



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**“ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y DEL
MECANISMO DE DEGRADACIÓN DE INULINA Y AGAVINA POR
Bifidobacterium longum subsp. *infantis* ATCC 15697”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A
IBQ. ESMERALDA CUEVAS JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. AGUSTÍN LÓPEZ-MUNGUÍA CANALES
(INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA)

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MARCELA AYALA ACEVES
(INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA)

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)

CUERNAVACA, MORELOS
JUNIO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales y la asesoría técnica de la Dra. Ángela Ávila Fernández, la M.C. María Elena Rodríguez Alegría y el Técnico Laboratorista Fernando González Muñoz.

El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca número 379261; así como por la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto PAPIIT número IT200316.

MIEMBROS DEL JURADO:

PRESIDENTE: DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS

SECRETARIO: DR. ADELFO ESCALANTE LOZADA

VOCAL: DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

VOCAL: DR. ADRIAN OCHOA LEYVA

VOCAL: DRA. CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo.

A mis padres y hermanas por todo su amor y apoyo incondicional.

A mi esposo y mejor amigo Jonatha, por su amor, por apoyarme en todos mis proyectos, por motivarme a ser mejor persona y por traer ese balance a mi vida.

Al Dr. Agustín López-Munguía Canales, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación, por sus enseñanzas y aportaciones que hicieron que este trabajo de investigación se pudiera llevar a cabo y por ser un ejemplo a seguir como investigador y como persona.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP), por el apoyo económico otorgado para asistir a un congreso y una estancia.

A los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Marcela Ayala Aceves y la Dra. Romina Rodríguez Sanoja por sus comentarios que enriquecieron este trabajo de investigación.

A la Dra. Ángela Ávila Fernández, por iniciarme en el mundo de la biocatálisis y por sus enseñanzas y aportaciones de principio a fin en este proyecto.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza, por su ayuda y consejos.

A los miembros del jurado por tomarse el tiempo para revisar mi trabajo y hacer comentarios enriquecedores.

A Jaime y Male que me brindaron asesoría técnica y su amistad durante estos dos años.

A todos mis compañeros del laboratorio que hicieron más amena mi estancia.

ÍNDICE

RESUMEN	12
I INTRODUCCIÓN	13
II ANTECEDENTES	16
2.1 Fructanas	16
2.2 Bifidobacterias	18
2.3 <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697.....	20
2.4 Mecanismo prebiótico.....	20
2.5 β -fructofuranosidasas de bifidobacterias	25
III JUSTIFICACIÓN	29
IV HIPÓTESIS	29
V OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo General.....	29
5.2 Objetivos específicos	30
VI MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Genome-mining	31
6.2 Clonación de Blon_2056	31
6.3 Obtención de la enzima recombinante	32
6.4 Sustratos y estándares	33
6.5 Determinación de la actividad enzimática	34
6.6 Efecto de la temperatura y pH y estabilidad térmica	35
6.7 Propiedades cinéticas	35
6.8 Perfil de productos durante la hidrólisis de diversas fructanas por <i>B.longum</i> _11	35
6.9 Análisis de productos	35

6.10 Crecimiento de <i>B. longum</i> en medio con inulina y agavina	36
6.11 Obtención de las diferentes fracciones enzimáticas.....	37
6.12 Perfil de productos durante la hidrólisis de inulina y agavina por las diferentes fracciones enzimáticas	38
6.13 Zimogramas	38
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
PRIMERA PARTE: MINERÍA DE GENOMAS Y CARACTERIZACIÓN DE B.longum_11	40
7.1. Minería de genomas.....	40
7.2 Clonación del gen, expresión y purificación de la enzima recombinante.....	44
7.3 Caracterización de la fructanasa B.longum_11.	47
7.3.1 Temperatura y pH óptimos de la fructanasa B.longum_11.....	47
7.3.2 Estabilidad térmica de la fructanasa B.longum_11	49
7.3.3 Actividad de la fructanasa B.longum_11 sobre fructanas de distintos orígenes... 50	
7.3.4 Caracterización cinética de la β -fructofuranosidasa B.longum_11.....	51
7.3.5 Perfil de productos de la β -fructofuranosidasa B.longum_11 durante la hidrólisis de diversas fructanas	53
VIII CONCLUSIONES A LA PRIMERA PARTE.....	57
IX RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
SEGUNDA PARTE: CULTIVOS DE <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 EN INULINA Y AGAVINA.....	59
9.1 Crecimiento y degradación de inulina y agavina por <i>B. longum</i>	59
9.2 Localización y cuantificación de la actividad fructanasa de las distintas fracciones celulares de <i>B. longum</i>	65
9.3 Especificidad hacia sustrato y perfil de productos obtenidos con la actividad enzimática presente en los sobrenadantes (Sob-I y Sob-A).....	66

9.4 Especificidad hacia sustrato y perfil de productos obtenidos con la actividad enzimática presente en la fracción enriquecida en pared celular (Par-I y Par-A).....	70
9.5 Especificidad hacia sustrato y perfil de productos obtenidos con la actividad enzimática presente en la fracción enriquecida en proteína intracelular (Intra-I e Intra-A)	74
9.6 Análisis comparativo de las características y las actividades enzimáticas presentes en los cultivos de <i>B. longum</i> utilizando inulina o agavina como fuente de carbono.....	78
9.7 Análisis de proteínas y especificidad de hidrólisis en las distintas fracciones celulares	80
X CONCLUSIONES A LA SEGUNDA PARTE.....	85
XI PERSPECTIVAS	86
XII REFERENCIAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de (A) inulinas, (B) levanas y (C) fructanas mezcladas. Encerrada en línea punteada se muestra la molécula inicial de sacarosa (Ritsema y Smeekens 2003).	16
Figura 2. Estructura propuesta para las fructanas de agave (Mancilla-Margalli y López 2006). Encerrada se muestra la molécula de bifurcosa inicial.	18
Figura 3. A) Metabolismo de diversos oligosacáridos por <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 (Kim, An y col. 2013). B) Bifidus shunt según lo reportado por Scardovi y Trovatelli (1965).	24
Figura 4. Estructura de la β -fructofuranosidasa de <i>B. longum</i> KN29.1 (A) y su sitio activo con fructosa (B) (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011).....	26
Figura 5. Mecanismo de reacción de la β -fructofuranosidasa de <i>Bifidobacterium longum</i> KN29.1 (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011).....	27
Figura 6. Alineamiento de la enzima localizada en <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 (<i>B.longum_11</i>) con las enzimas de bifidobacterias ya reportadas. Números de acceso: <i>B. adolescentis</i> (BAJ21238.1), <i>B. longum</i> (ABN04092), <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> (BAJ21237.1), <i>B. breve</i> UCC2003 (AAT28190.1) y <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> (AAS 87041.1). La estructura secundaria pertenece a la estructura 3PIG de la proteína ABN04092.1. Los elementos estructurales de la β -propela se muestran en verde, y aquéllos del β -sándwich en azul. Los cilindros representan α -hélices y las flechas representan laminas β	43
Figura 7. A) Modelo de estructura tridimensional obtenido para <i>B.longum_11</i> . El molde (PBD 3PIG) se muestra en azul y el modelo en rosa. La región de aminoácidos adicionales de <i>B.longum_11</i> se muestra en amarillo. B) Figura obtenida rotando el modelo a fin de apreciar la región adicional de <i>B.longum_11</i>	44
Figura 8. Gel de agarosa al 1 %. 1) Producto de la amplificación por PCR de <i>Blon_2056</i> , 2) Marcador de peso molecular.....	45
Figura 9. Construcción pET22- <i>Blon_2056</i>	45
Figura 10. SDS-PAGE del proceso de purificación de la enzima <i>B.longum_11</i> de <i>B. longum</i> expresada en <i>E. coli</i> C41(DE3). A) Marcador de peso molecular, B) Extracto proteico, C) Enzima purificada.....	46
Figura 11. Efecto de la temperatura en la actividad de la fructanasa <i>B.longum_11</i> de <i>B. longum</i>	48
Figura 12. Efecto del pH en la actividad de la fructanasa <i>B.longum_11</i> de <i>B. longum</i>	49

Figura 13. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad de la fructanasa B.longum_11 de <i>B. longum</i>	50
Figura 14. Evolución del perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por la β -fructofuranosidasa B.longum_11 de <i>B. longum</i> analizado por HPAEC-PAD. Se muestra el porcentaje de conversión en base a la fructosa (Fru) liberada.	54
Figura 15. Evolución del perfil de productos durante la hidrólisis de levana de alto peso molecular (LevA) al 1 % por la β -fructofuranosidasa B.longum_11 de <i>B. longum</i> analizado por GPC. Se muestra el porcentaje de conversión con base en la fructosa liberada.	55
Figura 16. Efecto del tiempo de reacción en el perfil de productos de hidrólisis de agavina al 1 % por la β -fructofuranosidasa B.longum_11 de <i>B. longum</i> analizado por HPAEC-PAD. Se señala el porcentaje de conversión y los principales intermediarios. El estándar (STD) corresponde a 1-kestosa (1-K), 6-kestosa (6-K), neokestosa (NK), 1-nistosa (1-N) y 1-fructofuranosil nistosa (1-FN).	56
Figura 17. Crecimiento (círculos) y caída de pH (triángulos) de cultivos de <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 con inulina (símbolos negros) y agavina (símbolos blancos).60	
Figura 18. Perfil de productos durante la degradación de inulina por <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697.	63
Figura 19. Perfil de productos durante la degradación de agavina por <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697.	64
Figura 20. Perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por Sob-I (A) y Sob-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se muestra el porcentaje de conversión y un estándar (STD) de fructooligosacáridos de la serie GFn y Fn.....	67
Figura 21. Evolución del perfil de productos durante la hidrólisis de agavina al 1 % por Sob-I (A) y Sob-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se indica el porcentaje de conversión y las flechas indican los principales intermediarios: 1-kestosa (1-K), neokestosa (nK), oligofructósido DP 4 (F4) y fructofuranosil nistosa (ffN).....	69
Figura 22. Perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por Par-I (A) y Par-A (B) analizado por HPAEC-PAD.	71
Figura 23. Perfil de productos durante la hidrólisis de agavina al 1 % por Par-I (A) y Par-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Las flechas indican los principales intermediarios: 1-kestosa (1-K), 6-kestosa (6-K), neokestosa (nK), oligofructosa DP 4 (F4) y fructofuranosil nistosa (ffN).....	73
Figura 24. Perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por Intra-I (A) e Intra-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se muestra el porcentaje de conversión y un estándar (STD) de fructooligosacáridos de la serie GFn y Fn.....	75

- Figura 25. Perfil de productos durante la hidrólisis de agavina al 1 % por Intra-I (A) e Intra-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se indica el porcentaje de conversión y las flechas señalan los principales intermediarios. 77
- Figura 26. Comparación de los intermediarios de hidrólisis de agavina por *B. longum* 11 (A) y las fracciones enriquecidas en proteína intracelular (B). Se señalan los principales intermediarios: 6-kestosa (6-K), bifurcosa, (B) y fructofuranosil bifurcosa (FB). 78
- Figura 27. Modelo propuesto del mecanismo de degradación de inulina y agavina por *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. 80
- Figura 28. Zimogramas de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Se usó inulina de *L. citreum* como sustrato. Las flechas señalan la actividad intracelular observada poco perceptible al capturar la imagen. 82
- Figura 29. Zimograma de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Se usó levana de alto peso molecular de SacB como sustrato. Se incluye una endolevanasa (LevB) como control. 82
- Figura 30. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Las flechas señalan la región donde se observó actividad en el zimograma de inulina. 83
- Figura 31. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Las flechas señalan la región donde se observó actividad en el zimograma de levana. LevB corresponde a una endolevanasa usada como control. 84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de PCR para amplificar el gen Blon_2056.	31
Tabla 2. Proceso de purificación de la enzima B.longum_11 de <i>B. longum</i> expresada en <i>E. coli</i> C41(DE3).	47
Tabla 3. Actividad relativa de la fructanasa B.longum_11 de <i>B. longum</i> sobre sustratos de diversas estructuras y orígenes*.	51
Tabla 4. Parámetros cinéticos aparentes de la β -fructofuranosidasa B.longum_11 hacia diferentes sustratos*.	53
Tabla 5. Actividad fructanasa global de las distintas fracciones del cultivo de <i>B. longum</i> en inulina, agavina y glucosa*.	66
Tabla 6. Resumen comparativo del crecimiento y los patrones de degradación de <i>B. longum</i> en fructanas de diferente estructura.	79

**ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y DEL
MECANISMO DE DEGRADACIÓN DE INULINA Y AGAVINA POR
Bifidobacterium longum subsp.*infantis* ATCC 15697**

RESUMEN

En este trabajo se investigó la degradación de inulina (fructana simple) y agavina (fructana compleja) tanto por las enzimas de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 como por el propio microorganismo. Con este fin se establecieron dos etapas. En la primera, mediante una búsqueda de minería de genomas (genome-mining) se identificó y caracterizó una β -fructofuranosidasa de esta cepa que denominamos B.longum_11, capaz de hidrolizar fructanas. Esta enzima posee bajo porcentaje de identidad con las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias ya reportadas y se clasificó como β -fructofuranosidasa no específica debido a que hidroliza una amplia gama de fructanas, incluyendo inulina y agavina, mediante un mecanismo exo. En una segunda etapa, se cultivó esta bacteria en presencia de inulina y agavina y se analizó el perfil de los productos obtenidos, en cada caso, con el fin de analizar la forma en la que la bacteria degrada cada sustrato. Se observó que ambas fructanas se consumen mediante un mecanismo similar: primeramente la bacteria consume las cadenas de menor peso molecular para después hidrolizar las de mayor grado de polimerización. De los cultivos de *B. longum* se aislaron tres fracciones: una fracción extracelular, una fracción enriquecida en proteína intracelular y una fracción enriquecida en pared celular, con el fin de localizar la actividad β -fructofuranosidasa en cada fracción y determinar el mecanismo de hidrólisis de inulina y agavina por cada una. Mediante el análisis de los productos obtenidos, se identificó una fructanasa con mecanismo endo asociada a la pared celular de *B. longum*. Esta enzima se produce durante el crecimiento de la bacteria tanto en inulina como en agavina, pero presenta una menor actividad sobre agavina. Se realizaron zimogramas de las fracciones celulares, con el fin de comparar las actividades enzimáticas presentes en cada fracción y ubicar la actividad de B.longum_11. El análisis de los zimogramas permitió concluir que *B. longum* emplea las mismas enzimas para la asimilación tanto de inulina como de agavina.

I INTRODUCCIÓN

Las fructanas son polímeros constituidos por unidades de fructosa unidas mediante enlaces glucosídicos que se sintetizan a partir de la fructosa de una molécula de sacarosa. Los fructooligosacáridos (FOS) son fructanas con un grado de polimerización (DP) de entre 2 y 10 unidades de fructosa.

Entre los organismos productores de fructanas se encuentra la achicoria (*Cichorium intybus*), que produce un polímero lineal con enlaces $\beta(2-1)$ (inulina); y el agave, que produce fructanas complejas sumamente ramificadas conocidas como agavinas.

Las fructanas son reconocidos como prebióticos ya que no son digeribles por los humanos, pero pueden ser fermentados específicamente por las bacterias probióticas del intestino, promoviendo su crecimiento selectivo con beneficios para el hospedero. El efecto prebiótico de las fructanas tipo inulina se conoce desde hace más de tres décadas (Yazawa y Tamura 1982), mientras que el de agavinas se ha estudiado recientemente tanto *in vitro* como *in vivo* (Gomez, Tuohy y col. 2010; Ramnani, Costabile y col. 2015), demostrando que estimulan específicamente el crecimiento de las bifidobacterias.

En general, la degradación de fructanas por bifidobacterias se asocia a la producción de enzimas con actividad β -fructofuranosidasa. Se ha observado que la actividad β -fructofuranosidasa se induce con la presencia de fructosa, sacarosa o FOS en el medio. En otras cepas de bifidobacterias, estas enzimas se producen de forma constitutiva. De igual forma, se sabe que sólo aquellas bifidobacterias que producen actividad β -fructofuranosidasa extracelular son capaces de crecer usando inulina como fuente de carbono (Rossi, Corradini y col. 2005).

Se han aislado y caracterizado β -fructofuranosidasas tanto nativas como recombinantes de distintas cepas de bifidobacterias. En estos reportes se evaluó la capacidad de las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias para hidrolizar prebióticos comerciales, especialmente de tipo inulina; en todos los casos las enzimas prefirieron FOS tipo inulina como sustrato. Sin embargo, no se exploró su especificidad hacia fructanas complejas no comerciales, como las encontradas en el agave.

Además de las enzimas encargadas de degradar fructanas, las bifidobacterias cuentan con transportadores y proteínas de unión a FOS, con el fin de poder internalizar los FOS presentes en el medio. Se ha encontrado que durante el crecimiento de *B. longum* NCC2705

en oligofruktosa (F_n) se inducen 9 sistemas de transporte de azúcares: 7 de tipo ABC (ATP-binding cassette transporters) y 2 de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily) (Goh y Klaenhammer 2015).

De esta forma, se han propuesto mecanismos generales de asimilación de fructanas por bifidobacterias, específicamente de fructanas comerciales como inulina y FOS (Goh y Klaenhammer 2015). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual las bifidobacterias asimilan fructanas complejas como las agavinas no se ha estudiado, aún cuando este tipo de fructanas son parte de la dieta, particularmente en nuestro país, y se ha demostrado su efecto prebiótico.

Por otro lado, un aspecto no estudiado sobre la degradación extracelular de fructanas por bifidobacterias es si la hidrólisis ocurre mediante un mecanismo exo o un mecanismo endo. En el mecanismo exo se hidroliza la fructosa terminal ubicada en el extremo no reductor del polímero, produciéndose fructosa como principal producto de la reacción; mientras que en el mecanismo endo se hacen cortes internos a la cadena de fructana, produciéndose FOS como principal producto. Otra posibilidad es que se trate de un mecanismo combinado de exo y endo-hidrólisis. Hasta el momento, todas las enzimas de bifidobacterias capaces de hidrolizar fructanas que se han caracterizado degradan inulina mediante un mecanismo exo. Esto parecería indicar que el mecanismo de degradación de inulina por bifidobacterias es una exo-hidrólisis que libera fructosa al medio, la cual posteriormente es internalizada por las bacterias.

El presente estudio se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se exploró la posibilidad de identificar una enzima en las bifidobacterias capaz de hidrolizar fructanas de forma endo. Para ello, se utilizó una estrategia de minería de genomas (genome-mining) orientada a la búsqueda de secuencias con bajo porcentaje de identidad con las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias ya reportadas. De esta búsqueda, se encontró un gen perteneciente a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 que codifica para una enzima hasta entonces no estudiada y a la cual denominamos B.longum_11. Se clonó el gen en *Escherichia coli* y se caracterizó la enzima recombinante. En particular, se comparó su actividad hacia fructanas de diferentes orígenes y estructuras, incluyendo sustratos no comerciales, algo no estudiado en las β -fructofuranosidasas previamente reportadas. Esto nos permitió concluir si una misma enzima podría participar en la hidrólisis de fructanas de

diferentes estructuras, como inulina, levana y agavina, o si más bien se encuentra especializada en la hidrólisis de un tipo de fructana en particular. Esta etapa dio lugar a la publicación “**Functional characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on structurally diverse fructans**” en la revista Journal of Applied Microbiology.

En la segunda parte se estudió el perfil de productos resultado de la degradación de inulina y agavina presentes en el medio de cultivo de *B. longum* subsp *infantis* ATCC 15697. De igual forma, se obtuvieron diferentes fracciones celulares (fracción extracelular, fracción enriquecida en pared celular y fracción enriquecida en proteína intracelular) y se analizó la presencia de β -fructofuranosidasas en cada fracción por medio de zimogramas. Se usó cada fracción para llevar a cabo reacciones de hidrólisis de inulina y agavina y se analizó la cinética de hidrólisis con cada sustrato. A partir del análisis del perfil de productos durante la hidrólisis y de la identificación de bandas de actividad en cada fracción del cultivo se logró obtener un panorama general de las actividades enzimáticas responsables del crecimiento de *B. longum* en fructanas. De igual forma, se logró comparar las actividades presentes durante la degradación de inulina y agavina por esta cepa. Una perspectiva inmediata derivada de este trabajo consiste en su complementación mediante un estudio de proteómica.

II ANTECEDENTES

2.1 Fructanas

Las fructanas son polímeros constituidos por unidades de fructosa unidas mediante enlaces glucosídicos. Éstas se clasifican como levanas, cuando las fructosas se unen mediante enlaces β -2,6; o como inulinas si se unen mediante enlaces β -2,1. Un tercer tipo de fructanas son aquéllas que contienen ambos tipos de enlaces, conocidas como graminanas o fructanas mezcladas. Un punto importante a destacar dentro de las estructuras de estos carbohidratos es la presencia de una unidad de glucosa generalmente localizada en el extremo de la cadena. Esto resulta de la forma en que son sintetizadas, agregando unidades de fructosa a una molécula inicial de sacarosa, dando lugar a lo que se conoce como serie GF_n (Figura 1).

Otra forma de clasificar a las fructanas es por su grado de polimerización. Los fructooligosacáridos (FOS) tienen un grado de polimerización (DP) de entre 2 y 10 unidades de fructosa. Mientras que una fructana propiamente dicha tiene un DP mayor a 10 unidades de fructosa. Las oligofructosas son FOS que han sido obtenidos por hidrólisis endo de las fructanas de mayor peso molecular, por lo que no contienen la glucosa terminal proveniente de la sacarosa, esta serie se conoce como serie F_n.

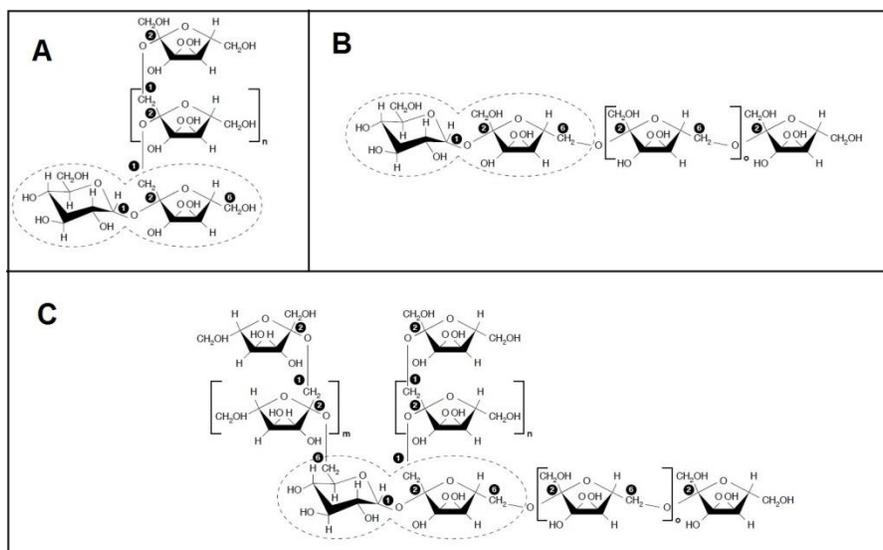


Figura 1. Estructura de (A) inulinas, (B) levanas y (C) fructanas mezcladas. Encerrada en línea punteada se muestra la molécula inicial de sacarosa (Ritsema y Smeekens 2003).

Los polímeros de fructosa actualmente son usados como aditivos en alimentos: como agentes gelificantes, espesantes y sustitutos de grasa (Franck 2007). Además, se les reconoce como fibra soluble, es decir, son sustancias que al no ser digeridas por los humanos actúan como vehículo de los nutrimentos a lo largo del tracto intestinal, pudiendo actuar como prebióticos (Ritsema y Smeekens 2003). Un prebiótico es una sustancia no digerible por los humanos, pero que puede ser fermentada específicamente por las bacterias probióticas del intestino, promoviendo su crecimiento selectivo, con beneficios para el hospedero (Gibson y Roberfroid 1995). Cabe resaltar que los probióticos son los microorganismos que, con su presencia o colonización del intestino, proveen de un balance en la microbiota intestinal y afectan de manera benéfica al hospedero.

