involucrados en la degradación del glicoaminoácido Fuc-GlcNAc-Asn y otros compuestos fucosilados, así como proponer un modelo de la ruta metabólica para estos sustratos en *L. casei*. Por lo tanto, estos resultados indican que los genes *alf2* muy probablemente representan una adaptación de esta cepa al tracto gastrointestinal.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Mediante la actividad de transfucosilación con las α -L-fucosidasas AlfB y AlfC de *Lactobacillus casei* se han sintetizado y purificado a escala semi-preparativa los disacáridos fucosil- α -1,3-*N*-acetilglucosamina (Fuc- α -1,3-GlcNAc) y fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina (Fuc- α -1,6-GlcNAc), obteniendo un rendimiento de 4.2 y 9.3 g/l respectivamente.
2. Mediante la actividad de transfucosilación con la α -L-fucosidasa AlfC, además de producir fuc- α -1,6-GlcNAc, también se han sintetizado otros compuestos fucosilados, como son el glicoaminoácido fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina, los disacáridos fucosil-glucosa, fucosil-galactosa y el trisacárido fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa con rendimientos de 3.6; 3.3; 1.3 y 1.8 g/l, respectivamente.
3. La actividad de transfucosilación de la α -L-fucosidasa AlfB fue mejorada mediante mutagénesis aleatoria. Se obtuvieron 18 enzimas mutantes, 3 de éstas (M75, M78 y M79) presentaron rendimientos de transfucosilación por encima del 50 %, y la variante M58 presentó el máximo rendimiento del 100% para la síntesis de Fuc- α -1,3-GlcNAc. Mediante mutagénesis dirigida de esta última variante se ha identificado que el cambio del residuo Asn346Lys es el único responsable de su alta actividad transfucosidasa.
4. El disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc es fermentado *in vitro* por especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, sugiriendo un potencial prebiótico para este carbohidrato. La capacidad de utilización de Fuc- α -1,3-GlcNAc por las cepas de *Lactobacillus* se correlaciona con la presencia de genes homólogos al gen *alfB* de la α -L-fucosidasa AlfB de *Lactobacillus casei* BL23.
5. Los disacáridos Fuc- α -1,3-GlcNAc, Fuc- α -1,6-GlcNAc y sus monosacáridos constituyentes, L-fucosa y GlcNAc, mostraron capacidad de inhibir en diferentes grados la unión de cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas (EPEC) a la línea celular intestinal humana HT-29, sugiriendo que tanto su composición como su estructura son determinantes para su potencial anti-adhesivo.

6. La capacidad de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) para metabolizar la L-fucosa se debe a la presencia de los genes *fuc*. Esto fue confirmado mediante la construcción de los mutantes *fucI* y *fucP*, en los cuales se evidenció un severo defecto en el crecimiento con L-fucosa. El operón *fuc* se induce por la presencia de L-fucosa mediante el activador transcripcional FucR y está sujeto a una fuerte regulación por represión por catabolito.
7. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) se puede cultivar en presencia del disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc como fuente de carbono. Este disacárido también induce los genes *fuc*, probablemente por la generación de L-fucosa intracelular. Contrariamente a otros lactobacilos capaces de utilizar este Fuc- α -1,3-GlcNAc, LGG es capaz de metabolizar la porción de L-fucosa generada.
8. *Lactobacillus casei* BL23 es capaz de metabolizar el glicoaminoácido fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina, que forma parte de la *N*-glicosilación de las proteínas. La permeasa AlfH y la α -L-fucosidasa AlfC codificadas por el operón *alf2* están implicadas en su metabolismo.
9. La inactivación del gen *alfR2* y análisis transcripcionales del operón *alf2* de *Lactobacillus casei* BL23 demostraron que AlfR2 es un represor transcripcional. La cepa mutante para este represor es capaz de utilizar los disacáridos Fuc- α -1,6-GlcNAc, fucosil-glucosa, fucosil-galactosa y el trisacárido fucosil-N,N'-diacetilquitobiosa. La permeasa AlfH y la α -L-fucosidasa AlfC codificadas por el operón *alf2* están implicadas en su metabolismo.
10. Se ha propuesto la ruta para el metabolismo del glicoaminoácido fucosil- α -1,6-*N*-acetilglucosamina-asparagina en *Lactobacillus casei* BL23 mediante las proteínas codificadas en el operón *alf2*. Esta es la primera vez que un operón involucrado en la utilización de componentes de glicoproteínas que se encuentran en el epitelio intestinal humano es caracterizado en bacterias. Su presencia puede representar una ventaja competitiva que aumentaría la adaptación de *Lactobacillus casei* para proliferar en este nicho particular.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ajisaka K, Fujimoto H, Miyasato M. 1998. An alpha-L-fucosidase from *Penicillium multicolor* as a candidate enzyme for the synthesis of alpha (1-->3)-linked fucosyl oligosaccharides by transglycosylation. *Carbohydrate research* 309: 125-9
- Ajisaka K, Shirakabe M. 1992. Regioselective synthesis of alpha-L-fucosyl-containing disaccharides by use of alpha-L-fucosidases of various origins. *Carbohydrate research* 224: 291-9
- Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 34: 148-55
- Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, et al. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 3906-12
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology* 56: 1919-25
- Amaya MF, Watts AG, Damager I, Wehenkel A, Nguyen T, et al. 2004. Structural insights into the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Structure* 12: 775-84
- Aronson NN, Jr., Kuranda MJ. 1989. Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins. *FASEB J* 3: 2615-22
- Arraj JA, Marinus MG. 1983. Phenotypic reversal in dam mutants of *Escherichia coli* K-12 by a recombinant plasmid containing the dam+ gene. *Journal of bacteriology* 153: 562-5
- Asakuma S, Urashima T, Akahori M, Obayashi H, Nakamura T, et al. 2008. Variation of major neutral oligosaccharides levels in human colostrum. *European journal of clinical nutrition* 62: 488-94
- Ashida H, Miyake A, Kiyohara M, Wada J, Yoshida E, et al. 2009. Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology* 19: 1010-7
- Atochina O, Harn D. 2005. LNFPIII/LeX-stimulated macrophages activate natural killer cells via CD40-CD40L interaction. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1041-9
- Autieri SM, Lins JJ, Leatham MP, Laux DC, Conway T, Cohen PS. 2007. L-fucose stimulates utilization of D-ribose by *Escherichia coli* MG1655 DeltafucAO and *E. coli* Nissle 1917 DeltafucAO mutants in the mouse intestine and in M9 minimal medium. *Infection and immunity* 75: 5465-75
- Azcarate-Peril MA, Altermann E, Goh YJ, Tallon R, Sanozky-Dawes RB, et al. 2008. Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. *Applied and environmental microbiology* 74: 4610-25
- Baenziger J, Kornfeld S, Kochwa S. 1974. Structure of the carbohydrate units of IgE immunoglobulin. II. Sequence of the sialic acid-containing glycopeptides. *The Journal of biological chemistry* 249: 1897-903

- Baldoma L, Aguilar J. 1988. Metabolism of L-fucose and L-rhamnose in *Escherichia coli*: aerobic-anaerobic regulation of L-lactaldehyde dissimilation. *Journal of bacteriology* 170: 416-21
- Bartolozzi A, Seeberger PH. 2001. New approaches to the chemical synthesis of bioactive oligosaccharides. *Current opinion in structural biology* 11: 587-92
- Becker DJ, Lowe JB. 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13: 41R-53R
- Benesova E, Lipovova P, Krejzova J, Kovalova T, Buchtova P, et al. 2015. Alpha-L-fucosidase isoenzyme iso2 from *Paenibacillus thiaminolyticus*. *BMC Biotechnol* 15: 36
- Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, et al. 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 18933-8
- Berteau O, Bielicki J, Kilonda A, Machy D, Anson DS, Kenne L. 2004. Alpha-L-fucosidases: exoglycosidases with unusual transglycosylation properties. *Biochemistry* 43: 7881-91
- Bidart GN, Rodriguez-Diaz J, Monedero V, Yebra MJ. 2014. A unique gene cluster for the utilization of the mucosal and human milk-associated glycans galacto-N-biose and lacto-N-biose in *Lactobacillus casei*. *Molecular microbiology* 93: 521-38
- Bode L. 2009. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition reviews* 67 Suppl 2: S183-91
- Bode L. 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22: 1147-62
- Bojarova P, Kren V. 2009. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends Biotechnol* 27: 199-209
- Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *The American journal of clinical nutrition* 78: 675-83
- Brigham CJ, Malamy MH. 2005. Characterization of the RokA and HexA broad-substrate-specificity hexokinases from *Bacteroides fragilis* and their role in hexose and N-acetylglucosamine utilization. *Journal of bacteriology* 187: 890-901
- Broadbent JR, Neeno-Eckwall EC, Stahl B, Tandee K, Cai H, et al. 2012. Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC genomics* 13: 533
- Burnaugh AM, Frantz LJ, King SJ. 2008. Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *Journal of bacteriology* 190: 221-30
- Byers HL, Tarelli E, Homer KA, Beighton D. 1999. Sequential deglycosylation and utilization of the N-linked, complex-type glycans of human alpha1-acid glycoprotein mediates growth of *Streptococcus oralis*. *Glycobiology* 9: 469-79
- Cabezas JA, Reglero A, Calvo P. 1983. Glycosidases. (Fucosidases, galactosidases, glucosidases, hexosaminidases and glucuronidase from some molluscs and vertebrates, and neuraminidase from virus). *The International journal of biochemistry* 15: 243-59
- Cao Y, Rocha ER, Smith CJ. 2014. Efficient utilization of complex N-linked glycans is a selective advantage for *Bacteroides fragilis* in extraintestinal infections.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 12901-6
- Cobucci-Ponzano B, Conte F, Bedini E, Corsaro MM, Parrilli M, et al. 2009. beta-Glycosyl azides as substrates for alpha-glycosynthases: preparation of efficient alpha-L-fucosynthases. *Chemistry & biology* 16: 1097-108
- Cobucci-Ponzano B, Conte F, Rossi M, Moracci M. 2008. The alpha-L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles : life under extreme conditions* 12: 61-8
- Cobucci-Ponzano B, Moracci M. 2012. Glycosynthases as tools for the production of glycan analogs of natural products. *Nat Prod Rep* 29: 697-709
- Collin M, Olsen A. 2001. EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *EMBO J* 20: 3046-55
- Collin M, Svensson MD, Sjöholm AG, Jensenius JC, Sjöbring U, Olsen A. 2002. EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis. *Infection and immunity* 70: 6646-51
- Comstock LE. 2009. Importance of glycans to the host-bacteroides mutualism in the mammalian intestine. *Cell host & microbe* 5: 522-6
- Conejo MS, Thompson SM, Miller BG. 2010. Evolutionary bases of carbohydrate recognition and substrate discrimination in the ROK protein family. *J Mol Evol* 70: 545-56
- Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Facinelli B, Ferrante L, et al. 2006. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella fytis*. *Pediatric research* 59: 377-82
- Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. 2001. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6: D1321-57
- Coyne MJ, Reinap B, Lee MM, Comstock LE. 2005. Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* 307: 1778-81
- Crane JK, Azar SS, Stam A, Newburg DS. 1994. Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *The Journal of nutrition* 124: 2358-64
- Cravioto A, Tello A, Villafan H, Ruiz J, del Vedovo S, Neeser JR. 1991. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *The Journal of infectious diseases* 163: 1247-55
- Crout DH, Vic G. 1998. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Current opinion in chemical biology* 2: 98-111
- Chen CC, Chou TL, Lee CY. 2000. <Cloning, expression and characterization of L-aspartate beta-decarboxylase gene from *Alcaligenes faecalis* CCRC 11585.pdf>. *Journal of Society for Industrial Microbiology* 25: 132-40
- Chen YM, Zhu Y, Lin EC. 1987a. NAD-linked aldehyde dehydrogenase for aerobic utilization of L-fucose and L-rhamnose by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 169: 3289-94
- Chen YM, Zhu Y, Lin EC. 1987b. *The organization of the fuc regulon specifying L-fucose dissimilation in Escherichia coli K12 as determined by gene cloning.* 331-7 pp.
- Cherry JR, Fidantsef AL. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology* 14: 438-43