Los microorganismos y las plantas son los principales productores de fructanas (Hendry 1993). En plantas, éstas se sintetizan como almacén de carbono y energía, y se les asocia con la protección contra condiciones extremas de sequía o de baja temperatura (Hendry 1993; Vijn y Smeekens 1999). Al menos 40 000 especies de plantas producen fructanas, dentro de las que destacan la achicoria (*Cichorium spp*), la alcachofa (*Cynara scolymus*), el trigo (*Triticum spp*) y los agaves (*Agave spp*).

En el agave las fructanas se encuentran almacenadas en la base del tallo, en lo que se conoce comúnmente como la piña. Éstas constituyen del 13 al 17 % (peso húmedo) de su peso, algo similar al contenido de inulina de la achicoria (15.2 al 20.5 % base húmeda), la mayor fuente de inulina actualmente. Las fructanas del agave son estructuras altamente ramificadas. Corresponden al grupo de las fructanas mezcladas, con un grado de polimerización entre 3 y 29 (López, Mancilla-Margalli y col. 2003). Se clasifican como graminanas aquellas que poseen glucosa terminal; o como neofructanas las que poseen glucosa interna en su estructura (Figura 2) (Mancilla-Margalli y López 2006). La mezcla de graminanas y neofructanas da lugar a un grupo de fructanas que se conoce como agavinas.

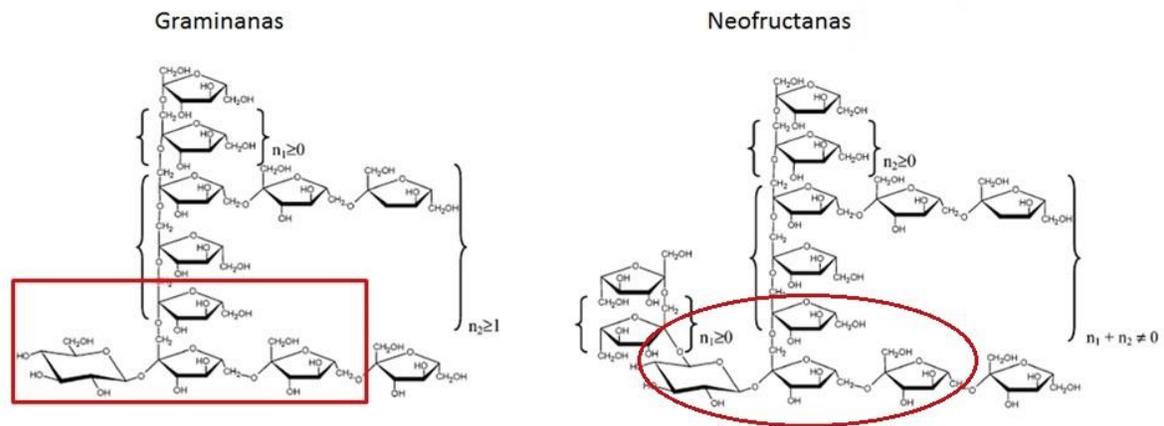


Figura 2. Estructura propuesta para las fructanas de agave (Mancilla-Margalli y López 2006). Encerrada se muestra la molécula de bifurcosa inicial.

Mancilla-Margali y López (2006) reportaron que la relación de graminanas:neofructanas en la mayoría de las especies de agave evaluadas es de 1:4; con una relación de enlaces $\beta(2-1)$ a $\beta(2-6)$ de 2 a 1. Su unidad estructural es la bifurcosa, un FOS ramificado con grado de polimerización de 4. Se ha propuesto que la síntesis de fructanas en el agave se da a partir de esta molécula (Mancilla-Margalli y López 2006).

A pesar de su estructura tan compleja, se ha demostrado que las fructanas del agave pueden ser fermentadas por microorganismos benéficos presentes en la microbiota intestinal (bifidobacterias y lactobacilos). Su efecto prebiótico ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Gomez, Tuohy y col. 2010; Ramnani, Costabile y col. 2015). Además del agave, se han identificado fructanas complejas en otras plantas de uso alimenticio como el trigo (*Triticum aestivum* L.) (Kawakamia, Yoshidaa y col. 2005) y el ajo (*Allium sativum* L.) (Baumgartner, Dax y col. 2000).

2.2 Bifidobacterias

Las bifidobacterias son bacterias Gram-positivas comprendidas dentro del género *Bifidobacterium* que incluye actualmente 47 taxones, 38 especies y 9 subespecies. Se encuentran principalmente en nichos ecológicos como el intestino humano, la cavidad oral, intestinos de insectos y animales, aguas de desecho, y alimentos (Ventura, Turróni y col. 2014). Éstas representan el 80 y 25 % de las bacterias cultivables de la microbiota intestinal

de infantes y adultos sanos, respectivamente (Picard, Fioramonti y col. 2005). Actualmente se les reconoce como probióticos (Fooks y Gibson 2002). Numerosos estudios avalan los beneficios de bifidobacterias en la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Por ejemplo, la ingestión de *B. animalis* ayudó a disminuir el tiempo de tránsito intestinal en individuos sanos (Bouvier, Meance y col. 2001); mientras que *B. infantis* 35624, proporcionado en una dosis diaria de 1×10^8 UFC, redujo los síntomas del síndrome de intestino irritable (Whorwel, Altringer y col. 2006).

Las bifidobacterias ejercen un efecto de protección hacia el hospedero, entre otras causas debido a que sintetizan un amplio espectro de sustancias antimicrobianas (Gibson y Wang 1994). Además, pueden competir por los sitios de unión a las células epiteliales con virus u otras bacterias patógenas (Duffy, Zielesny y col. 1994; Fujiwara, Hashiba y col. 1997) y estimulan la inmunidad (Ashraf y Shah 2014). Se ha demostrado que algunas cepas de bifidobacterias pueden causar una reducción significativa en los niveles de colesterol del suero sanguíneo, cuando este nivel es elevado (Zeeshan, Imran y col. 2014). También se ha demostrado, de manera específica, que la ingesta de cultivos liofilizados de *B. longum* inhibe el desarrollo de cáncer de colon (Singh, Rivenson y col. 1997).

Las bifidobacterias, en conjunto con los lactobacilos, mejoran los niveles de glucosa sanguínea después de ayuno prolongado y favorecen el buen estado oxidativo. Su consumo incrementa la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en los eritrocitos. A pesar de que aún no se conocen los mecanismos involucrados, se ha propuesto a estos probióticos como prometedores agentes antidiabéticos y antioxidantes (Ejtahed, Mohtadi-Nia y col. 2012).

Los principales productos de fermentación de las bifidobacterias son el ácido láctico y los ácidos grasos de cadena corta, principalmente acetato. Los ácidos grasos de cadena corta poseen un efecto trófico, mediante el cual se favorece el engrosamiento de la mucosa intestinal (Bugaut y Bentejac 1993). El lactato, por su parte, puede ser convertido a butirato por otras bacterias presentes en la microbiota, éste es una fuente importante de energía para las células del epitelio del colon, regula el crecimiento y la diferenciación celular (Boffa, Lupton y col. 1992). Además de sus productos de fermentación, las bifidobacterias sintetizan algunas vitaminas, especialmente vitaminas del grupo B (Deguchia, Morishitaa y col. 1984).

2.3 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697

Bifidobacterium longum subsp. *infantis* ATCC 15697 es una de las 10 cepas de bifidobacterias cuyo genoma se ha secuenciado, y una de las más estudiadas. El análisis del genoma de esta cepa demostró que este microorganismo se ha adaptado para crecer en el tracto gastrointestinal (Schell, Karmirantzou y col. 2002). Se encontró que esta bacteria contiene más de 40 genes que codifican para posibles glucósido hidrolasas, con un amplio rango de sustratos. Además, a fin de internalizar los productos de la hidrólisis de carbohidratos y evitar la competencia por el alimento, cuenta con más transportadores y proteínas de unión a sustratos específicas para oligosacáridos que cualquier otro procariota reportado hasta el momento. Esto muy probablemente ayuda a *B. longum* a competir por la ingesta de diversos oligosacáridos liberados de la fibra que llega al intestino (Schell, Karmirantzou y col. 2002). Además, dado que es un microorganismo seguro, *B. longum* se ha utilizado como vector de entrega de profármacos en tumores cancerígenos (Sasaki, Fujimori y col. 2006).

2.4 Mecanismo prebiótico

Los mecanismos mediante los cuales los microorganismos probióticos asimilan las fructanas están mucho más estudiados en el género *Lactobacillus* que en bifidobacterias. En *Bifidobacterium*, este mecanismo varía no sólo entre un tipo de sustrato y otro, sino también entre diferentes cepas, aunque en general, la degradación de fructanas se asocia a la producción de enzimas con actividad β -fructofuranosidasa que hidrolizan inulina, levana y sacarosa.

Entre las especies de *Lactobacillus* que metabolizan oligofruktosa, la utilización de FOS parece ocurrir mediante una de dos vías: en el primer caso, el sustrato se transporta intacto hacia el interior de la célula, donde las β -fructofuranosidasas intracelulares lo hidrolizan; en el segundo caso, las β -fructofuranosidasas asociadas a la pared celular hidrolizan extracelularmente el polímero y posteriormente se internalizan los productos de la hidrólisis (fructosa, glucosa y sacarosa) (Goh y Klaenhammer 2015). Se asume que estos mismos mecanismos están implicados en el metabolismo de FOS por bifidobacterias, en las que

también se han identificado β -fructofuranosidasas intra y extracelulares (Rossi, Corradini y col. 2005), además de transportadores específicos para oligosacáridos (Schell, Karmirantzou y col. 2002).

A diferencia de los FOS, los sustratos de mayor peso molecular (i.e. inulina, agavina, levana) deben degradarse extracelularmente, puesto que su alto peso molecular impide el transporte hacia el interior de la célula. De acuerdo a su habilidad para metabolizar sustratos de mayor o menor DP, se han clasificado diferentes grupos de bifidobacterias. Existe un grupo que no es capaz de crecer usando fructanas como fuente de carbono, independientemente de su grado de polimerización. Un segundo grupo de bifidobacterias puede crecer únicamente utilizando FOS. El tercer grupo corresponde a bifidobacterias que pueden crecer usando FOS y fructanas de mayor DP, pero que prefieren los FOS y crecen mejor con este sustrato. Un cuarto grupo crece igual usando fructanas de cualquier grado de polimerización (Falony, Lazidou y col. 2008; Velázquez-Martínez, González-Cervantes y col. 2014). Estas diferencias se han asociado con la localización celular de las enzimas que degradan fructanas, de forma que sólo aquellas cepas de *Bifidobacterium* que producen β -fructofuranosidasas extracelulares son capaces de crecer tanto en inulina como en FOS, mientras que las cepas que producen sólo β -fructofuranosidasas intracelulares crecen exclusivamente en FOS (Rossi, Corradini y col. 2005).

Se ha propuesto que la hidrólisis de inulina en el colon la llevan a cabo bacterias degradadoras primarias, las cuales liberan monosacáridos y/o FOS al medio, y que posteriormente, las bifidobacterias utilizan estos azúcares para crecer. En un estudio llevado a cabo con heces fecales como inóculo, se observó que cuando se inhibía el crecimiento del resto de las bacterias de la muestra, algunas cepas de bifidobacterias no eran capaces de crecer en inulina (Rossi, Corradini y col. 2005). De esta forma, el metabolismo de fructanas de alto peso molecular en el tracto intestinal podría ser también un proceso de cooperación entre diferentes especies (sintrofismo).

Un aspecto poco estudiado sobre la degradación de las fructanas de mayor peso molecular por las bifidobacterias es el mecanismo mediante el cual ocurre este proceso, es decir, mediante la liberación de fructosa (exo-hidrólisis), la generación de FOS (endo-hidrólisis) o un mecanismo combinado. Todas las enzimas de bifidobacterias capaces de hidrolizar fructanas que se han caracterizado, degradan inulina mediante un mecanismo exo, es decir,

producen fructosa como principal producto. Esto parecería indicar que el mecanismo de degradación de inulina por bifidobacterias es una exo-hidrólisis que libera fructosa al medio, la cual posteriormente la bacteria internaliza.