- Chessa D, Winter MG, Jakomin M, Baumler AJ. 2009. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal alpha(1,2)fucose residues in the cecal mucosa. *Mol Microbiol* 71: 864-75
- Choay J. 1989. Chemically synthesized heparin-derived oligosaccharides. *Ann N Y Acad Sci* 556: 61-74
- De Keersmaecker SC, Braeken K, Verhoeven TL, Perea Velez M, Lebeer S, et al. 2006. Flow cytometric testing of green fluorescent protein-tagged *Lactobacillus rhamnosus* GG for response to defensins. *Applied and environmental microbiology* 72: 4923-30
- De Leoz ML, Kalanetra KM, Bokulich NA, Strum JS, Underwood MA, et al. 2015. Human milk glycomics and gut microbial genomics in infant feces show a correlation between human milk oligosaccharides and gut microbiota: a proof-of-concept study. *Journal of proteome research* 14: 491-502
- de Vrese M, Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111: 1-66
- Deutscher J, Ake FM, Derkaoui M, Zebre AC, Cao TN, et al. 2014. The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 231-56
- Dominguez-Vergara AM, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont G. 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION* 59
- Douillard FP, Ribbera A, Kant R, Pietila TE, Jarvinen HM, et al. 2013. Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. *PLoS Genet* 9: e1003683
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, et al. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635-8
- El Kaoutari A, Armougom F, Raoult D, Henrissat B. 2014. [Gut microbiota and digestion of polysaccharides]. *Med Sci (Paris)* 30: 259-65
- Eneyskaya EV, Kulminskaya AA, Kalkkinen N, Nifantiev NE, Arbatskii NP, et al. 2001. An alpha-L-fucosidase from *Thermus sp.* with unusually broad specificity. *Glycoconjugate journal* 18: 827-34
- Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. 2000. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition* 71: 1589-96
- Feng L, Han W, Wang Q, Bastin DA, Wang L. 2005. Characterization of *Escherichia coli* O86 O-antigen gene cluster and identification of O86-specific genes. *Veterinary microbiology* 106: 241-8
- Fernandez L, Langa S, Martin V, Maldonado A, Jimenez E, et al. 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 69: 1-10
- Fernandez M, Zuniga M. 2006. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol* 32: 155-83
- Fillenberg SB, Grau FC, Seidel G, Muller YA. 2015. Structural insight into operator dre-sites recognition and effector binding in the GntR/HutC transcription regulator NagR. *Nucleic Acids Res* 43: 1283-96
- Finne J, Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA, Leffler H, et al. 1989. Novel polyfucosylated N-linked glycopeptides with blood group A, H, X, and Y determinants from human small intestinal epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 264: 5720-35

- Flowers HM. 1978. Chemical synthesis of oligosaccharides. *Methods Enzymol* 50: 93-121
- Garrido D, Dallas DC, Mills DA. 2013. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology* 159: 649-64
- Gloster TM, Turkenburg JP, Potts JR, Henrissat B, Davies GJ. 2008. Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora. *Chemistry & biology* 15: 1058-67
- Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *The Journal of nutrition* 130: 3014-20
- Haarman M, Knol J. 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and environmental microbiology* 71: 2318-24
- Hagglund P, Matthiesen R, Elortza F, Hojrup P, Roepstorff P, et al. 2007. An enzymatic deglycosylation scheme enabling identification of core fucosylated N-glycans and O-glycosylation site mapping of human plasma proteins. *Journal of proteome research* 6: 3021-31
- Hakomori SI. 2008. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochimica et biophysica acta* 1780: 325-46
- Hancock SM, Vaughan MD, Withers SG. 2006. Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Current opinion in chemical biology* 10: 509-19
- Hellendoorn MA, Franke-Fayard BM, Mierau I, Venema G, Kok J. 1997. Cloning and analysis of the pepV dipeptidase gene of *Lactococcus lactis* MG1363. *Journal of bacteriology* 179: 3410-5
- Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal* 280 (Pt 2): 309-16
- Heyman M, Menard S. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 59: 1151-65
- Higgins CF. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol* 152: 205-10
- Higgins MA, Suits MD, Marsters C, Boraston AB. 2014. Structural and functional analysis of fucose-processing enzymes from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of molecular biology* 426: 1469-82
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, et al. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11: 506-14
- Holemann A, Seeberger PH. 2004. Carbohydrate diversity: synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates. *Current opinion in biotechnology* 15: 615-22
- Honda Y, Kitaoka M. 2006. The first glycosynthase derived from an inverting glycoside hydrolase. *The Journal of biological chemistry* 281: 1426-31
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Glycans as legislators of host-microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiology* 11: 1R-10R
- Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336: 1268-73
- Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI. 1999. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive

- ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 9833-8
- Hoskisson PA, Rigali S. 2009. Chapter 1: Variation in form and function the helix-turn-helix regulators of the GntR superfamily. *Adv Appl Microbiol* 69: 1-22
- Howie PW, Forsyth JS, Ogston SA, Clark A, Florey CD. 1990. Protective effect of breast feeding against infection. *Bmj* 300: 11-6
- Hufner E, Markieton T, Chaillou S, Crutz-Le Coq AM, Zagorec M, Hertel C. 2007. Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Applied and environmental microbiology* 73: 2522-31
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schutte UM, Beck DL, et al. 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one* 6: e21313
- Hyland RM, Sun J, Griener TP, Mulvey GL, Klassen JS, et al. 2008. The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cellular microbiology* 10: 177-87
- Imperiali B, Hendrickson TL. 1995. Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase. *Bioorg Med Chem* 3: 1565-78
- Jain RK, Matta KL. 1992. Synthesis of oligosaccharides containing the X-antigenic trisaccharide (alpha-L-Fucp-(1----3)-[beta-D-Galp-(1----4)]-beta-D-GlcpNAc) at their nonreducing ends. *Carbohydrate research* 226: 91-100
- Jensen PH, Kolarich D, Packer NH. 2010. Mucin-type O-glycosylation--putting the pieces together. *FEBS J* 277: 81-94
- Johannes TW, Zhao H. 2006. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr Opin Microbiol* 9: 261-7
- Jozic D, Bourenkow G, Bartunik H, Scholze H, Dive V, et al. 2002. Crystal structure of the dinuclear zinc aminopeptidase PepV from *Lactobacillus delbrueckii* unravels its preference for dipeptides. *Structure* 10: 1097-106
- Kameyama A, Ishida H, Kiso M, Hasegawa A. 1991. Total synthesis of sialyl Lewis X. *Carbohydrate research* 209: c1-c4
- Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, et al. 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: 17193-8
- Kashyap PC, Marcobal A, Ursell LK, Smits SA, Sonnenburg ED, et al. 2013. Genetically dictated change in host mucus carbohydrate landscape exerts a diet-dependent effect on the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 17059-64
- Katayama T, Sakuma A, Kimura T, Makimura Y, Hiratake J, et al. 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: 4885-93
- Kazanov MD, Li X, Gelfand MS, Osterman AL, Rodionov DA. 2013. Functional diversification of ROK-family transcriptional regulators of sugar catabolism in the Thermotogae phylum. *Nucleic Acids Res* 41: 790-803
- Kelly RJ, Rouquier S, Giorgi D, Lennon GG, Lowe JB. 1995. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *The Journal of biological chemistry* 270: 4640-9

- King MJ. 1994. Blood group antigens on human erythrocytes-distribution, structure and possible functions. *Biochimica et biophysica acta* 1197: 15-44
- Kitaoka M, Tian J, Nishimoto M. 2005. Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Applied and environmental microbiology* 71: 3158-62
- Kittl R, Withers SG. 2010. New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydrate research* 345: 1272-9
- Kleerebezem M, Vaughan EE. 2009. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annu Rev Microbiol* 63: 269-90
- Kobata A. 2010. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 86: 731-47
- Koeller KMW, C.H. 2000. Emerging themes in medicinal glycoscience. *Nat Biotechnol*
- Koropatkin NM, Cameron EA, Martens EC. 2012. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 10: 323-35
- Koskenniemi K, Laakso K, Koponen J, Kankainen M, Greco D, et al. 2011. Proteomics and transcriptomics characterization of bile stress response in probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10: M110 002741
- Landete JM, Ferrer S, Monedero V, Zuniga M. 2013. Malic enzyme and malolactic enzyme pathways are functionally linked but independently regulated in *Lactobacillus casei* BL23. *Applied and environmental microbiology* 79: 5509-18
- Larsson EA, Urbina F, Yang Z, Weintraub A, Widmalm G. 2004. Structural and immunochemical relationship between the O-antigenic polysaccharides from the enteroaggregative *Escherichia coli* strain 396/C-1 and *Escherichia coli* O126. *Carbohydrate research* 339: 1491-6
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. 2010. Adaptation factors of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Beneficial microbes* 1: 335-42
- Lee WH, Chin YW, Han NS, Kim MD, Seo JH. 2011. Enhanced production of GDP-L-fucose by overexpression of NADPH regenerator in recombinant *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 91: 967-76
- Lee WH, Han NS, Park YC, Seo JH. 2009. Modulation of guanosine 5'-diphosphate-D-mannose metabolism in recombinant *Escherichia coli* for production of guanosine 5'-diphosphate-L-fucose. *Bioresour Technol* 100: 6143-8
- Lee WH, Shin SY, Kim MD, Han NS, Seo JH. 2012. Modulation of guanosine nucleotides biosynthetic pathways enhanced GDP-L-fucose production in recombinant *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 93: 2327-34
- Leloup L, Ehrlich SD, Zagorec M, Morel-Deville F. 1997. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the ptsI and lacL genes. *Applied and environmental microbiology* 63: 2117-23
- Leonard R, Pabst M, Bondili JS, Chambat G, Veit C, et al. 2008. Identification of an Arabidopsis gene encoding a GH95 alpha1,2-fucosidase active on xyloglucan oligo- and polysaccharides. *Phytochemistry* 69: 1983-8
- Levander L, Gunnarsson P, Grenegard M, Ryden I, Pahlsson P. 2009. Effects of alpha1-acid glycoprotein fucosylation on its Ca²⁺ mobilizing capacity in neutrophils. *Scand J Immunol* 69: 412-20

- Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, Popovic M, Parker E, et al. 2015. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 3: 13
- Liu B, Newburg DS. 2013. Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeeding medicine : the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine* 8: 354-62
- Liu SQ, Holland R, Crow VL. 2003. The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *Int J Food Microbiol* 86: 257-69
- Liu Y, Guan C, Aronson NN, Jr. 1998. Site-directed mutagenesis of essential residues involved in the mechanism of bacterial glycosylasparaginase. *The Journal of biological chemistry* 273: 9688-94
- Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. 2008. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of applied microbiology* 104: 305-44
- Mackenzie LF, Wang Q, Warren RAJ, Withers SG. 1998. Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* 120: 5583-84
- Madej MG. 2014. Function, Structure, and Evolution of the Major Facilitator Superfamily: The LacY Manifesto. *Advances in Biology* 2014: 1-20
- Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, Muylaert D, Kubota H, et al. 2011. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and environmental microbiology* 77: 6788-93
- Manson JM, Rauch M, Gilmore MS. 2008. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 635: 15-28
- Manzoor I, Shafeeq S, Afzal M, Kuipers OP. 2015. Fucose-Mediated Transcriptional Activation of the fcs Operon by FcsR in *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 25: 120-8
- Martens EC, Chiang HC, Gordon JI. 2008. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell host & microbe* 4: 447-57
- Martin-Sosa S, Martin MJ, Hueso P. 2002. The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *The Journal of nutrition* 132: 3067-72
- Martin R, Heilig GH, Zoetendal EG, Smidt H, Rodriguez JM. 2007. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of applied microbiology* 103: 2638-44
- Martin R, Jimenez E, Heilig H, Fernandez L, Marin ML, et al. 2009. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology* 75: 965-9
- Martin V, Maldonado-Barragan A, Moles L, Rodriguez-Banos M, Campo RD, et al. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact* 28: 36-44
- McCarter JD, Withers SG. 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current opinion in structural biology* 4: 885-92
- Meister A. 1990. On the transamination of enzymes. *Ann N Y Acad Sci* 585: 13-31

- Misonou Y, Shida K, Korekane H, Seki Y, Noura S, et al. 2009. Comprehensive clinico-glycomic study of 16 colorectal cancer specimens: elucidation of aberrant glycosylation and its mechanistic causes in colorectal cancer cells. *Journal of proteome research* 8: 2990-3005
- Monteagudo-Mera A, Caro I, Rodriguez-Aparicio LB, Rua J, Ferrero MA, Garcia-Armesto MR. 2011. Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *J Food Prot* 74: 1379-86
- Montel MC, Seronie MP, Talon R, Hebraud M. 1995. Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus sake*. *Applied and environmental microbiology* 61: 837-9
- Moran AP, Gupta A, Joshi L. 2011. Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60: 1412-25
- Morrow AL, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Lutter C, et al. 1999. Efficacy of home-based peer counselling to promote exclusive breastfeeding: a randomised controlled trial. *Lancet* 353: 1226-31
- Morrow AL, Rangel JM. 2004. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. *Semin Pediatr Infect Dis* 15: 221-8
- Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. 2005. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *The Journal of nutrition* 135: 1304-7
- Murata T, Morimoto S, Zeng X, Watanabe S, Usui T. 1999. Enzymatic synthesis of alpha-L-fucosyl-N-acetyllactosamines and 3'-O-alpha-L-fucosyllactose utilizing alpha-L-fucosidases. *Carbohydrate research* 320: 192-9
- Murray BW, Takayama S, Schultz J, Wong CH. 1996. Mechanism and specificity of human alpha-1,3-fucosyltransferase V. *Biochemistry* 35: 11183-95
- Nannemann DP, Birmingham WR, Scism RA, Bachmann BO. 2011. Assessing directed evolution methods for the generation of biosynthetic enzymes with potential in drug biosynthesis. *Future Med Chem* 3: 809-19
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 11: 142-201
- Naumoff DG. 2011. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochemistry. Biokhimiia* 76: 622-35
- Newburg DS. 1996. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1: 271-83
- Newburg DS. 2005. Innate immunity and human milk. *The Journal of nutrition* 135: 1308-12
- Newburg DS. 2009. Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *Journal of animal science* 87: 26-34
- Newburg DS. 2013. Glycobiology of human milk. *Biochemistry. Biokhimiia* 78: 771-85
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual review of nutrition* 25: 37-58
- Nishimoto M, Kitaoka M. 2007. Identification of N-acetylhexosamine 1-kinase in the complete lacto-N-biose I/galacto-N-biose metabolic pathway in *Bifidobacterium longum*. *Applied and environmental microbiology* 73: 6444-9
- Nishimura JS, Manning JM, Meister A. 1962. Studies on the mechanism of activation acid beta-decarboxylase by alpha-keto acids and pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry* 1: 442-7
- Noronkoski T, Mononen I. 1997. Influence of L-fucose attached alpha 1-->6 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine on the hydrolysis of the N-glycosidic linkage by human glycosylasparaginase. *Glycobiology* 7: 217-20

- Noronkoski T, Stoineva IB, Petkov DD, Mononen I. 1997. Recombinant human glycosylasparaginase catalyzes hydrolysis of L-asparagine. *FEBS letters* 412: 149-52
- Norris GE, Stillman TJ, Anderson BF, Baker EN. 1994. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosylasparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure* 2: 1049-59
- Nougayrede JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular microbiology* 5: 359-72
- Nova E, Perez de Heredia F, Gomez-Martinez S, Marcos A. 2016. The Role of Probiotics on the Microbiota: Effect on Obesity. *Nutr Clin Pract* 31: 387-400
- Novogrodsky A, Nishimura JS, Meister A. 1963. Transamination and beta-decarboxylation of aspartate catalyzed by the same pyridoxal phosphate-enzyme. *The Journal of biological chemistry* 238: 1903-5
- O'Callaghan J, O'Toole PW. 2013. *Lactobacillus*: host-microbe relationships. *Curr Top Microbiol Immunol* 358: 119-54
- Ochoa TJ, Contreras CA. 2011. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current opinion in infectious diseases* 24: 478-83
- Okamoto R, Izumi M, Kajihara Y. 2014. Decoration of proteins with sugar chains: recent advances in glycoprotein synthesis. *Current opinion in chemical biology* 22: 92-9
- Okuyama M. 2011. Function and structure studies of GH family 31 and 97 alpha-glycosidases. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75: 2269-77
- Osanjo G, Dion M, Drone J, Solleux C, Tran V, et al. 2007. Directed evolution of the alpha-L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an alpha-L-transfucosidase. *Biochemistry* 46: 1022-33
- Osumi D, Takahashi M, Miyoshi E, Yokoe S, Lee SH, et al. 2009. Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells. *Cancer Sci* 100: 888-95
- Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, et al. 2012. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature* 492: 113-7
- Panke S, Wubbolts M. 2005. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. *Current opinion in chemical biology* 9: 188-94
- Paulson JC. 1989. Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem Sci* 14: 272-6
- Perugino G, Trincone A, Rossi M, Moracci M. 2004. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends Biotechnol* 22: 31-7
- Peterson R, Cheah WY, Grinyer J, Packer N. 2013. Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology* 23: 1425-38
- Petschacher B, Nidetzky B. 2016. Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: Prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems. *J Biotechnol*
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36
- Plantinga TH, van der Does C, Driessen AJ. 2004. Transporter's evolution and carbohydrate metabolic clusters. *Trends Microbiol* 12: 4-7
- Plummer TH, Jr., Elder JH, Alexander S, Phelan AW, Tarentino AL. 1984. Demonstration of peptide:N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. *The Journal of biological chemistry* 259: 10700-4

- Plummer TH, Jr., Tarentino AL. 1991. Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*. *Glycobiology* 1: 257-63
- Poolman B, Konings WN. 1993. Secondary solute transport in bacteria. *Biochimica et biophysica acta* 1183: 5-39
- Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR. 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* 57: 543-94
- Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. 2014. Intestinal microbiota, diet and health. *The British journal of nutrition* 111: 387-402
- Pridmore RD, Berger B, Desiere F, Vilanova D, Barretto C, et al. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 2512-17
- Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 38: 996-1047
- Renzi F, Manfredi P, Mally M, Moes S, Jenó P, Cornelis GR. 2011. The N-glycan glycoprotein deglycosylation complex (Gpd) from *Capnocytophaga canimorsus* deglycosylates human IgG. *PLoS pathogens* 7: e1002118
- Reunanen J, von Ossowski I, Hendrickx AP, Palva A, de Vos WM. 2012. Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and environmental microbiology* 78: 2337-44
- Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. 2002. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *The Journal of biological chemistry* 277: 12507-15
- Rigali S, Nothaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, et al. 2006. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular microbiology* 61: 1237-51
- Rodionova IA, Yang C, Li X, Kurnasov OV, Best AA, et al. 2012. Diversity and versatility of the *Thermotoga maritima* sugar kinome. *Journal of bacteriology* 194: 5552-63
- Rodriguez-Angeles G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*
- Rodriguez-Diaz J, Carbajo RJ, Pineda-Lucena A, Monedero V, Yebra MJ. 2013. Synthesis of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides by transfucosylation using alpha-L-fucosidases from *Lactobacillus casei*. *Applied and environmental microbiology* 79: 3847-50
- Rodriguez-Diaz J, Monedero V, Yebra MJ. 2011. Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Applied and environmental microbiology* 77: 703-5
- Rodriguez-Diaz J, Rubio-del-Campo A, Yebra MJ. 2012. *Lactobacillus casei* ferments the N-Acetylglucosamine moiety of fucosyl-alpha-1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Applied and environmental microbiology* 78: 4613-9
- Rodriguez-Diaz J, Yebra MJ. 2011. Enhanced UDP-glucose and UDP-galactose by homologous overexpression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactobacillus casei*. *J Biotechnol* 154: 212-5
- Ruiz-Moyano S, Totten SM, Garrido DA, Smilowitz JT, German JB, et al. 2013. Variation in consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated strains of *Bifidobacterium breve*. *Applied and environmental microbiology* 79: 6040-9
- Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Ramos P, Chavez-Munguia B, Newburg DS. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1,