Desde el punto de vista genético, en las bifidobacterias, las β -fructofuranosidasas pueden estar organizadas en operones junto con una sacarosa permeasa. Además, inmediatamente río abajo o río arriba del operón, se localiza su regulador transcripcional, un regulador de tipo LacI (Ryan, Fitzgerald y col. 2005; Kullin, Abratt y col. 2006). La sacarosa permeasa (Mayor Facilitator Superfamily) podría estar implicada en el transporte de FOS al interior de la célula. Como veremos más adelante, este tipo de moléculas son capaces de transportar un amplio rango de sustratos. Por otro lado, el regulador transcripcional es un represor de la transcripción. Se ha propuesto que la fructosa es la molécula inductora de actividad β -fructofuranosidasa en *B. infantis* ATCC 15697 (Perrin, Warchol y col. 2001). Ryan, Fitzgerald y col. (2005) reportan que la β -fructofuranosidasa codificada por el gen *fosC* de *B. breve* UCC2003 se induce sólo en presencia de sacarosa y FOS, mas no en presencia de fructosa; mientras que Rossi, Corradini y col. (2005) encontraron que, aunque en algunas cepas de bifidobacterias la producción de β -fructofuranosidasas se induce sólo durante el crecimiento en FOS o inulina; en otras cepas estas enzimas se producen de forma constitutiva. Sin duda, se trata de mecanismos de regulación complejos y diferentes entre las especies.

Además de las enzimas encargadas de degradar fructanas, las bifidobacterias cuentan con transportadores y proteínas de unión a FOS que les permiten internalizar los FOS presentes en el medio. Se ha encontrado que durante el crecimiento de *B. longum* NCC2705 en oligofructosa (F_n) se inducen 9 sistemas de transporte de azúcares, 7 de tipo ABC (ATP-binding cassette transporters) y 2 de la familia MFS (Mayor Facilitator Superfamily). Sustratos como la lactosa y la maltosa también inducen estos sistemas de transporte, por lo que se les considera transportadores de amplio rango de sustratos (Goh y Klaenhammer 2015).

En cuanto a *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, la cepa utilizada en este estudio, Kim, An y col. (2013) han propuesto un mecanismo global mediante el cual metaboliza FOS e inulina. Mediante un análisis proteómico, estos autores identificaron cuatro proteínas expresadas sólo durante el crecimiento de la bacteria en FOS e inulina: una proteína de

unión a sustrato (Blon_2061), dos inulinasas hipotéticas (Blon_2056 y Blon_0787) y una probable sacarosa fosforilasa (Blon_0128). Según estos mismos autores, tanto los FOS como la inulina son transportados dentro de la célula con ayuda de la proteína de unión a FOS/inulina y de su transportador asociado. Posteriormente, estos sustratos se hidrolizan intracelularmente por las dos inulinasas y la sacarosa fosforilasa, liberando glucosa 1-fosfato y fructosa, que pueden convertirse posteriormente en fructosa 6-fosfato para alimentar la vía bifidus shunt (Figura 3).

En esta vía la fructosa se convierte en ácido láctico y ácido acético, produciendo 2.5 moles de ATP por cada mol de fructosa, una cantidad mayor a lo obtenido por otras bacterias ácido lácticas por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (2 mol de ATP) o la vía de las pentosas fosfato (1 mol de ATP) (Scardovi y Trovatelli 1965).

Sin embargo, es poco probable que un polímero de alto peso molecular como la inulina sea transportado dentro de la célula. Además, durante ese estudio no fue posible establecer la localización celular de las inulinasas de forma concluyente. Es probable que esta cepa degrade extracelularmente la inulina a productos de menor peso molecular, para posteriormente internalizar estos productos de degradación; tal como se ha reportado para otras bifidobacterias.

A la fecha, no se ha estudiado el mecanismo por el cual las bifidobacterias asimilan fructanas complejas como las agavinas.

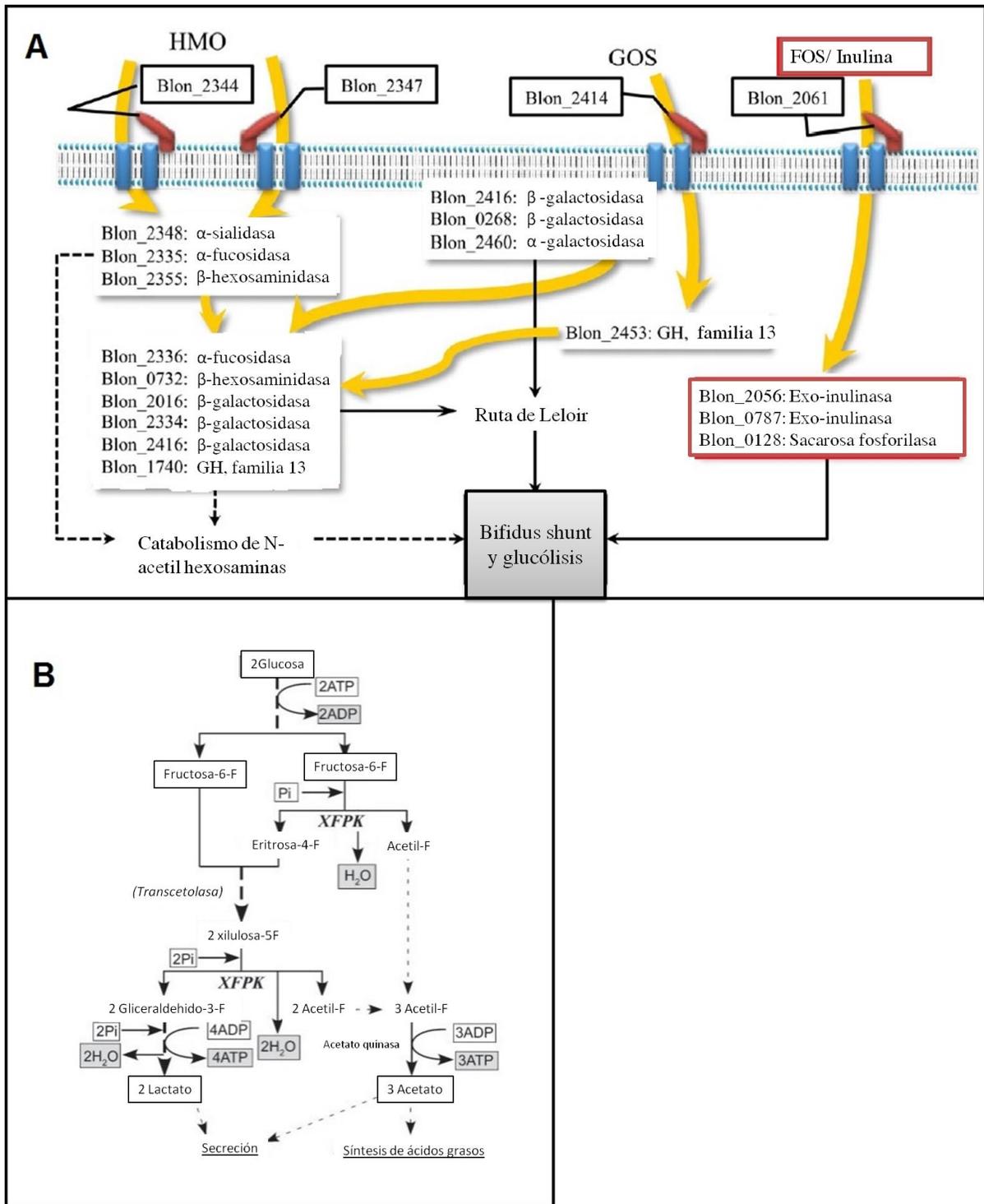


Figura 3. A) Metabolismo de diversos oligosacáridos por *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 (Kim, An y col. 2013). B) Bifidus shunt según lo reportado por Scardovi y Trovatelli (1965).

2.5 β -fructofuranosidasas de bifidobacterias

A pesar de que no hay una clasificación bien establecida, si podemos afirmar que dentro de las enzimas que hidrolizan fructanas se pueden distinguir dos grandes grupos: las β -fructosidasas y las endo-fructanasas. Las β -fructosidasas liberan fructosa de moléculas con residuos fructosilo. En este grupo tenemos a las invertasas que hidrolizan sacarosa y a las β -fructofuranosidasas, que además de hidrolizar sacarosa hidrolizan preferencialmente enlaces fructosilo de tipo β 2-1 y/o β 2-6 de los extremos no reductores de las fructanas. Las β -fructofuranosidasas pueden clasificarse a su vez como inulinasas si hidrolizan inulina en mayor proporción, o como levanasas si hidrolizan levana preferencialmente. Las endo-fructanasas hidrolizan las fructanas de forma endo, es decir, producen cortes internos en la cadena de fructana, liberando FOS como principal producto y se dividen en endo-inulinasas y endo-levanasas según su preferencia para hidrolizar inulina o levana, respectivamente.

A la fecha, en bifidobacterias sólo se han caracterizado invertasas y β -fructofuranosidasas, pero no se ha reportado ninguna endo-fructanasa. De estos dos tipos de enzimas, sólo las β -fructofuranosidasas hidrolizan fructanas, por lo que esta sección se centrará en las β -fructofuranosidasas.

Como se señaló con anterioridad, las β -fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26) son enzimas que hidrolizan enlaces fructosilo de tipo β 2-1 y/o β 2-6 de los extremos no reductores de las fructanas, así como de la sacarosa aunque con menor afinidad. De hecho, para su clasificación se utiliza la tasa de actividad con sacarosa sobre actividad con inulina (S/I). Cuando esta relación es mayor a 1500 se trata de una invertasa, mientras que cuando es menor a 10 se trata de una β -fructofuranosidasa (Vandamme y Derycke 1983).

Según su secuencia de aminoácidos y plegamiento, las β -fructofuranosidasas, al igual que las invertasas y endo-fructanasas, pertenecen a la familia 32 de las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.X) (Carbohydrate-Active enZYme server, www.cazy.org). Hasta ahora sólo se cuenta con la estructura cristalográfica de seis miembros de esta familia, de las cuales una pertenece a una β -fructofuranosidasa de *B. longum* KN29.1 (PDB 3PIG) (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011).

La estructura de esta familia de enzimas consta de un dominio N-terminal con plegamiento tipo β -propela de cinco hojas, las cuales están formadas por cuatro hojas β antiparalelas cada una. El dominio C-terminal está formado por dos arreglos de seis hojas β antiparalelas

cada uno, los cuales se apilan para dar lugar a un plegamiento de tipo β -sándwich (Figura 4-A). El sitio catalítico se localiza en el dominio β -propela y contiene tres aminoácidos ácidos conservados: dos ácidos aspárticos y un ácido glutámico, situados en una posición equivalente en todas las enzimas. Se ha demostrado que estos tres aminoácidos, conocidos como “la triada catalítica”, son indispensables para la unión del sustrato y la catálisis. En la β -fructofuranosidasa de *B. longum* KN29.1 se identificó al Asp54 como el nucleófilo y al Glu235 como el catalizador ácido/base (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011). El otro aspartato (Asp181) actúa como un estabilizador del estado de transición, ya que provee puentes de hidrógeno para unir a los hidroxilos C3 y C4 de la fructosa, participando además en el reconocimiento del sustrato (Figura 4-B) (Lammens, Le Roy y col. 2009; Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011).

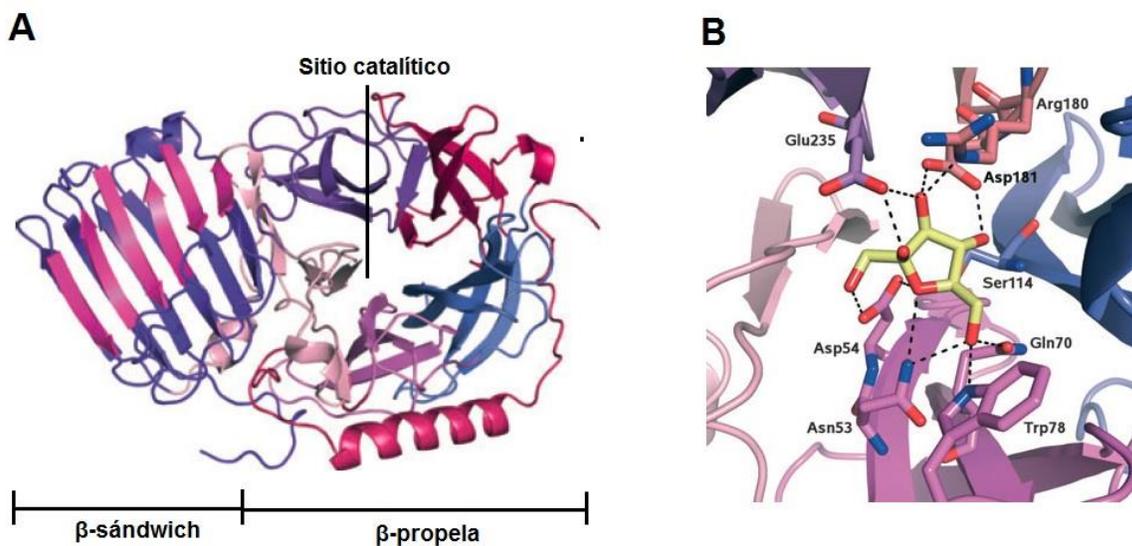


Figura 4. Estructura de la β -fructofuranosidasa de *B. longum* KN29.1 (A) y su sitio activo con fructosa (B) (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011).

El mecanismo catalítico involucra una reacción en dos pasos. En el primer paso (glucosilación), el carboxilato del nucleófilo (Asp54) realiza un ataque nucleofílico al carbono anomérico del sustrato, formando un intermediario fructosil-enzima. El catalizador ácido/base (Glu235) actúa como ácido donando un protón al residuo saliente. En el segundo

paso (desglucosilación), el catalizador ácido/base actúa como base, removiendo un protón del aceptor (agua), lo que provoca que el agua realice un ataque nucleofílico en el carbono anomérico de la fructosa, lo que hidroliza el intermediario fructosil-enzima (Figura 5)(Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011).

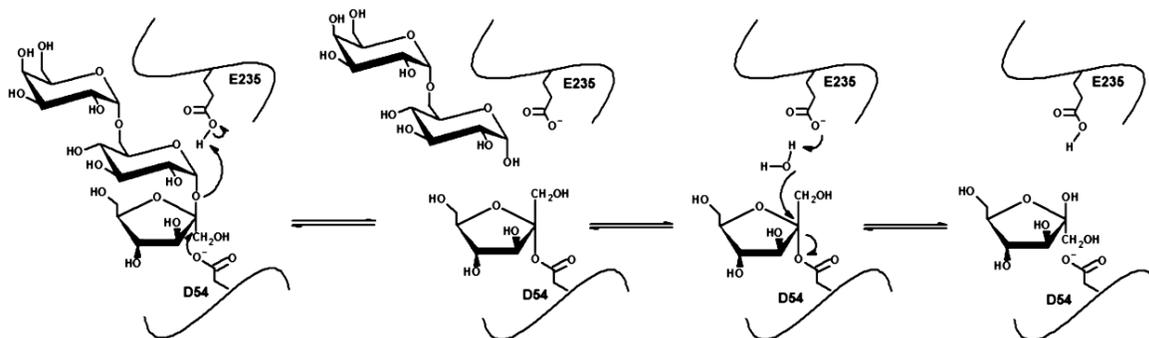


Figura 5. Mecanismo de reacción de la β -fructofuranosidasa de *Bifidobacterium longum* KN29.1 (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011).

Se han aislado y caracterizado β -fructofuranosidasas nativas de *B. infantis* JCM no. 7007 (Imamura, Hisamitsu y col. 1994), *B. adolescentis* G1 (Muramatsu, Onodera y col. 1994) y *B. infantis* ATCC 15697 (Warchol, Perrin y col. 2002). De igual forma, se han producido y caracterizado β -fructofuranosidasas recombinantes de *B. lactis* DSM 10140^T (Ehrmann, Korakli y col. 2003; Janer, Rohr y col. 2004), *B. adolescentis* G1 (Omori, Ueno y col. 2010) y *B. breve* UCC2003 (Ryan, Fitzgerald y col. 2005).

Se ha establecido el pH óptimo de estas enzimas en el rango ácido (6 - 6.5) y su temperatura óptima en el rango de 35 a 55 °C. Además, se ha evaluado su especificidad hacia varios sustratos. Todas las enzimas mencionadas, a excepción de la de *B. breve*, hidrolizan con mayor eficiencia FOS que sacarosa o inulina. Sin embargo, como ya se señaló, la especificidad de estas enzimas hacia fructanas complejas no comerciales, como las del agave, no se ha explorado y sólo las β -fructofuranosidasas recombinantes de *B. longum* JCM 1217 (Omori, Ueno y col. 2010) y de *B. breve* UCC2003 (Ryan, Fitzgerald y col. 2005) se han evaluado para hidrolizar sustratos tipo levana. De la primera sólo se reporta que es capaz de hidrolizar el enlace fructosilo β 2-6 de la neokestosa (DP 3),

mientras que la segunda posee una actividad 40 veces menor sobre levana que sobre oligofructosa tipo β 2-1 (DP 2-20).

En conclusión, las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias reportadas hasta el momento muestran preferencia por hidrolizar sustratos tipo inulina y mucha menor actividad hacia sustratos tipo levana. Así, existe aún la interrogante sobre si en bifidobacterias se requiere de actividades β -fructofuranosidasas específicas para hidrolizar fructanas de estructura compleja y enlaces de tipo β 2-6, como agavina y levana, respectivamente, o si emplean el mismo conjunto de enzimas para todas las fructanas; y si esta degradación ocurre sólo mediante exo-hidrólisis.

III JUSTIFICACIÓN

El mecanismo de degradación de fructanas por bifidobacterias se ha estudiado únicamente para fructanas comerciales del tipo inulina o fructooligosacáridos tipo inulina y se han identificado sólo fructanasas con mecanismo exo-hidrolítico en bifidobacterias (β -fructofuranosidas). Además, estas enzimas no se han caracterizado con fructanas complejas y no comerciales -como aquéllas contenidas en el agave- que forman parte de la dieta y tienen un efecto prebiótico demostrado. La búsqueda de nuevas actividades enzimáticas en bifidobacterias y su caracterización con un amplio rango de sustratos permitiría no sólo establecer si puede ocurrir una hidrólisis endo de fructanas, sino también identificar la especificidad de estas enzimas hacia diferentes estructuras. Por otro lado, un estudio comparativo a nivel global de las actividades enzimáticas que participan en la degradación de diversas fructanas en bifidobacterias, permitiría obtener información importante no sólo acerca del impacto que tiene la estructura de la fructana en el mecanismo de degradación empleado por una cepa de bifidobacteria en particular, sino también del potencial prebiótico de fructanas de diferente estructura.

IV HIPÓTESIS

El efecto prebiótico de diversas fructanas depende de su estructura y peso molecular, al igual que del número y la especificidad de las fructanasas disponibles en microorganismos probióticos, como las bifidobacterias.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Identificar enzimas/actividades enzimáticas involucradas en el proceso de degradación de inulina y agavina por *Bifidobacterium*.

5.2 Objetivos específicos

Minería de genomas:

- Identificar una fructanasa en el género *Bifidobacterium* con bajo porcentaje de identidad con las β -fructofuranosidasas bifidobacterianas reportadas que pudiera tener diferente especificidad de sustrato o mecanismo de hidrólisis.
- Producir heterológamente la enzima identificada.
- Caracterizar bioquímica y cinéticamente la enzima identificada, con el objetivo particular de estudiar su mecanismo de hidrólisis y su preferencia hacia fructanas de estructura diversa.

Cultivos:

- Llevar a cabo cultivos de *B. longum* en medios con inulina y agavina como fuente de carbono.
- Comparar el mecanismo de hidrólisis de inulina y agavina entre ellos y con lo obtenido con la enzima pura.
- Determinar la actividad fructanasa de las diferentes fracciones de *B. longum* (intracelular, pared celular y extracelular) y comparar el perfil de productos durante la hidrólisis de inulina y agavina por las diferentes fracciones.
- Realizar zimogramas de las fracciones obtenidas y comparar las actividades enzimáticas presentes en cada uno.
- Comparar los mecanismos empleados por *B. longum* para crecer en diferentes tipos de fructanas, así como sus preferencias entre estructuras.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Minería de genomas

Se llevó a cabo una búsqueda en todos los genomas de bifidobacterias disponibles, usando el programa PSI-BLAST. Se utilizó la secuencia reportada por Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. (2011) como plantilla (número de acceso ABN04092). La búsqueda estuvo orientada a localizar secuencias clasificadas dentro de la familia 32 de las glucosil hidrolasas por el programa NCBI Conserved Domain Search que tuvieran baja identidad (menos del 40 %) con las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias ya caracterizadas.

6.2 Clonación de Blon_2056

La cepa *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 se cultivó en medio MRS con 0.5 g/L de L-cisteína, previamente desgasificado con CO₂. El cultivo se incubó 16 horas a 37 °C y 200 rpm. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit Ultra Clean Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc). La calidad y cantidad del ADN extraído se verificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop.

La secuencia Blon_2056 se amplificó utilizando los oligonucleótidos: sentido **ATG AGC TCC CCT GAC AAC TAT TCC GTT GCC ATC GAA ACC G** y antisentido **CCG CTC GAG CCG CCA GAT GCC GTC AAG CAC ACG CAC**, diseñados de acuerdo a la secuencia de nucleótidos reportada por el Genbank. Se introdujo un sitio de restricción Sac I en el oligonucleótido sentido y un sitio *Xho* I en el antisentido (indicados en negritas). El programa de PCR empleado se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de PCR para amplificar el gen Blon_2056.

Etapa	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1. Desnaturalización inicial		94	5
2. Desnaturalización	25	94	0.25
3. Alineamiento		55	0.5
4. Elongación		72	2
5. Elongación final		72	10

El peso molecular del producto de PCR se corroboró por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE 0.5X (Tris acetato 20 mM y EDTA 0.5 mM). La electroforesis se desarrolló en amortiguador TAE 0.5X a 100 mV durante 90 minutos. Los geles se tiñeron en solución de bromuro de etidio 0.02 % durante 5 min y se destiñeron en agua durante 15 min.

El producto de PCR se purificó empleando el sistema GenJET PCR Purification Kit (Fermentas) y se clonó en el vector pJET 1.2-blunt vector (Thermoscientific). El plásmido pJET-Blon_2056 se digirió con las enzimas *Sac* I y *Xho* I (New England Biolabs) y el fragmento correspondiente al gen Blon_2056 fue subclonado en el vector pET-22b(+) (Novagen) usando el kit Rapid DNA Ligation (Thermo Scientific).

Células electrocompetentes de *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen) se transformaron con el plásmido resultante pET-22-Blon_2056 y se seleccionaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) adicionadas con ampicilina 50 µg/mL. Las clonas seleccionadas se cultivaron en caldo LB adicionado con ampicilina 50 µg/mL durante 16 h a 37 °C y 200 rpm. El plásmido se extrajo usando el kit GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (Thermo Scientific) y se secuenció usando una plataforma ABI 3130xl (Applied Biosystems). Finalmente, células electrocompetentes de *E. coli* C41(DE3) (Stratagene) se transformaron con el plásmido pET-22-Blon_2056. Las transformantes positivas se seleccionaron en placas de agar LB con ampicilina 50 µg/mL.

6.3 Obtención de la enzima recombinante

Se utilizó una colonia de *E. coli* C41(DE3) transformada con el plásmido pET-22-Blon_2056 para inocular 150 mL de medio YT2X. El cultivo se incubó a 37 °C y 200 rpm. Cuando alcanzó una densidad óptica a 600 nanómetros ($D.O_{600nm}$) de 0.6 se indujo la expresión del gen añadiendo 1 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Posteriormente a la inducción, el cultivo se incubó a 22 °C y 200 rpm por 20 horas.

Las células se cosecharon por centrifugación (3700 x g durante 10 min a 4 °C) en una centrífuga Beckman Coulter Allegra X-22R y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 50 mM pH 6. El extracto proteico se obtuvo sonicando las células en un sonicador 130-Watt Ultrasonic Processor Modelo CV18 (cuatro ciclos de 10 s encendido / 30 s apagado a

70 % de amplitud), seguido de centrifugación para recuperar la proteína soluble (20000 x g, 10 min a 4 °C).