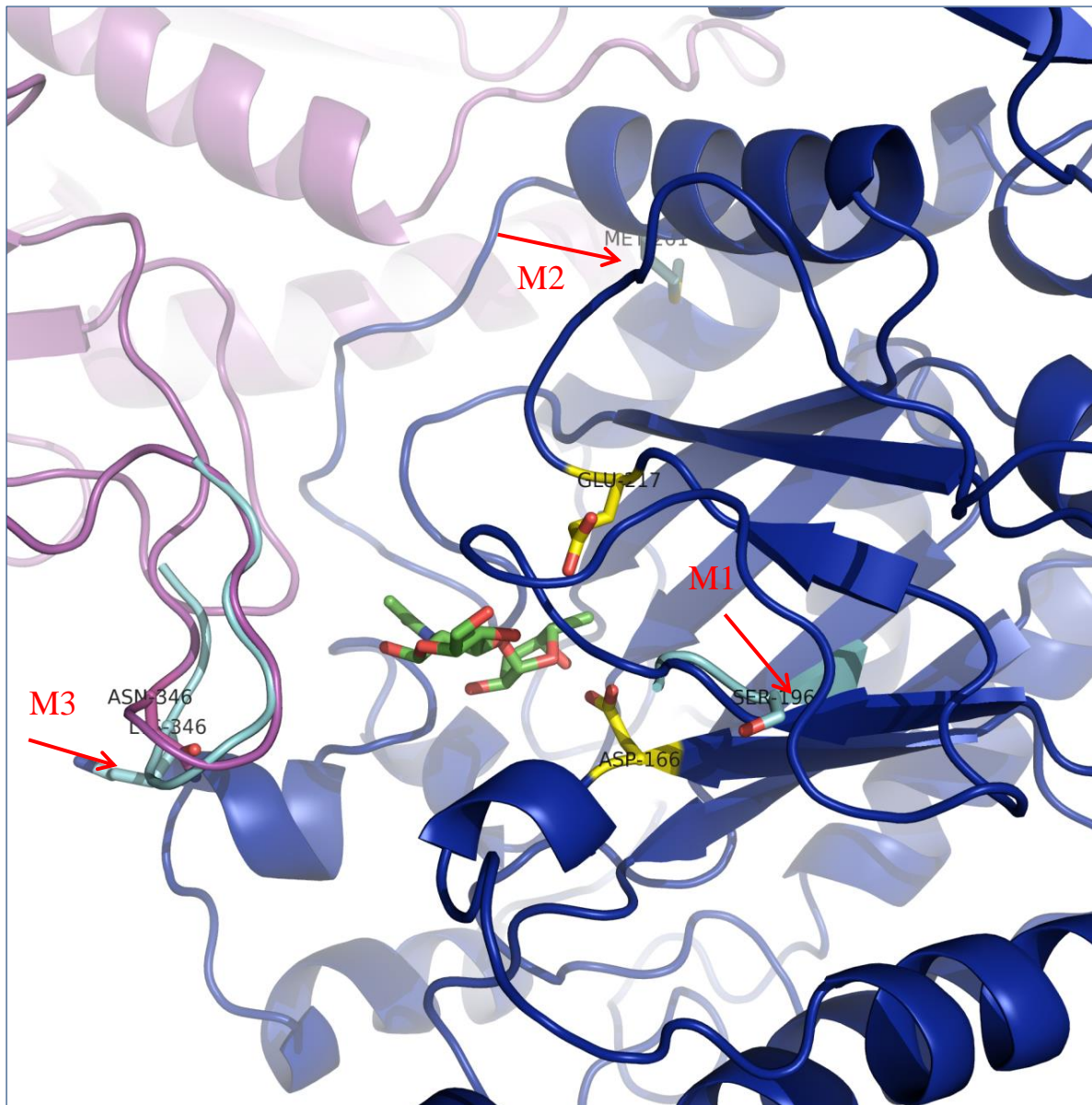
- 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *The Journal of biological chemistry* 278: 14112-20
- Rye CS, Withers SG. 2000. Glycosidase mechanisms. *Current opinion in chemical biology* 4: 573-80
- Saier MH, Jr. 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular microbiology* 35: 699-710
- Sakurama H, Fushinobu S, Hidaka M, Yoshida E, Honda Y, et al. 2012a. 1,3-1,4-alpha-L-fucosyltransferase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *The Journal of biological chemistry* 287: 16709-19
- Sakurama H, Tsutsumi E, Ashida H, Katayama T, Yamamoto K, Kumagai H. 2012b. Differences in the substrate specificities and active-site structures of two alpha-L-fucosidases (glycoside hydrolase family 29) from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 76: 1022-4
- Salyers AA, West SE, Vercellotti JR, Wilkins TD. 1977. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Applied and environmental microbiology* 34: 529-33
- Samuel G, Reeves P. 2003. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydrate research* 338: 2503-19
- Sanchez B, Saad N, Schmitter JM, Bressollier P, Urdaci MC. 2010. Adhesive properties, extracellular protein production, and metabolism in the *Lactobacillus rhamnosus* GG strain when grown in the presence of mucin. *Journal of microbiology and biotechnology* 20: 978-84
- Sankar SA, Lagier JC, Pontarotti P, Raoult D, Fournier PE. 2015. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Syst Appl Microbiol* 38: 276-86
- Sanz Y. 2011. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *The American journal of clinical nutrition* 94: 2000S-05S
- Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current opinion in biotechnology* 16: 204-11
- Sela DA, Chapman J, Adeuya A, Kim JH, Chen F, et al. 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: 18964-9
- Sela DA, Garrido D, Lerno L, Wu S, Tan K, et al. 2012. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 alpha-fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied and environmental microbiology* 78: 795-803
- Senerwa D, Olsvik O, Mutanda LN, Lindqvist KJ, Gathuma JM, et al. 1989. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. *Journal of clinical microbiology* 27: 1307-11
- Seto NO, Compston CA, Evans SV, Bundle DR, Narang SA, Palcic MM. 1999. Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS* 259: 770-5
- Shao J, Li M, Jia Q, Lu Y, Wang PG. 2003. Sequence of *Escherichia coli* O128 antigen biosynthesis cluster and functional identification of an alpha-1,2-fucosyltransferase. *FEBS letters* 553: 99-103
- Sharon N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et biophysica acta* 1760: 527-37

- Smilowitz JT, Lebrilla CB, Mills DA, German JB, Freeman SL. 2014. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annual review of nutrition* 34: 143-69
- Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, et al. 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 307: 1955-9
- Soto A, Martin V, Jimenez E, Mader I, Rodriguez JM, Fernandez L. 2014. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 59: 78-88
- Stahl M, Friis LM, Nothaft H, Liu X, Li J, et al. 2011. L-fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 7194-9
- Stowell SR, Arthur CM, Dias-Baruffi M, Rodrigues LC, Gourdine JP, et al. 2010. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nature medicine* 16: 295-301
- Svensson SC, Thiem J. 1990. Purification of alpha-L-fucosidase by C-glycosylic affinity chromatography, and the enzymic synthesis of alpha-L-fucosyl disaccharides. *Carbohydrate research* 200: 391-402
- Sybesma W, Molenaar D, van IJW, Venema K, Kort R. 2013. Genome instability in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and environmental microbiology* 79: 2233-9
- Tammam JD, Williams AG, Noble J, Lloyd D. 2000. Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus spp.* isolated from cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol* 30: 370-4
- Tan P, Sasaki M, Bosman BW, Iwasaki T. 1995. Purification and Characterization of a Dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. *Applied and environmental microbiology* 61: 3430-5
- Tao N, Wu S, Kim J, An HJ, Hinde K, et al. 2011. Evolutionary glycomics: characterization of milk oligosaccharides in primates. *Journal of proteome research* 10: 1548-57
- Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH, Jr. 1985. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24: 4665-71
- Tarentino AL, Quinones G, Trumble A, Changchien LM, Duceman B, et al. 1990. Molecular cloning and amino acid sequence of peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase from *flavobacterium meningosepticum*. *The Journal of biological chemistry* 265: 6961-6
- Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier MH, Jr. 1994. Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology* 140 (Pt 9): 2349-54
- Tretter V, Altmann F, Marz L. 1991. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1---3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *European journal of biochemistry / FEBS* 199: 647-52
- Turroni F, Bottacini F, Foroni E, Mulder I, Kim JH, et al. 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: 19514-9
- Underwood MA, Kalanetra KM, Bokulich NA, Mirmiran M, Barile D, et al. 2014. Prebiotic oligosaccharides in premature infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 58: 352-60

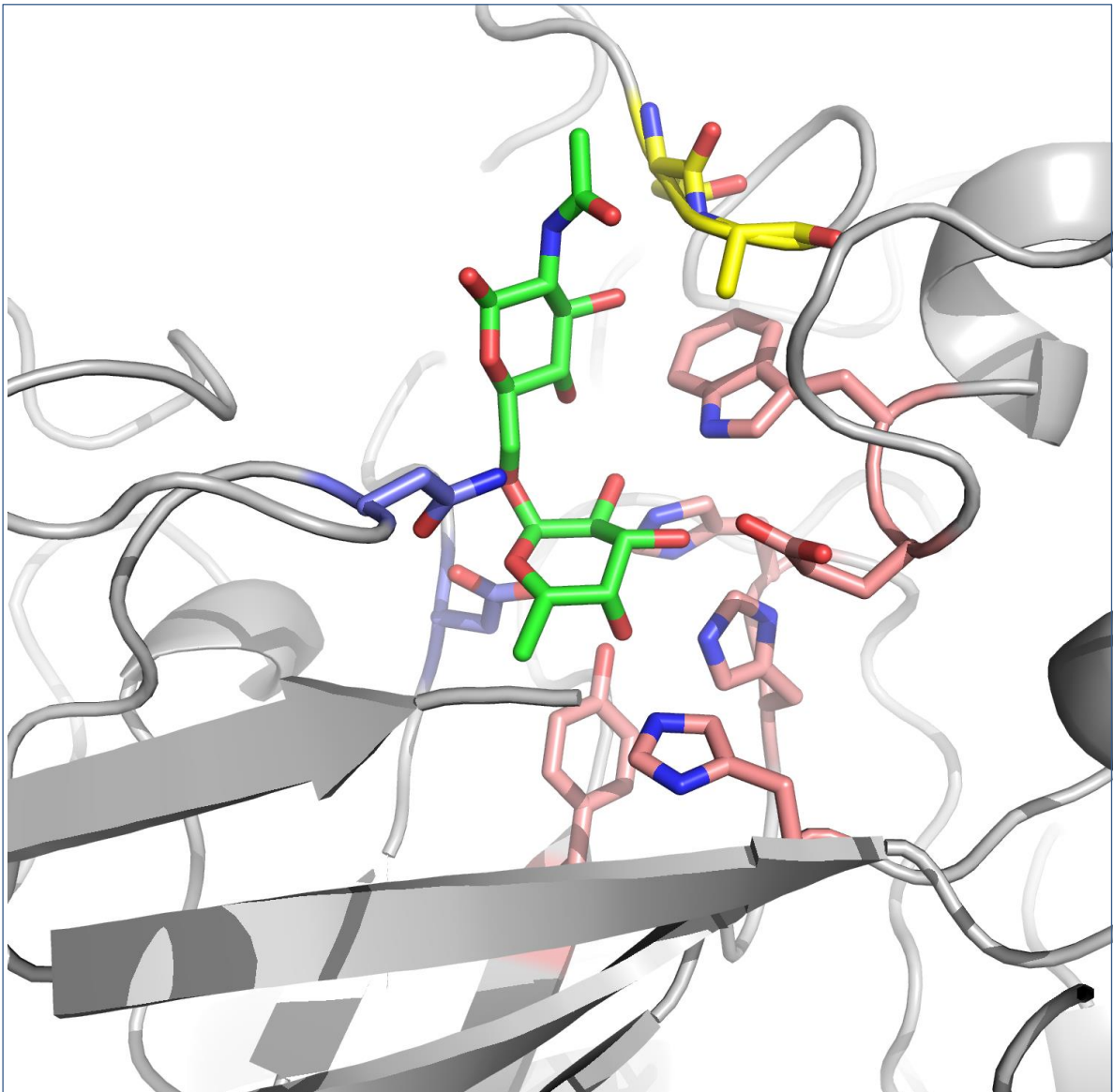
- Upreti RK, Kumar M, Shankar V. 2003. Bacterial glycoproteins: functions, biosynthesis and applications. *Proteomics* 3: 363-79
- Urashima T, Saito T, Nakamura T, Messer M. 2001. Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconjugate journal* 18: 357-71
- Varki A. 1993. <Biological roles of oligosaccharides all of the theories are correct.pdf>. *Glycobiology*
- Vetere A, Galateo C, Paoletti S. 1997. All-aqueous, regiospecific transglycosylation synthesis of 3-O-alpha-L-fucopyranosyl-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, a building block for the synthesis of branched oligosaccharides. *Biochemical and biophysical research communications* 234: 358-61
- Viana R, Monedero V, Dossonnet V, Vadeboncoeur C, Perez-Martinez G, Deutscher J. 2000. Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Molecular microbiology* 36: 570-84
- Vongerichten KF, Klein JR, Matern H, Plapp R. 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of pepV, a carnosinase gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 7290, and partial characterization of the enzyme. *Microbiology* 140 (Pt 10): 2591-600
- Voreades N, Kozil A, Weir TL. 2014. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol* 5: 494
- Wacklin P, Makivuokko H, Alakulppi N, Nikkila J, Tenkanen H, et al. 2011. Secretor genotype (FUT2 gene) is strongly associated with the composition of Bifidobacteria in the human intestine. *PloS one* 6: e20113
- Wada J, Ando T, Kiyohara M, Ashida H, Kitaoka M, et al. 2008a. *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Applied and environmental microbiology* 74: 3996-4004
- Wada J, Honda Y, Nagae M, Kato R, Wakatsuki S, et al. 2008b. 1,2-alpha-l-Fucosynthase: a glycosynthase derived from an inverting alpha-glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS letters* 582: 3739-43
- Walter J, Ley R. 2011. The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol* 65: 411-29
- Wang CC, Zulueta MM, Hung SC. 2011. Regioselective one-pot protection and protection-glycosylation of carbohydrates. *Chimia (Aarau)* 65: 54-8
- Wang L, Cao H, Liu L, Wang B, Walker WA, et al. 2014. Activation of epidermal growth factor receptor mediates mucin production stimulated by p40, a *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived protein. *The Journal of biological chemistry* 289: 20234-44
- Wang L, Curd H, Qu W, Reeves PR. 1998. Sequencing of *Escherichia coli* O111 O-antigen gene cluster and identification of O111-specific genes. *Journal of clinical microbiology* 36: 3182-7
- Wang LX, Huang W. 2009. Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Current opinion in chemical biology* 13: 592-600
- Wang M, Li M, Wu S, Lebrilla CB, Chapkin RS, et al. 2015. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 60: 825-33
- Wang NC, Lee CY. 2006. Molecular cloning of the aspartate 4-decarboxylase gene from *Pseudomonas sp.* ATCC 19121 and characterization of the bifunctional recombinant enzyme. *Applied microbiology and biotechnology* 73: 339-48