La clonación en el vector pET-22b(+) añade al extremo C-terminal de la enzima una etiqueta de histidinas, lo que permitió su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel. Se utilizó una columna HiTrap®Chelating HP (5 mL) (Amersham Pharmacia Biotech) previamente tratada con NiSO₄ 100 mM y equilibrada con buffer de fosfatos 20 mM pH 8 que contenía 20 mM de imidazol y 500 mM de NaCl (solución A). El extracto proteico se recirculó en la columna durante 10 minutos y la columna se lavó con 5 volúmenes de columna de solución A. La elución de la enzima se llevó a cabo en un equipo AKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech) con un gradiente lineal (0-100 %) de una solución que contenía 20 mM de fosfatos, 500 mM de imidazol y 500 mM de NaCl (solución B), a un flujo de 1 mL/min durante 45 minutos. Se recolectaron fracciones de 3 mL.

Se determinó la actividad enzimática de cada fracción usando la técnica reportada en la sección 6.5. Aquellas fracciones que contenían actividad se analizaron por SDS- PAGE en geles de poliacrilamida al 10 %, según lo propuesto por Laemmli (1970); con algunas modificaciones: la electroforesis se desarrolló utilizando una cámara Mighty Small (Amersham Biosciences) a 10 mA durante aproximadamente 1 hora y media. Se utilizaron geles de 0.5 mm de espesor. Los geles se tiñeron utilizando el reactivo Gel Code Blue Stain (Thermo Scientific), y desteñidos siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Las fracciones más puras se mezclaron y se dializaron contra buffer de fosfatos 100 mM pH 6 durante 12 horas, utilizando una membrana de celulosa con Molecular Weight Cut-Off (MWCO) de 12 kDa.

La proteína total se determinó por el método de Bradford usando el sistema Protein Assay (Bio-Rad) y una curva estándar de albúmina bovina (Sigma).

6.4 Sustratos y estándares

Un componente importante de este proyecto consistió en analizar la actividad β -fructofuranosidasa usando sustratos con una amplia gama de estructuras y pesos moleculares. Se trata tanto de sustratos disponibles comercialmente, como sustratos

producidos *ex profeso* para el proyecto. Los sustratos Oligofructosa P95, Raftilosa synergy 1 y Raftilina HP se obtuvieron de Megafarma®. La inulina sintetizada por la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* y la levana producto de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (SacB) se obtuvieron de acuerdo a la técnica reportada anteriormente (Ortiz-Soto, Olivares-Illana y col. 2004; Porrás-Domínguez, Ávila-Fernández y col. 2015). Las fructanas de agave (agavinas) usadas en este estudio se obtuvieron de plantas de 5 años de edad cultivadas en Morelos, México, y se extrajeron según lo reportado por Ávila-Fernández, Galicia-Lagunas y col. (2011). Los FOS tipo levana se obtuvieron enzimáticamente de acuerdo a lo reportado por Porrás-Domínguez, Ávila-Fernández y col. (2014).

La glucosa, la fructosa y la sacarosa se adquirieron de Sigma-Aldrich, mientras que la 1-kestosa, la 1-nistosa y la 1-fructofuranosilnístosa se adquirieron de Wako Pure Chemicals Industries. El Dr. M. Iisuka (Faculty of Human Science, Kobe Shoin Women's University) nos brindó un estándar de 1-kestosa, 6-kestosa y neokestosa.

6.5 Determinación de la actividad enzimática

Las condiciones de medición de actividad enzimática estándar utilizadas para todos los sustratos – excepto en los casos donde se señale lo contrario –, se describen a continuación. Se midió la velocidad de liberación de poder reductor del sustrato hidrolizado mediante la técnica de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (Miller 1959). La actividad se determinó a pH 6.5 en amortiguador de fosfatos 50 mM a 50 °C y 350 rpm, con una concentración de sustrato al 1 % p/v en un volumen de reacción de 500 µL. A 50 µL de muestra (o de dilución de la muestra) se le agregaron 50 µL del reactivo de DNS, se calentaron las muestras a 95 °C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 500 µL de agua y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650.

La absorbancia se convirtió a gramos de fructosa liberada por litro de reacción utilizando una curva estándar de fructosa. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de extracto enzimático o enzima pura requerida para obtener un µmol de azúcar reductor equivalente a fructosa por minuto. Los ensayos se realizaron por duplicado.

6.6 Efecto de la temperatura y pH y estabilidad térmica

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima se evaluó midiendo la actividad de la enzima a pH 6, bajo las condiciones descritas previamente, en un rango de temperaturas de 20 a 70 °C y utilizando Raftilosa synergy 1 al 1 % como sustrato.

El efecto del pH se determinó midiendo la actividad de la enzima a la temperatura óptima, con valores de pH en el rango de 4.5 a 8, utilizando Raftilosa synergy 1 al 1 % como sustrato y con diferentes buffers de acetatos (pH 4.5–5.5), fosfatos (pH 5.5–7.5) o Tris–HCl (pH 8). Los ensayos se realizaron por duplicado. La estabilidad térmica se evaluó incubando la enzima al pH óptimo y a las temperaturas de 50, 55 y 60 °C. A diferentes tiempos de incubación se tomaron muestras de enzima y se determinó su actividad residual. Los ensayos se realizaron por duplicado.

6.7 Propiedades cinéticas

Se midió la velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de sacarosa (10-600 mM), oligofructosa p95 (1-27 mM) y FOS tipo levana (1-30 mM). Los parámetros cinéticos aparentes se calcularon mediante un ajuste no lineal de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten, usando el programa OriginPro 8 versión 8.0724. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

6.8 Perfil de productos durante la hidrólisis de diversas fructanas por B.longum_11

Se llevaron a cabo reacciones en un volumen de 1.5 mL. Se utilizó una concentración de sustrato del 1 %, buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 a 50 °C y 350 rpm, con una concentración de enzima de 1 U/mL. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción y se expresó el porcentaje de conversión como la concentración de fructosa liberada respecto a la concentración de fructosa contenida en el sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. La cuantificación de fructosa, así como el perfil de productos se analizó según lo señalado en el siguiente apartado.

6.9 Análisis de productos

La fructosa liberada en las reacciones se cuantificó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) marca Waters con un detector de índice de refracción (Waters

410), y una columna de sílica aminada “Prevail Carbohydrate ES” (250 x 4.6 mm) a una temperatura de 30 °C. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/agua en relación 75:25 (v/v) a un flujo de 1.0 mL/min. Se utilizó una curva de fructosa como estándar.

El perfil de productos durante la hidrólisis de inulina y agavina se obtuvo por cromatografía de intercambio aniónico acoplada a un detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD). Las muestras se filtraron (0.22 µm) y se analizaron en un equipo Dionex equipado con un detector electroquímico (ED50 Dionex) y utilizando una columna CarboPac PA-200 (3 x 250 mm). La columna se equilibró a 30 °C con 150 mM de NaOH a un flujo de 0.5mL/min y las fructanas se eluyeron con un gradiente de acetato de sodio (5-100 mM en 20 min y 100-300 mM en 40 min, seguido de 15 min a 300 mM y 15 min para el re-equilibrio de las condiciones iniciales).

El perfil de productos durante la hidrólisis de levanas se obtuvo por Cromatografía de Permeación en Gel (GPC). Las determinaciones se llevaron a cabo en un equipo marca Waters con un detector de índice de refracción (Waters 410) en un sistema de dos columnas conectadas en serie: Ultrahydrogel Linear (7.8x300mm) y Ultrahydrogel 500 (7.8x300mm) con un índice de exclusión entre 0.5 y 10,000 kDa a una temperatura de 30 °C. Como fase móvil se utilizó nitrato de sodio 0.1 M a un flujo de 0.8 mL/min. Las muestras se filtraron antes de su análisis (0.22 µm).

6.10 Crecimiento de *B. longum* en medio con inulina y agavina

La cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 se activó en 10 mL de medio MRS adicionado con 0.5 g/L de L-cisteína. El medio se desgasificó con CO₂, y posteriormente se esterilizó en viales sellados. El cultivo duró 24 horas a 37 °C y 200 rpm.

Posteriormente, se creció en 50 mL de medio con la siguiente composición (g/L): Fructana (inulina HP o agavina) 5, Bacto peptona (Difco) 2, extracto de levadura (Difco) 2, L-cisteína 0.5, Tween 80 2 mL/L, MgSO₄·7H₂O 0.01, CaCl₂·6H₂O 0.01, KH₂PO₄ 0.04, NaCl 0.1 y K₂HPO₄ 0.04. El medio se adicionó con buffer de fosfatos 100 mM y se ajustó el pH a 6.8, se alicuotó en viales sellados, se desgasificó con CO₂ y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. La fructana se esterilizó por filtración usando filtros de polivinilo fluorado (Millex-GV Millipore) de 0.22 µm y se añadió al medio esterilizado

para dar la concentración final indicada. En el caso del control, se sustituyó la fructana por 5 g/L de glucosa.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en 50 mL, por triplicado. El inóculo se realizó con 2.5 mL de un cultivo crecido por 24 horas en medio MRS. Se tomaron muestras para determinar pH, D.O._{600nm} y analizar el perfil de productos. La densidad óptica se determinó a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU650 y el pH en un potenciómetro Metrohm 827. Las muestras para analizar el perfil de productos se centrifugaron 15 minutos a 20 000 x g, el sobrenadante se calentó a 95 °C y se guardó en congelación hasta su análisis.

6.11 Obtención de las diferentes fracciones enzimáticas

Al término de la fermentación, las células se separaron del sobrenadante en una centrifuga Beckman Coulter Allegra X-22R (10 000 x g, 90 min a 4 °C). El sobrenadante se pasó por filtros de acetato y nitrato de celulosa de 0.45 µm (MF Millipore) y se concentró por ultracentrifugación a 10 000 x g y 4 °C utilizando los filtros Amicon Ultra-15 (MWCO 30). Se utilizó buffer de fosfatos 100 mM pH 6 como buffer final al término de la concentración.

Las células se lavaron tres veces con buffer de fosfatos 100 mM pH 6, se resuspendieron en el mismo buffer y se sonicaron (6 ciclos de 10 s encendido / 30 s apagado a 70 % de amplitud) en un sonicador 130-Watt Ultrasonic Processor Modelo CV18. Posteriormente se centrifugaron (20 000 x g, 30 min a 4 °C) y se recolectó el sobrenadante (fracción enriquecida en proteína intracelular) y los restos celulares (fracción enriquecida en pared celular). La fracción enriquecida en proteína intracelular se concentró por ultracentrifugación, tal como se describió previamente. La fracción enriquecida en pared celular se lavó tres veces con buffer de fosfatos 100 mM pH y se resuspendió en el mismo buffer.

Se determinó la actividad β-fructofuranosidasa de los sobrenadantes concentrados, la fracción enriquecida en proteína intracelular y la fracción enriquecida en pared celular mediante la técnica de DNS. Se utilizó inulina HP 1 % como sustrato, buffer de fosfatos 50 mM pH 6, en reacciones de 400 µL a 37 °C y 350 rpm.

6.12 Perfil de productos durante la hidrólisis de inulina y agavina por las diferentes fracciones enzimáticas

El sobrenadante concentrado obtenido de la fermentación de inulina (Sob-I) y de la fermentación de agavina (Sob-A), la fracción enriquecida en proteína intracelular obtenida de la fermentación de inulina (Intra-I) y de la fermentación de agavina (Intra-A), así como la fracción enriquecida en pared celular obtenida de la fermentación de inulina (Par-I) y de la fermentación de agavina (Par-A) se utilizaron para observar el perfil de productos generados durante la hidrólisis de inulina (Raftilina HP®) y agavina en reacciones llevadas a cabo con 0.4 U/mL de cada fracción enzimática.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 1.3 mL, usando buffer de fosfatos 50 mM pH 6, con una concentración de sustrato del 1 % a 37 °C y 350 rpm. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de reacción y se cuantificó la fructosa liberada a fin de calcular el porcentaje de conversión. El perfil de productos generado se analizó como se describió previamente. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

6.13 Zimogramas

Para observar la actividad enzimática contenida en cada fracción, se realizó un análisis por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8 % según lo descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles de 1 mm de grosor. El gel se adicionó con 1 % de diferentes fructanas (inulina de *Leuconostoc citreum* o con levana de alto peso molecular producida por SacB). Se corrieron dos geles en paralelo: uno adicionado con fructana y otro sin adicionarla. A fin de no desnaturalizar de manera irreversible las proteínas, se utilizó buffer de carga sin β -mercaptoetanol y las muestras no se calentaron antes de cargarlas. El análisis por SDS-PAGE se desarrolló bajo las condiciones previamente descritas.