- Wang NC, Lee CY. 2007. Enhanced transaminase activity of a bifunctional L-aspartate 4-decarboxylase. *Biochemical and biophysical research communications* 356: 368-73
- Ward RE, Ninonuevo M, Mills DA, Lebrilla CB, German JB. 2006. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied and environmental microbiology* 72: 4497-9
- Weerapana E, Imperiali B. 2006. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 16: 91R-101R
- Werz DB. 2012. Chemical synthesis of carbohydrates and their surface immobilization: a brief introduction. *Methods Mol Biol* 808: 13-29
- Werz DB, Seeberger PH. 2005. Carbohydrates as the next frontier in pharmaceutical research. *Chemistry* 11: 3194-206
- White WJ, Jr., Schray KJ, Legler G, Alhadef JA. 1987. Further studies on the catalytic mechanism of human liver alpha-L-fucosidase. *Biochimica et biophysica acta* 912: 132-8
- Whitfield C. 2006. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual review of biochemistry* 75: 39-68
- Witte MD, van der Marel GA, Aerts JM, Overkleeft HS. 2011. Irreversible inhibitors and activity-based probes as research tools in chemical glycobiology. *Org Biomol Chem* 9: 5908-26
- Xiao JZ, Takahashi S, Nishimoto M, Odamaki T, Yaeshima T, et al. 2010. Distribution of in vitro fermentation ability of lacto-N-biose I, a major building block of human milk oligosaccharides, in bifidobacterial strains. *Applied and environmental microbiology* 76: 54-9
- Yan F, Polk DB. 2012. GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health. *Functional food reviews* 4: 77-84
- Yoshida E, Sakurama H, Kiyohara M, Nakajima M, Kitaoka M, et al. 2012. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* uses two different beta-galactosidases for selectively degrading type-1 and type-2 human milk oligosaccharides. *Glycobiology* 22: 361-8
- Yu ZT, Chen C, Kling DE, Liu B, McCoy JM, et al. 2013a. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* 23: 169-77
- Yu ZT, Chen C, Newburg DS. 2013b. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology* 23: 1281-92
- Zechel DL, Withers SG. 2000. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Accounts of chemical research* 33: 11-8
- Zechel DL, Withers SG. 2001. Dissection of nucleophilic and acid-base catalysis in glycosidases. *Current opinion in chemical biology* 5: 643-9
- Zomer AL, Buist G, Larsen R, Kok J, Kuipers OP. 2007. Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of bacteriology* 189: 1366-81

ANEXOS



Anexo 1. Estructura 3D obtenida por cristalización y difracción de rayos X de la variante M58 procedente de la α -L-fucosidasa AlfB de *L. casei* BL23. Cada una de las mutaciones se indica con las flechas [M1 (N196S), M2 (V261M) y M3 (N346K)]. Los residuos catalíticos (Asp166 y Glu217) se muestran en amarillo. La mutación 3 se encuentra en una subunidad contigua adyacente al centro activo que forma un *loop*, el cual se superpone con el de la enzima silvestre (violeta). El disacárido Fuc- α -1,3-GlcNAc (verde) se encuentra en el centro activo.



Anexo 2. Estructura 3D obtenida por cristalización y difracción de rayos X de la α -L-fucosidasa AlfC de *L. casei* BL23. En esta estructura tridimensional se muestran las diferentes interacciones que se forman entre los residuos del centro activo y el disacárido Fuc- α -1,6-GlcNAc (verde). Residuos catalíticos (morado), residuos que interaccionan con la fucosa (rosa), residuo que interacciona con GlcNAc (amarillo).

1	ATGACAGAACCATTACCGCGCATTCAACATTATGAGGACCTTGGCCTAGGATTGTTTATT
1	M T E P L P R I Q H Y E D L G L G L F I
61	CACTGGGGCCTATATTCTCAGATGGCAGTTGGTGAGTGGACGGAACCTATTCACCATCGC
21	H W G L Y S Q M A V G E W T E L I H H R
121	AATCAGCATGACTATGAGCAGTTGATTAAGACTTTTACGGCTGCACAATTTGATGCAAAA
41	N Q H D Y E Q L I K T F T A A Q F D A K
181	AAAATCGCTCACGCCGCAAAGCGGTGGGCGCAAAGTATATTGTTTTAACGACTAAGCAT
61	K I A H A A K A V G A K Y I V L T T K H
241	CATGAAGGTTTTTTTTCTTTATGACACGAAGGGATTAAGCGATTTTGATGTCATGCATGCG
81	H E G F F L Y D T K G L S D F D V M H A
301	CCAGCAAGACGAGATTTGATTGCCGAATTCGTGGCGGCTTGTCTGGAAGAAGACCTGTTA
101	P A R R D L I A E F V A A C R E E D L L
361	CCATTCTTTTATATGGCCACCTATGATTGGCACACACCGTTATATGATGATGATTTTCCG
121	P F F Y M A T Y D W H T P L Y D D D F P
421	GCGTATTTAACGTATCTGCAAAAATCGGTTGAGGTGCTATGTGCGCAACTATGGCCAGTT
141	A Y L T Y L Q K S V E V L C R N Y G P V
481	GGCGGGTTTTGGTTTGACGGCAACTGGAACAAAAAAGACGCTGATTGGCATCTGCCTGAA
161	G G F W F D G N W N K K D A D W H L P E
541	CTGTATGGCATGATTCGGCATTATCAACCTAACGCGATCATTGTGA G CAATACCGGCTTA
181	L Y G M I R H Y Q P N A I I V S N T G L
601	AAGAATCGCGCCAGGTGAGTGATCCGAAATGATGTGGTGACTTACGAGCGACGCACA
201	K N R G Q V S D P E I D V V T Y E R R T
661	CCTGATGAGATTTACCACGGTGCTCCGAACGAAAAATATGTTGCTGGTGAAATTTCAATC
221	P D E I Y H G A P N E K Y V A G E I S I
721	ACCTTAAATCAACATTGGGGCATCGCTGCCAACGATCTTAACTATAAGTCGCCTGCTGAG
241	T L N Q H W G I A A N D L N Y K S P A E
781	G ← Mutación 2 A T G A T T G A A C G G T C G C A C A T G C G C G G C A T A T T G G C G T A A C A T C T T G G T C A A T A T T G G T
261	M I E T V A H A R H I G A N I L V N I G
841	CTAACAGGGACAGGCGCTATTCCTGCCGAGCGCAAACCTACATGCACCTACTAGGACGA
281	L T G T G A I P A A A Q T Y M H L L G R
901	TGGACAGCGATGGCGGCACCCGTGTTGTACAAAGGCCGACCTGTGCCAGTAACTTCGGCA
301	W T A M A A P V L Y K G R P V P V T S A
961	CATGGTACGCGTGACTTTGTCTTGACACATCGAAGCATGATTTTTTATGTATTTTGGAC
321	H G T R D F V L H T S K H D F L C I L D
1021	Mutación 3 → T CTGCAAGTTGTCGGTA A G A T A A T G T G G T G C T T G G C G G T G A A G G G G T T A A T C C G C G T T C G
341	L Q V V G K D N V V L G G E G V N P R S
1081	TTTGTGGCATTTGGTCAACCAATTCAGCGCATTCACCTGGCTAGATAATGATGAAGTGCTG
361	F V G I G Q P I Q R I H W L D N D E V L

1141	AGTTTTACGCAAGATCTAGATAAAAAGGTTCTCACAGTTGATGCAACGGGTTATCCTTAT
381	S F T Q D L D K K V L T V D A T G Y P Y
1201	GGGAGTGACTGGGTGGTTCGAATTGCCCAAATAGATTACGAGTAA
401	G S D W V V R I A Q I D Y E *

Anexo 3. Secuencia de la variante M58 procedente de la α -L-fucosidasa AlfB de *L. casei* BL23. El codón que contiene cada una de las mutaciones se encuentra encuadrado indicando el nucleótido/aminoácido sustituido (verde) por el nuevo (rojo). Mutación 1 (N196S), mutación 2 (V261M) y mutación 3 (N346K).