Al final de la electroforesis, al gel que contenía fructana se le cortó el carril del marcador de peso molecular y este carril se tiñó de la forma descrita previamente, al igual que el gel que no contenía fructana. Por otro lado, el resto del gel que contenía fructana se lavó tres veces por 15 minutos con una solución pH 6 que contenía fosfatos 50 mM y Tween 80 al 1 %, a fin de renaturalizar las enzimas. Posteriormente se lavó una vez con buffer de fosfatos 50 mM pH 6 y se dejó incubando en el mismo buffer durante 48 horas a 37 °C.

La actividad enzimática se reveló incubando el gel que contenía fructana en etanol 75 % durante 30 minutos, posteriormente se incubó una hora en una solución de ácido peryódico 0.7 % y ácido acético 5 %, seguido de tres lavados de 15 minutos con una solución de metabisulfito de sodio 0.2 % y ácido acético 5 %. Finalmente, el gel se puso en contacto con el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich). La presencia de actividad se observó por la aparición de halos de claridad.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA PARTE: MINERÍA DE GENOMAS Y CARACTERIZACIÓN DE **B.longum_11**

7.1. Minería de genomas

La minería de genomas o “genome mining” es una técnica que nos permite buscar nuevas proteínas que pudiera tener actividades enzimáticas novedosas de interés, en bibliotecas donde están depositados los genomas secuenciados de diferentes clases de organismos. En este estudio, la minería de genomas se utilizó para identificar alguna enzima bifidobacteriana capaz de hidrolizar fructanas pero que tuviera un mecanismo de hidrólisis distinto al de las enzimas de bifidobacterias hasta ahora caracterizadas (mecanismo endo) o que tuviera especificidad hacia diferentes sustratos. Cabe señalar que ambos tipos de enzimas, endo y exo, comparten la misma estructura, regiones específicas de aminoácidos conservados y mecanismo de reacción, por lo que es complicado diferenciarlas sólo por la secuencia de aminoácidos. Debido a que todas las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias que ya han sido caracterizadas están especializadas en la exo-hidrólisis y comparten un alto porcentaje de identidad entre ellas, nos enfocamos en la búsqueda de secuencias de la misma familia (GH 32) que tuvieran baja identidad con las enzimas ya reportadas, asumiendo que un bajo porcentaje de identidad podría conducirnos a una enzima con un mecanismo de hidrólisis diferente.

Después de analizar los genomas de *Bifidobacterium* disponibles, se encontraron 10 secuencias con bajo porcentaje de identidad. Una de ellas, codificada por el gen Blon_2056, locus_tag: BLON_RS10665, se encontró en el genoma de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, y presentó alrededor de 100 aminoácidos adicionales al promedio reportado para β -fructofuranosidasas de bifidobacterias. Nombramos B.longum_11 a esta proteína.

Al realizar un BLAST con B.longum_11 como secuencia de entrada, encontramos secuencias en otras cepas de bifidobacterias que comparten un porcentaje de identidad entre 75 y 99 % con B.longum_11. Algunas de estas cepas son *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium aesculapii*, *Bifidobacterium merycicum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium kashiwanohense*, y corresponden a cepas de

bifidobacterias que han sido menos estudiadas; inclusive se encontró que *Streptococcus pyogenes* GA19700 contiene la secuencia que codifica para el dominio N-terminal de esta enzima en su genoma.

En la figura 6 se muestra el alineamiento de secuencia de B.longum_11 con las β -fructofuranosidasas ya caracterizadas. Se puede observar que todas las secuencias comparten los motivos conservados DPN, RDP y ECP (subrayados en rojo). En B.longum_11 estos motivos contienen los residuos Asp130, Asp290 y Glu379, respectivamente, que corresponden a los aminoácidos involucrados en el reconocimiento del sustrato y la catálisis. Sesenta de los residuos adicionales de B.longum_11 se encuentran después del motivo RDP y antes del motivo ECP (figura 6), por lo que podrían estar confiriendo características diferentes a esta enzima en cuanto a reconocimiento de sustrato y catálisis, comparada con las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias reportadas hasta el momento y que no poseen estos aminoácidos adicionales.

B.longum_11 presentó un porcentaje de identidad entre 29 y 37 comparada con las demás enzimas reportadas hasta el momento, a pesar de que las enzimas previamente descritas comparten un alto porcentaje de identidad entre ellas (71 a 97 %). Esta diferencia de identidad no radica en los aminoácidos adicionales que posee la enzima. Al retirar estos aminoácidos de la secuencia y hacer de nuevo el alineamiento se observó que el porcentaje de identidad entre B.longum_11 y las demás enzimas se mantuvo entre 29 y 31 %.

Otro elemento estructural interesante es que B.longum_11 contiene 13 cisteínas (2.04 % del número total de residuos), casi el doble del número reportado para el resto de β -fructofuranosidasas de bifidobacterias, las cuales poseen de 5 a 7 cisteínas (0.93 a 1.35 % del número total de residuos). Tres cisteínas están conservadas en las secuencias alineadas y dos de ellas se encuentran cerca de los residuos catalíticos Asp130 y Glu379.

El modelo de estructura tridimensional de la proteína B.longum_11 obtenido con base en su secuencia, utilizando el servidor I-TASSER se muestra en la figura 7-A. Este modelo se obtuvo con base en la estructura de la β -fructofuranosidasa de *Bifidobacterium longum* KN29.1 (código PDB: 3PIG), ya que con esa estructura fue con la que mejor se alineó B.longum_11.

Se puede observar que el modelo muestra un plegamiento muy similar al que presentan las proteínas de la familia 32 de las glucosil hidrolasas: un dominio N-terminal con

plegamiento tipo β -propela y un dominio C-terminal formado por dos arreglos de hojas β antiparalelas cada uno, los cuales se apilan para dar lugar a un plegamiento de tipo β -sándwich. Los aminoácidos adicionales de B.longum_11, al no estar presentes en el molde, se presentan como regiones sin estructura secundaria en el modelo (figura 7-B).

Este plegamiento, al igual que el hecho de que la proteína presente los dominios catalíticos conservados de la familia 32 de las glucosil hidrolasas, nos permitió predecir que la proteína muy probablemente presentaba actividad fructanasa, pero que podría presentar características diferentes en cuanto a mecanismo de hidrólisis o especificidad hacia sustratos, debido a las diferencias en su secuencia encontradas en el alineamiento. Por esta razón se eligió caracterizar esta enzima.

Otro elemento que nos llevó a seleccionar esta enzima como modelo de estudio, fue que se encontró en el genoma de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, ampliamente reconocida como una bacteria probiotica. Esta cepa posee otra β -fructofuranosidasa que ya se caracterizó, y presenta alta afinidad por fructooligosacáridos tipo inulina y un mecanismo exo-hidrolítico (Warchol, Perrin y col. 2002), tal como las β -fructofuranosidasas ya reportadas. Una segunda enzima en la misma bacteria podría poseer características diferentes.

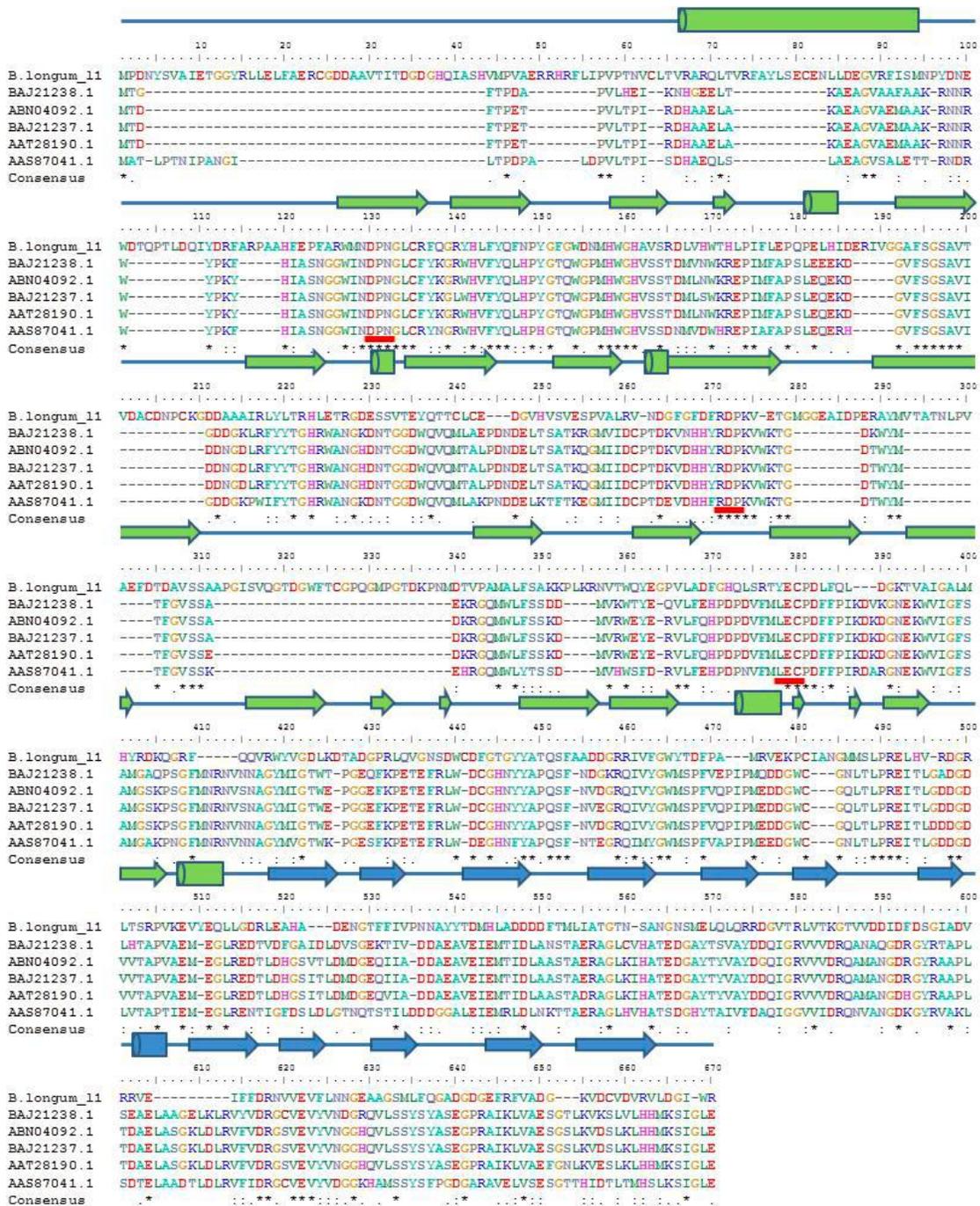


Figura 6. Alineamiento de la enzima localizada en *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 (B.longum_11) con las enzimas de bifidobacterias ya reportadas. Números de acceso: *B. adolescentis* (BAJ21238.1), *B. longum* (ABN04092), *B. longum* subsp. *longum* (BAJ21237.1), *B. breve* UCC2003 (AAT28190.1) y *B. animalis* subsp. *lactis* (AAS 87041.1). La estructura secundaria pertenece a la estructura 3PIG de la proteína ABN04092.1. Los elementos estructurales de la β -propela se muestran en verde, y aquéllos del β -sándwich en azul. Los cilindros representan α -hélices y las flechas representan laminas β .