1	ATGGATTCTAAGAAACCGTTATTACAGCCAGCAACGAAACCGATTGTTTATCTTTTTGCC *****
1	ATGGATTCTAAGAAACCGTTATTACAGCCAGCAACGAAACCGATTGTTTATCTTTTTGCC
61	ATTCTTGGCGGATTTGCGGGATTATTGTATGGTTACGACTCAGGGGCGATCTCACTTGCC *****
61	ATTCTTGGCGGATTTGCGGGATTATTGTATGGTTACGACTCAGGGGCGATCTCACTTGCC
121	TTGCCATCCATAACAACCGCTTTTGGCTTAAACTCAGCAGAAAAAGGATTAGTTGTTTCG *****
121	TTGCCATCCATAACAACCGCTTTTGGCTTAAACTCAGCAGAAAAAGGATTAGTTGTTTCG
181	TTCTTACTATTTGGTGCACCTCCATCAATTGTTGTCTTTACAGCTATGGAAAAGAAGATA *****
181	TTCTTACTATTTGGTGCACCTCCATCAATTGTTGTCTTTACAGCTATGGAAAAGAAGATA
241	GAGCGGCGAAACGTTTAAACTTGGCGGTTTTATCTTCATTGGCGGTAGCATTTTTAGT *****
241	GAGCGCGA.....
301	GCTTTGTCGGCTGACACGATGATGTTGATGGTAGCTCGGTTTCATATTAGGTGTTGCAGCT
250
361	GGCATTGCCAACATGTACGGGTTGATTTATCTTTCTGAATTAGCGCCGGCTCATATCCGT
250
421	GGCTTAATGTCTTCGCTGTACCAGTTGAGTGTTAATATCGGGATTTAATGGCTTATGCT
250
481	GTCGGGGCCTATAACCTCCCGGCTGACAACTGGCGATGGACGCTTGGACTTGGGGCCATA
250
541	CCAGCTGCGGTCTTTGCTGTTGGTATGATATTGTCGCCGCAAAGTCTCGATGGTTAATT
250
601	CGTGATAATCAAGTTGAAAAAGCGCGAAGAGTGCTCAAGCGCGTGCGGATAACCGATGAC
250
661	GAGATTGAGTCAGAAATCACAGATATTCAAGATAGCTTGAAATCGCAAGAGGCTGGGTTG
250
721	CGCGAATTGTTGGCACTTTTAGACCGGTTATGATTTTGCTGTTTGTCTAACCTTCTTT
250
781	CAGGTATTTACGGGATCAATGCAGCTGTTTATTACGCACCGGAAATCTTCATAACTTA
250
841	GGAATGGCTAATGCTAGCATTCTCGCTGACTTCGCTGTTGGTGGTGCCTTGGTTGTCTCC
250
901	ACCTTTTATCGCTGCCATTTATTGACCGCCTCGGGCGAAAAAGCTGTTAGAAATAAGT

```

250 .....
961 CTCGGTGGTCAAGTTCACCAGCTATTGCTTTATGTATATGGTCTGACAATGCAACGATC
250 .....
1021 GCGATTGTCGCCATTTTCGTTTATGTCTTTGCATTTGGTTTTGGATTGGGACCGGTCTTT
250 .....
1081 TGGTCCTACGTACCGGAAATTTTGCCACTTAAGGCAAGGGCACTTGGTATGGGGTTATC
250 .....
1141 ACTTTCACACAGTACCTCTTTAATGGCATTCTTTCTTTGATTTTTCCAATGTTGCTAGAG
250 .....
1201 GCTTTAGGAATTAACGTTTTCTATATTTTGGCCGCTTTGTCTGCGCTGGCCGTTTTCTAT
*****
250 .....AACGTTTTCTATATTTTGGCCGCTTTGTCTGCGCTGGCCGTTTTCTAT
1261 ATTCATAAGAATGTCCTAGAGACCAAAGGCAGAACATTGGAAGACATTGAACTCTATTGG
*****
298 ATTCATAAGAATGTCCTAGAGACCAAAGGCAGAACATTGGAAGACATTGAACTCTATTGG
1321 GAGACCAAGCAAGTATAG
*****
358 GAGACCAAGCAAGTATAG

```

Anexo 4. Secuencia del gen *fucP* de *L. rhamnous* GG silvestre (verde) y mutante obtenido mediante una delección de 963 pb (roja).

1	ATGACAAACGTGACATTCCTAAAATTGGTATTCGTCCGACGATTGATGGACGCCGGCGT
1	ATGACAAACGTGACATTCCTAAAATTGGTATTCGTCCGACGATTGATGGACGCCGGCGT
61	GGTATTCGTGAATCACTAGAAGAACAGACTATGAACATGGCCATTTCAGTTGCCAAGCTT
61	GGTATTCGTGAATCACTAGAAGAACAGACTATGAACATGGCCATTTCAGTTGCCAAGCTT
121	TTAGAATCAACCCTTAAATATCCAGATGGTTCACCTGTTTCAGACTGTTATTTCTGATTCA
121	TTAGAATCAACCCTTAAATATCCAGATGGTTCACCTGTTTCAGACTGTTATTTCTGATTCA
181	ACCATTGGCGGTGTTAAAGAAGCAGCAATGTCTAAGGAAAAATTTGATCGCGCCGGAATT
181	ACCATTGGCGGTGTTAAAGAAGCAGCAATGTCTAAGGAAAAATTTGATCGCGCCGGAATT
241	TGTGGAACCATCACAGTTACACCTTGTGGTGCTATGGCAGTGAACGATGGATATGTTCG
241	TGTGGAACCATCACAGTTACACCTTGTGGTGCTATGGCAGTGAACGATGGATATGTTCG
301	GCGGATCTACCTCATGCTATTTGGGGATTCAATGGTACAGAGCGTCTGGGGCGGTTTAT
301	GCGGATCTACCTCATGCTATTTGGGGATTCAATGGTACAGAGCGTCTGGGGCGGTTTAT
361	CTCGCAGCCGTCTTGGCAGCTCACACGCAAAGGG...AATTCAGCTTTCGGTATTTA
361	CTCGCAGCCGTCTTGGCAGCTCACACGCAAAGGG <u>AATTA</u> AATTCAGCTTTCGGTATTTA
417	CGGGCATGATGTACAAGATGCTGATGACACCACAATCCCTGAAGATGTAAAAACAAAAAT
421	CGGGCATGATGTACAAGATGCTGATGACACCACAATCCCTGAAGATGTAAAAACAAAAAT
477	TATCCGGTTTGCTAAAGGAGCATTGGCAGCGGGTTTGATGCGAAATAAGAGTTATCTTTC
481	TATCCGGTTTGCTAAAGGAGCATTGGCAGCGGGTTTGATGCGAAATAAGAGTTATCTTTC
537	GATTGGCGGCGTAGCGATGGGAATTGCAGGTTCAACGGTAGATCCAGACTTTTTCCAAGA
541	GATTGGCGGCGTAGCGATGGGAATTGCAGGTTCAACGGTAGATCCAGACTTTTTCCAAGA
597	ATATCTAGGGATGCGGAATGAATACGTCGATATGTCAGAAATAGTTCGTCGTTGGGACGA
601	ATATCTAGGGATGCGGAATGAATACGTCGATATGTCAGAAATAGTTCGTCGTTGGGACGA
657	AGGCATTTATGATCAAGAAGAGTTCAAAAAAGCAATGGCGTGGGCAGAAAAGAATACACC
661	AGGCATTTATGATCAAGAAGAGTTCAAAAAAGCAATGGCGTGGGCAGAAAAGAATACACC
717	AATCGGCCCGGATATTTATAACGAAAAAGATCCTAACAAGTTCAGTGAAGAGAAGCA
721	AATCGGCCCGGATATTTATAACGAAAAAGATCCTAACAAGTTCAGTGAAGAGAAGCA
777	TGAACAATTGGCTAACTGTATCAAAATGACGATCATGCTCGTGATCTGATGGATGGTAA
781	TGAACAATTGGCTAACTGTATCAAAATGACGATCATGCTCGTGATCTGATGGATGGTAA
837	CGAAAAATTAGCAGACCTTGGTTTTAAAGAAGAAGCGGAAGGTCATAATGCAATTGCTGC
841	CGAAAAATTAGCAGACCTTGGTTTTAAAGAAGAAGCGGAAGGTCATAATGCAATTGCTGC
897	AGGATTCAGGGCAACGACAATGGACAGATCATTTTCCTAATGGCGATTACATGGAAGC

```

*****
901  AGGATTCCAGGGGCAACGACAATGGACAGATCATTTTCCTAATGGCGATTACATGGAAGC
957  CTTTCATGAACTCTCAGTATGATTGGAATGGCATTTCATCAACCGCACGTATTTGCTACTGA
*****
961  CTTTCATGAACTCTCAGTATGATTGGAATGGCATTTCATCAACCGCACGTATTTGCTACTGA
1017 AAATGACTCGTTGAATGGTGCTTCAATGTTATTCAATTATTTACTAACCAACACGCCGCA
*****
1021 AAATGACTCGTTGAATGGTGCTTCAATGTTATTCAATTATTTACTAACCAACACGCCGCA
1077 AATCTTTGCTGATGTGCGGACATATTGGAGCCCTGAAGCTGTTGAACGAGTGACAGGCAC
*****
1081 AATCTTTGCTGATGTGCGGACATATTGGAGCCCTGAAGCTGTTGAACGAGTGACAGGCAC
1137 TAAACTTGAGGGATTGGCTAAGCATGGGTTTCCTGCATCTATCGAATTCCTGGAGCCCAAAC
*****
1141 TAAACTTGAGGGATTGGCTAAGCATGGGTTTCCTGCATCTATCGAATTCCTGGAGCCCAAAC
1197 ACTTGATGCGACAGGCCGAGAGACGATCAATGGCGAACCGGCTATTAAACCTTTTTACGA
*****
1201 ACTTGATGCGACAGGCCGAGAGACGATCAATGGCGAACCGGCTATTAAACCTTTTTACGA
1257 ATTATCCGAACAAGAAGCGCAGGCTAATTTAACACACACGCGGTGGATCCCAGCAAATAT
*****
1261 ATTATCCGAACAAGAAGCGCAGGCTAATTTAACACACACGCGGTGGATCCCAGCAAATAT
1317 TGGTTACTTCCGTGGCGGTGGTTTTTTCTTCTAACTATGTAACACGTGGTGGAGAACAAGG
*****
1321 TGGTTACTTCCGTGGCGGTGGTTTTTTCTTCTAACTATGTAACACGTGGTGGAGAACAAGG
1377 GATGCCTGTTACCATGAGCCGGATTAATCTTGTCAAAGGTGTCGGTCCAGAATTACAGAT
*****
1381 GATGCCTGTTACCATGAGCCGGATTAATCTTGTCAAAGGTGTCGGTCCAGAATTACAGAT
1437 TGCAGAGGGTTTTGCGGTAGATCTTCTGAAAATGTGTTTGACATCATCAACAAGCGAAC
*****
1441 TGCAGAGGGTTTTGCGGTAGATCTTCTGAAAATGTGTTTGACATCATCAACAAGCGAAC
1497 AGATCCGGGTGGCCGTCAACATTCTTTGTTCCAATTTTGACGGGACATGGCGCGTTTTAA
*****
1501 AGATCCGGGTGGCCGTCAACATTCTTTGTTCCAATTTTGACGGGACATGGCGCGTTTTAA
1557 GTCTGTCTATGATGTGATGGATAACTGGGGAGCTAATCACGGTTCGATTAGTTACGGTCA
*****
1561 GTCTGTCTATGATGTGATGGATAACTGGGGAGCTAATCACGGTTCGATTAGTTACGGTCA
1617 TATTGGTGCAGACTTAATAACGTTGGCTTCGATTTTACGAATTCAGTTAACATGCATAA
*****
1621 TATTGGTGCAGACTTAATAACGTTGGCTTCGATTTTACGAATTCAGTTAACATGCATAA
1677 TGTGCCGAATCCAGTATTTTCCGTCCGCGAGCATGGGCATCACTAGGTACGGAAAATCT
*****
1681 TGTGCCGAATCCAGTATTTTCCGTCCGCGAGCATGGGCATCACTAGGTACGGAAAATCT
1737 AGAGGCGGCTGACTTCAATGCATGCAAAAACCTTCGGTCCATTGTATCGATAG
*****
1741 AGAGGCGGCTGACTTCAATGCATGCAAAAACCTTCGGTCCATTGTATCGATAG

```

Anexo 5. Secuencia del gen *fucl* de *L. rhamnous* GG silvestre (verde) y mutante obtenido mediante *frameshift* (roja).

1	ATGGGAACATCAGAATTAGAACAAGAATTATATGTAAGCAGTTCAACGTTACGTCGTGAT *****
1	ATGGGAACATCAGAATTAGAACAAGAATTATATGTAAGCAGTTCAACGTTACGTCGTGAT
61	TTGATTGAATTAGAAAAGATGGACAAAGTGCGGCGTGGCTTTGGATATGTAGAACTGGTT *****
61	TTGATTGAATTAGAAAAGATGGACAAAGTGCGGCGTGGCTTTGGATATGTAGAACTGGTT
121	AAGCCTGACAATCTTGAATTGCCTTATTTATTCGCGGACAAGAAAGAGAACAAGAAAA *****
121	AAGCCTGACAATCTTGAATTGCCTTATTTATTCGCGGACAAGAAAGAGAACAAGAAAA
181	AGGCAAATTGCTGCAACGGCTAGTATCTTTTTGAGTGATAATCAAGCCATCTTCATCGAT *****
181	AGGCAAATTGCTGCAACGGCTAGTATCTTTTTGAGTGATAATCAAGCCATCTTCATCGAT
241	TCTAGTTCAACGGCATCCTTTCTAGCTCCTTATTTAGCAAAATTAATCATGTTATAGTC *****
241	TCTAGTTCAACGGCATCCTTTCTAGCTCCTTATTTAGCAAAATTAATCATGTTATAGTC
301	ATTACAAATGGTTTGCGGATTGCCGTTGCATTAGACGGTTGCCATCTATCAAGACTTTT *****
301	ATTACAAATGGTTTGCGGATTGCCGTTGCATTAGACGGTTGCCATCTATCAAGACTTTT
361	TTAACAGGAGGACGCTTGCGAATGGATCTGGGTCTATTTTGGGTGACGATTCAATTGCG *****
361	TTAACAGGAGGACGCTTGCGAATGGATCTGGGTCTATTTTGGGTGACGATTCAATTGCG
421	TTTTTAAGTAATTTTCGAGCAAATCTATTTTTTATGTCATGCGTTGGCTTGGCTGATCAC *****
421	TTTTTAAGTAATTTTCGAGCAAATCTATTTTTTATGTCATGCGTTGGCTTGGCTGATCAC
481	GGTGATTTATGTCTAGCCAGGAGCAATCAAG..... *****
481	GGTGATTTATGTCTAGCCAGGAGCAATCAAG-----pRV300-----
513CGTCAAGCGAGCGATGAT *****
4441	-----pRV300-----CGTCAAGCGAGCGATGAT
531	GCAACGAGCCGAAAAAACCATTTCTATTATGCGATCATTTCCAAGTTTGGCGTAAAAAGTTA *****
4501	GCAACGAGCCGAAAAAACCATTTCTATTATGCGATCATTTCCAAGTTTGGCGTAAAAAGTTA
591	TTATCAGTTGTGCAGTGAGCAGTCGCTTGAAGCTGTTATCACAGATGAAGATCCTGGGAT *****
4561	TTATCAGTTGTGCAGTGAGCAGTCGCTTGAAGCTGTTATCACAGATGAAGATCCTGGGAT
651	GGGTATAGGGAGAGAATTAGCAGATGCAGGCGTTGAACTCCTTGCTTAA *****
4621	GGGTATAGGGAGAGAATTAGCAGATGCAGGCGTTGAACTCCTTGCTTAA

Anexo 6. Secuencia del gen *fucR* de *L. rhamnous* GG silvestre (verde) y mutante obtenido por una inserción con el plásmido pRV300 (roja).

1	ATGGCAAATTTGAAGATGTCGCAAACGAGTTAAGCCGCCGCTTCGCGATGGTATTTAT *****
1	ATGGCAAATTTGAAGATGTCGCAAACGAGTTAAGCCGCCGCTTCGCGATGGTATTTAT
61	ACAACGAGCCAACGCCTGCCATCTGAGTACGATCTGGCAAAGAGTTTGACGTTAGCCGG *****
61	ACAACGAGCCAACGCCTGCCATCTGAGTACGATCTGGCAAAGAGTTTGACGTTAGCCGG
121	TTAACGGTTCGCAAGGCCATCGATTTGCTAATTAGGCAGCAACTGCTGGTGAAATCGCCG *****
121	TTAACGGTTCGCAAGGCCATCGATTTGCTAATTAGGCAGCAACTGCTGGTGAAATCGCCG
181	GGTAAGGGCACGTATGTCATGACATACTCTGACAAGGTGGAAAGCGGTCGACTAGGATTG *****
181	GGTAAGGGCACGTATGTCATGACATACTCTGACAAGGTGGAAAGCG.....
241	CAAGGTTTTACAGAAGCGGCCAAAGCATAACGGTAAAAAAGTCGCACCGAAGTCATCAGC
227
301	TTCGGACCGCTTGACCCCGTTCTGAAGAAATCAGCCGCGTTTTAGCACTAGATACCCGT
227
361	GTAAACAAAGAAATCGACATGTTAGTGC GGCGCCGCTTCTGGGATGAGGAACCAATGACC
227
421	GTCGAACATGTGGCGATCTGCCATGAATATGTCGCCGATTAAAGCCCCACGATTTTGAA
227
481	GGATCGCTATTTGCACTTCTGGAAAAACGCGTGGCAATTGCGTATTCGCATCAAGAAGTC
227
541	GAAGCCATGTTGATGGATAAAAAAATGGCCAACTCTTGTCATGGCAAAAAGGCGATCCG
227
601	TTGTTGCGGTTTCATTCGGTCACCTATACGGCAGATGCCAAGCCAATTCATTCGACACG
227
661	TCGTATTATCGAGCCGATAAATACTCGTTTAAGTCGACGTTAACTCGCGATACGCACTAA *****
227GTCGACGTTAACTCGCGATACGCACTAA

Anexo 7. Secuencia del gen *alfR2* de *L. casei* BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una delección de 466 pb (roja).

1	ATGTCACCATCTACCCCTGTCCACGAAGACAAGCGTTCGCCAATGTTAGCGCTTGGCATC *****
1	ATGTCACCATCTACCCCTGTCCACGAAGACAAGCGTTCGCCAATGTTAGCGCTTGGCATC
61	CTGTCGATTTTCGTTCCCTGATGTCTGTCAGCAACGCCGTCTCTGGTACGATCCCCTTGATG *****
61	CTGTCGATTTTCGTTCCCTGATGTCTGTCAGCAACGCCGTCTCTGGTACGATCCCCTTGATG
121	GAGAAATATTTCTCTGATGTCTCGCGAGCCAACGTCGAATTGCTGATCGTGATTCCGACT *****
121	GAGAAATATTTCTCTGATGTCTCGCGAGCCAACGTCGAATTGCTGATCGTGATTCCGACT
181	GGCGGTGTGTTGTTGGGTACGGTTATCAGTGGTCTGGTCTCCAATCTACTCGGAAAAAAG *****
181	GGCGGTGTGTTGTTGGGTACGGTTATCAGTGGTCTGGTCTCCAATCTACTCGGAAAAAAG
241	TACACGGTTATTGCTGGGCTATCCATTTCACTCGTTTTTGGGATCATTCCTGCCTTCATC *****
241	TACACGGTTATTGCTGGGCTATCCATTTCACTCGTTTTTGGGATCATTCCTGCCTTCATC
301	TTTAATTATCCAGCGATTTTGATTTTCGCGGGCAATGTTCCGGGTGGCATGGGGGTTTC *****
301	TTTAATTATCCAGCGATTTTGATTTTCGCGGGCAATGTTCCGGGTGGCATGGGGGTTTC
361	ACGCCACTAAGCGTTTCCTATATCACGGATCTTTTCCCTGAAGAGACACGTAATCGCCTG *****
361	ACGCCACTAAGCGTTTCCTATATCACGGATCTTTTCCCTGAAGAGACACGTAATCGCCTG
421	TTAGGCTGGCGTAATTCAGTTGGGGCGATCGGCGATTCCATCATGCTTTTCATCGCTGGC *****
421	TTAGGCTGGCGTAATTCAGTTGGGGCGATCGGCGATTCCATCATGCTTTTCATCGCTGGC
481	<i>frameshift</i> TTTCT...GATCAACATCAGTTGGCACACAACCTACTTGGTTTTCTGTTCCTATTAGT *****
481	TTTCTGATCAGTCAACATCAGTTGGCACACAACCTACTTGGTTTTCTGTTCCTATTAGT
537	CCCAATCCTCTTGGTGATGTTCTTCGTACCAAAGCATTACGACAACATTGTTTTCTGAAGA *****
541	CCCAATCCTCTTGGTGATGTTCTTCGTACCAAAGCATTACGACAACATTGTTTTCTGAAGA
597	TGGCAAGGAAGTTGAAGAAGACGTTAAGGTAAAACCGACGACCAATTTCCGGTGTATCCA *****
601	TGGCAAGGAAGTTGAAGAAGACGTTAAGGTAAAACCGACGACCAATTTCCGGTGTATCCA
657	GCTCGGTTTATTTTCTCCTTGTCTGCTTATTCTATTCCGCGATCTCACTAAAACCTGGC *****
661	GCTCGGTTTATTTTCTCCTTGTCTGCTTATTCTATTCCGCGATCTCACTAAAACCTGGC
717	GAGTACGTTGTCAACAATCACATTGGCAGTGCGGCGGCCACGCGGATCTTCGGTTT *****
721	GAGTACGTTGTCAACAATCACATTGGCAGTGCGGCGGCCACGCGGATCTTCGGTTT
777	CCTCGTCCTTTGCTCAATCTTCTCAGGGCTGATTTTTGAAAAAATCGCTAAATGGTTCGG *****
781	CCTCGTCCTTTGCTCAATCTTCTCAGGGCTGATTTTTGAAAAAATCGCTAAATGGTTCGG
837	CAAGTATACGGTCACCATTTTCTATATCATCACTGCGATTTTCGATGATTGTCATGTCCTT *****
841	CAAGTATACGGTCACCATTTTCTATATCATCACTGCGATTTTCGATGATTGTCATGTCCTT
897	CACCACTTCCATTCGGTGCTGTTGGTGCTGGTGCTGGCGGCAGGCTTCTGCAATGGCAT

```

*****
901  CACCACTTCCATTCCGGTGCTGTTGGTGCTGGTGGCGGCAGGCTTCTGCAATGGCAT
957  CATCAACCCGGCACTAACCGCGGAATGGTGCACTATTCGCCAAAAGGTTCTATGAATTT
*****
961  CATCAACCCGGCACTAACCGCGGAATGGTGCACTATTCGCCAAAAGGTTCTATGAATTT
1017 CACGACATCCATCATCATTATTGGCATCAACATCGGCTTTCTGATCGCCCCTTATTTCTT
*****
1021 CACGACATCCATCATCATTATTGGCATCAACATCGGCTTTCTGATCGCCCCTTATTTCTT
1077 CCAATTCTTCGGTGAAATGATTGGCAATGCAGGCCAGCCAATATGATTCTGTGGAGCGG
*****
1081 CCAATTCTTCGGTGAAATGATTGGCAATGCAGGCCAGCCAATATGATTCTGTGGAGCGG
1137 CATCTTCTATGTTCTGTTAGCTGTCTATGACCTTGTTCGTTGTTAAAAAAGACAAATTGAC
*****
1141 CATCTTCTATGTTCTGTTAGCTGTCTATGACCTTGTTCGTTGTTAAAAAAGACAAATTGAC
1197 CATTTAG
*****
1201 CATTTAG

```

Anexo 8. Secuencia del gen *alfH* de *L. casei* BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una *frameshift* (roja).


```

1 ATGAATGACAATGTAGCATGGTTTAAACAAGCGAAGTACGGCATGATGATCCATTGGGGC
*****
1 ATGAATGACAATGTAGCATGGTTTAAACAAGCGAAGTACGGCATGATGATCCATTGGGGC

61 CTCTATTCACTGCTAGCTGGTGAATATCGTGGCGAATCTTCCAGCGCTTATGCAGAATGG
*****
61 CTCTATTCACTGCTAGCTGGTGAATATCGTGGCGAATCTTCCAGCGCTTATGCAGAATGG

121 ATTCAGTCAAAAATTCAGATTCCTAATGCTGAGTATGGCAACTTGGCAACCGCCTTCA..
*****
121 ATTCAGTCAAAAATTCAGATTCCTAATGCTGAGTATGGCAACTTGGCAACCGCCTTCAAT

179 .....

181 -----pRV300-----
179 .....

4321 TTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGT
179 .....ATCCGCTGTACTTCGATGCCAAAAAATCGTCGCACTCGCTAAGC
*****
4381 ATCGATAAGCTTGATATCCGCTGTACTTCGATGCCAAAAAATCGTCGCACTCGCTAAGC

224 AATGCGGCATGCAGTATCTGGTGGTAACAACCTAAACACCACGATGGCTTTGCCATGTATC
*****
4441 AATGCGGCATGCAGTATCTGGTGGTAACAACCTAAACACCACGATGGCTTTGCCATGTATC

284 ACTCCAAGGTCGATGCTTATAACGTTTATGACGCCACGCCATTTACCGTGATATCATCG
*****
4501 ACTCCAAGGTCGATGCTTATAACGTTTATGACGCCACGCCATTTACCGTGATATCATCG

344 GTGAGCTGGCAGAAGCCTGTCAAAAAGCCGGGCTCAAGTTTGGCCTGTATTACTCACAAG
*****
4561 GTGAGCTGGCAGAAGCCTGTCAAAAAGCCGGGCTCAAGTTTGGCCTGTATTACTCACAAG

404 ACCTCGACTGGCAGATCCGAACGGCGGGCTACAAGTCAAACGATGTCGAAACCGCTG
*****
4621 ACCTCGACTGGCAGATCCGAACGGCGGGCTACAAGTCAAACGATGTCGAAACCGCTG

464 GCACGACTTGGGATAATAGTTGGGACTTTCCTGACGAAGATCAAAAAAATTCGATCTTT
*****
4681 GCACGACTTGGGATAATAGTTGGGACTTTCCTGACGAAGATCAAAAAAATTCGATCTTT

524 GTTTCGACAACAAGATTCTGCCGAAATCAAGGAAATCATGTGCAATTACGGTGACATTG
*****
4741 GTTTCGACAACAAGATTCTGCCGAAATCAAGGAAATCATGTGCAATTACGGTGACATTG

584 CAACAGCGTGGTTCGATGTCCCGATGACCCTGTCTGAAGCGCAAAGTCAGACCATTTACG
*****
4801 CAACAGCGTGGTTCGATGTCCCGATGACCCTGTCTGAAGCGCAAAGTCAGACCATTTACG

644 ACACCGTCCGCGAGCTGCAGCCAACTGCTTAATCAACTCACGTCTAGGCAATGGCAAAT
*****
4861 ACACCGTCCGCGAGCTGCAGCCAACTGCTTAATCAACTCACGTCTAGGCAATGGCAAAT

704 ACGACTTCGTTTCTCTGGGCGACAACGAGATCCCGAAAAACAAGAAGACATGAACAAGA
*****
4921 ACGACTTCGTTTCTCTGGGCGACAACGAGATCCCGAAAAACAAGAAGACATGAACAAGA

```

```
764 CCGACGTTGACTACAACGAAATTACTGGCTTCAAGCCTTCGCCACTGGGTCTCTACGAAA
*****
4981 CCGACGTTGACTACAACGAAATTACTGGCTTCAAGCCTTCGCCACTGGGTCTCTACGAAA

824 CTGCCGGCACCATTAATGATTCTTGGGGCTTCTCGTACCACGACCAGAATTGGAAAACAC
*****
5041 CTGCCGGCACCATTAATGATTCTTGGGGCTTCTCGTACCACGACCAGAATTGGAAAACAC

884 CACGTACCCTTTATCGCTATAAGCAACACCTCAACGATTTTGGCATCAATTATCTGCTGA
*****
5101 CACGTACCCTTTATCGCTATAAGCAACACCTCAACGATTTTGGCATCAATTATCTGCTGA

944 ACGTTGGTCTCGATCCACTGGGTCGTGTACCAATGATGGCAGAGGAGAATCTGCTGGCGG
*****
5161 ACGTTGGTCTCGATCCACTGGGTCGTGTACCAATGATGGCAGAGGAGAATCTGCTGGCGG

1004 CTAAGGCTTTGGAGGATGAAGCGAACCGATAA
*****
5221 CTAAGGCTTTGGAGGATGAAGCGAACCGATAA
```

Anexo 9. Secuencia del gen *alfC* de *L. casei* BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una inserción del plásmido pRV300 (roja).

1	ATGCAGTATTTAGCGATTGATGTTGGCGGCACAACGACAAAGTACGGTCTAGTGTCAGCG *****
1	ATGCAGTATTTAGCGATTGATGTTGGCGGCACAACGACAAAGTACGGTCTAGTGTCAGCG
61	ACAGGCGCACTATCGCAACAAGGTGAGCAGCCGACCATGCGCGCTAGTCTCGCTGATTC *****
61	ACAGGCGCACTATCGCAACAAGGTGAGCAGCCGACCATGCGCGCTAGTCTCGCTGATTC
121	ATGGCCAGTTTGACCGGTTTGATTGACTGCATAAAGCACACGTCGCGGGTATCGGGTTG *****
121	ATGGCCAGTTTGACCGGTTTGATTGACTGCATAAAGCACACGTCGCGGGTATCGGGTTG
181	GCTTTGCCGGGGTTCATTGATTGCGCAGCAAG..... *****
181	GCTTTGCCGGGGTTCATTGATTGCGCAGCAAG-----pRV300-----
212
241	----- pRV300-----
212GTCTCGTTAAAGCTAGTG *****
4201	----- pRV300-----GTCTCGTTAAAGCTAGTG
230	CCACATTGCCTTTTTTAGAAGGATTGGTGTGGGCACACAATTGACTACAGCCGCCGATC *****
4261	CCACATTGCCTTTTTTAGAAGGATTGGTGTGGGCACACAATTGACTACAGCCGCCGATC
290	TTACGGTGCCGATCCTAATCGAAAATGACGGTAATGCGGCGGCATTGGCAGAGCATTTGGC *****
4321	TTACGGTGCCGATCCTAATCGAAAATGACGGTAATGCGGCGGCATTGGCAGAGCATTTGGC
350	GCGGCAATTTAGCAGGAACAATGAACAGCGCCATGGTTGTCTTAGGAACCGCGTTGGCG *****
4381	GCGGCAATTTAGCAGGAACAATGAACAGCGCCATGGTTGTCTTAGGAACCGCGTTGGCG
410	CATCGCTTTTTTCTCAACGGCCAGCTCTATCACGGCAGCCATCATGTTGCTGGCGAACCCA *****
4441	CATCGCTTTTTTCTCAACGGCCAGCTCTATCACGGCAGCCATCATGTTGCTGGCGAACCCA
470	GTTTCATGGTGACCAATGGCCTAACCCCGATCATGCGCGAGCAAACCGCGGCAGGCTTGT *****
4501	GTTTCATGGTGACCAATGGCCTAACCCCGATCATGCGCGAGCAAACCGCGGCAGGCTTGT
530	CAGCAGTTGCGACGATCAATGCGATGGCCGATACCTTAGGTGTGCACGAAGAACCGATTG *****
4561	CAGCAGTTGCGACGATCAATGCGATGGCCGATACCTTAGGTGTGCACGAAGAACCGATTG
590	GCCAGCGCGTTTTTCAAGCACTAACTGACAACACCAGCGAAGCCGCCGTCATTCTCCGCA *****
4621	GCCAGCGCGTTTTTCAAGCACTAACTGACAACACCAGCGAAGCCGCCGTCATTCTCCGCA
650	CCTTCACGCGCGGTGTGGCTGCCATGATCTACAACATGCAAACCGTTCTTGATCTCGAAA *****
4681	CCTTCACGCGCGGTGTGGCTGCCATGATCTACAACATGCAAACCGTTCTTGATCTCGAAA
710	AAGTCATCATTGGCGGCGGCATCAGCGCCCAACCACGGGTGATTAAGGAAATCCGTGACG *****
4741	AAGTCATCATTGGCGGCGGCATCAGCGCCCAACCACGGGTGATTAAGGAAATCCGTGACG
770	ACATCGAAGCATATCAGCAGGTAACCTTCGCTTTCGGCAGCACAATTCGTCTACCAGTGG

```
*****  
4801 ACATCGAAGCATATCAGCAGGTA ACTTCGCTTTCGGCACGCACAATTCGTCTACCAGTGG  
830 TGG AACCGGCGAAGTATCGGAATGCGGGCGAACTTGATTGGGGCGGTGGCGCCGTTGGTGG  
*****  
4861 TGG AACCGGCGAAGTATCGGAATGCGGGCGAACTTGATTGGGGCGGTGGCGCCGTTGGTGG  
890 TGC GCGGGTAG  
*****  
4921 TGC GCGGGTAG
```

Anexo 10. Secuencia del gen *sugK* de *L. casei* BL23 silvestre (verde) y mutante obtenido por una inserción del plásmido pRV300 (roja).