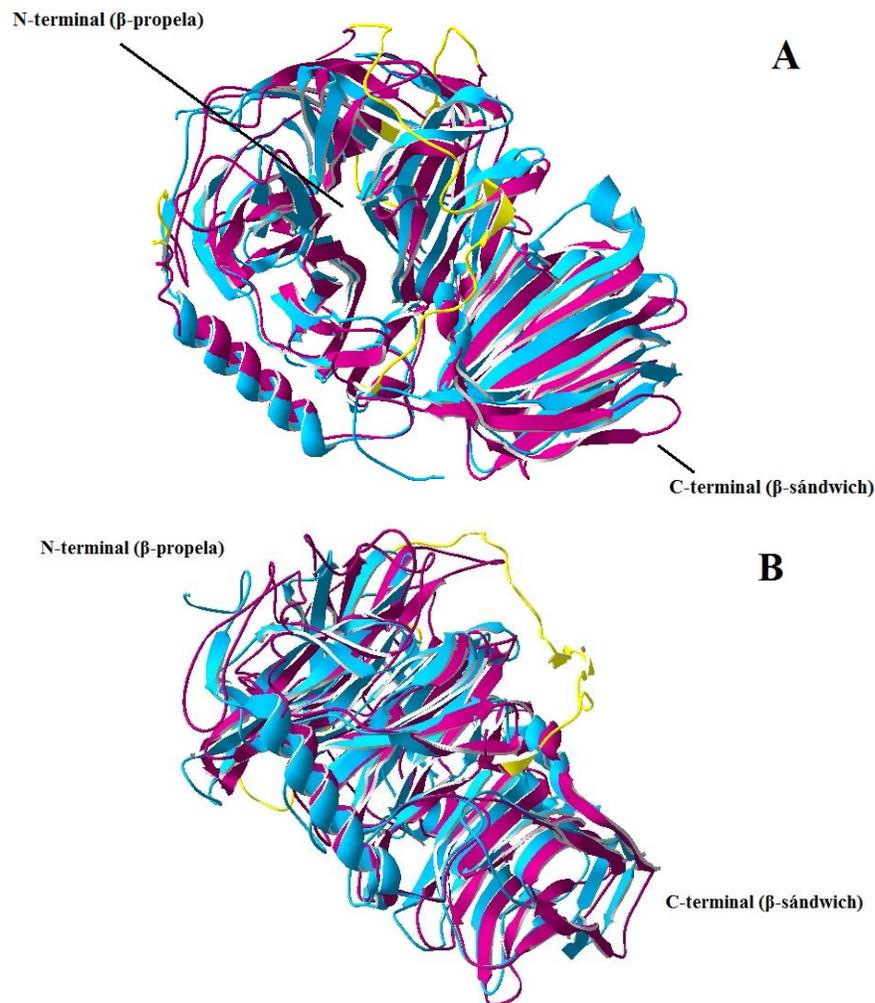


Figura 7. A) Modelo de estructura tridimensional obtenido para B.longum_11. El molde (PBD 3PIG) se muestra en azul y el modelo en rosa. La región de aminoácidos adicionales de B.longum_11 se muestra en amarillo. B) Figura obtenida rotando el modelo a fin de apreciar la región adicional de B.longum_11.

7.2 Clonación del gen, expresión y purificación de la enzima recombinante

Mediante el diseño de oligonucleótidos específicos para la secuencia reportada por el GenBank, y bajo las condiciones descritas en la tabla 1, se logró amplificar el gen Blon_2056. En la figura 8 se observa el resultado de la amplificación analizado por electroforesis, el cual corresponde al tamaño esperado de 1911 pb.

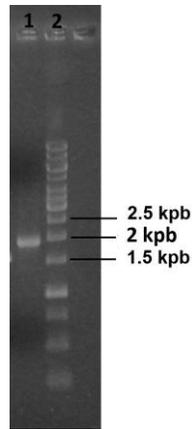


Figura 8. Gel de agarosa al 1 %. 1) Producto de la amplificación por PCR de Blon_2056, 2) Marcador de peso molecular.

El gen amplificado fue clonado exitosamente en el plásmido de clonación pJET1.2, y subclonado en el plásmido de expresión pET-22b(+). La secuencia nucleotídica contenida en el plásmido correspondió al 100 % con la secuencia reportada en la base de datos, según los resultados de la secuenciación de pET22-Blon_2056. En la figura 9 se esquematiza la construcción pET22-Blon_2056. Se observa que el gen clonado en este vector se encuentra fusionado al péptido señal (pEL B) en la región N-terminal. Una vez que se expresa la proteína, este péptido señal la dirige hacia el espacio periplásmico. De igual forma, la proteína se expresa con una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal que permite purificar la enzima en un solo paso mediante una columna de afinidad a iones metálicos.

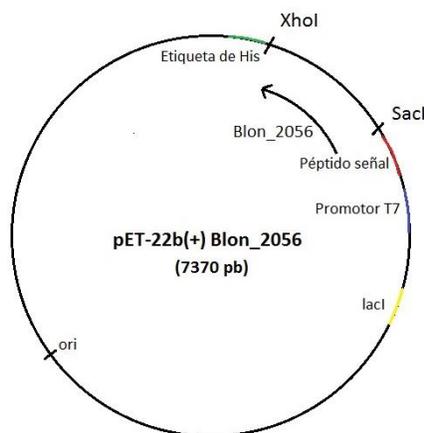


Figura 9. Construcción pET22-Blon_2056

Después de analizar la expresión de Blon_2056 en diferentes cepas de *E. coli* se decidió trabajar con la cepa C41(DE3), debido a que se observó que en ésta se obtenía la mayor cantidad de enzima en la fracción soluble, mientras que en otras cepas la mayor cantidad de enzima se encontraba en la fracción insoluble, probablemente en cuerpos de inclusión. Se transformaron células de *E. coli* C41(DE3) con el vector pET22-Blon_2056 y se indujo la sobreexpresión de la enzima utilizando IPTG 0.5 mM. Las células se lisaron por sonicación y se obtuvo el extracto enzimático mediante centrifugación. Posteriormente, la enzima se purificó por cromatografía de afinidad como se describió en los materiales y métodos y la enzima recombinante se nombró B.longum_11.

En la figura 10 se puede observar la sobreexpresión de la enzima en el extracto proteico, así como una sola banda al final del proceso de purificación, lo que nos indica que la enzima está pura. El peso molecular observado por SDS-PAGE corresponde al peso molecular predicho de 75.9 kDa considerando la adición de la etiqueta de histidinas y la secuencia del péptido señal. El peso molecular de la enzima se calculó con base en la secuencia de aminoácidos reportada en el GenBank y utilizando la herramienta Compute pI/MW del servidor ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/). De las fructanasas aisladas de bifidobacterias y reportadas hasta la fecha, esta es la de mayor peso molecular.

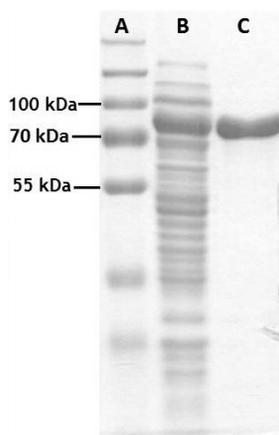


Figura 10. SDS-PAGE del proceso de purificación de la enzima B.longum_11 de *B. longum* expresada en *E. coli* C41(DE3). A) Marcador de peso molecular, B) Extracto proteico, C) Enzima purificada.

En la tabla 2 se muestra el proceso de purificación. Se puede observar que la fracción obtenida después de la cromatografía es alrededor de doce veces más pura y que se recuperó alrededor del 75 % de la actividad total contenida en el extracto.

Tabla 2. Proceso de purificación de la enzima B.longum_11 de *B. longum* expresada en *E. coli* C41(DE3).

Muestra	Vol Total (mL)	Contenido de proteína (mg/mL)	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Recuperación (%)
Extracto proteico	13	14.8	470.8	6120.4	31.7	---	100
Enzima pura	14	0.8	328.4	4597.6	390.38	12	75

7.3 Caracterización de la fructanasa B.longum_11.

7.3.1 Temperatura y pH óptimos de la fructanasa B.longum_11

Se evaluó la actividad de la enzima sobre Raftilosa synergy 1 en un rango de temperaturas de 20 a 70 °C, encontrándose que su temperatura óptima es de 50 °C, como se observa en la figura 11. La temperatura óptima de la enzima está por arriba de la temperatura óptima de crecimiento de la bacteria de donde se aisló (*B. longum*). Se ha reportado un comportamiento similar para una β -fructofuranosidasa aislada de *B. longum* KN29.1, que tiene una temperatura óptima de 50 °C (Jedrzejczak-Krzepkowska, Tkaczuk y col. 2011), y para una β -fructofuranosidasa de *B. infantis*, cuya temperatura óptima es de 55 °C (Imamura, Hisamitsu y col. 1994).

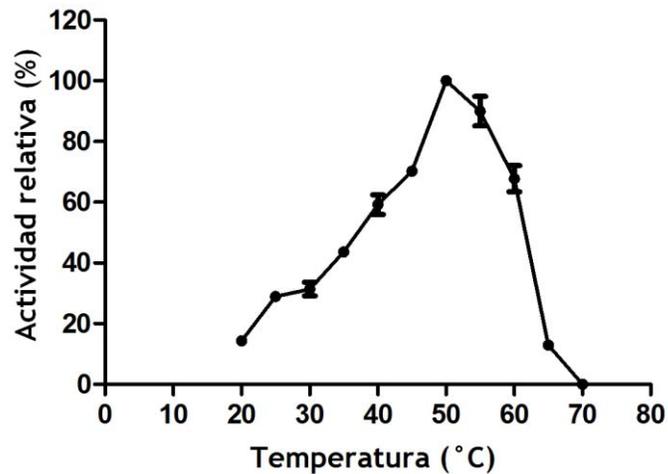


Figura 11. Efecto de la temperatura en la actividad de la fructanasa B.longum_11 de *B. longum*.

El pH óptimo se evaluó midiendo la actividad de la enzima a la temperatura óptima en un rango de pH de 4.5 a 8 y usando Raftilosa synergy 1 como sustrato. Como se observa en la figura 12, se encontró que su pH óptimo fue de 6.5, igual al reportado para una β -fructofuranosidasa de *B. lactis* DSM10140^T (Ehrmann, Korakli y col. 2003) y cercano al de otras β -fructofuranosidasas bifidobacterianas como la de *B. breve* UCC2003 (Ryan, Fitzgerald y col. 2005) y *B. infantis* ATCC 15697 (Warchol, Perrin y col. 2002) para las cuales se reportó un pH óptimo de 6. Como podemos observar, el comportamiento en cuanto a temperatura y pH óptimo de B.longum_11 es muy similar al de las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias ya reportadas.

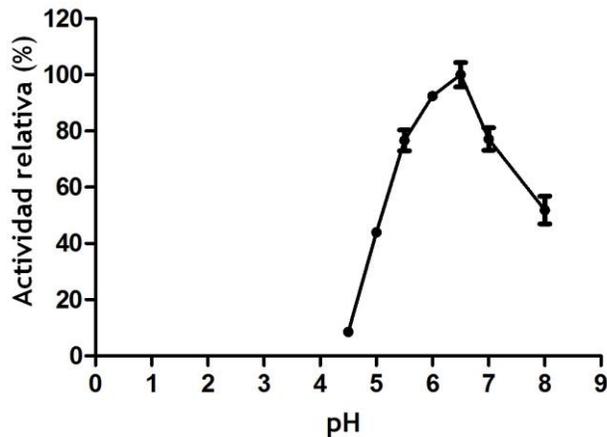


Figura 12. Efecto del pH en la actividad de la fructanasa B.longum_11 de *B. longum*.

7.3.2 Estabilidad térmica funcional de la fructanasa B.longum_11

En la figura 13 se muestra la estabilidad térmica funcional de la enzima a diferentes temperaturas. Se puede observar que la enzima es estable a la temperatura óptima de 50 °C, con un tiempo de vida media de 75.5 horas. Por arriba de esa temperatura la actividad cae relativamente rápido en función del tiempo de incubación. Así, a 55 °C, el tiempo de vida media es ya de 5.2 horas, mientras que a 60 °C es tan solo de 6 minutos.

Se ha reportado que una β -fructofuranosidasa nativa de la misma cepa pierde la mitad de su actividad después de 75 minutos a 55 °C (Warchol, Perrin y col. 2002), mientras que una β -fructofuranosidasa recombinante de *B. longum* JCM 1217 fue estable por sólo 5 minutos a 50 °C (Omori, Ueno y col. 2010). Por otro lado, las β -fructofuranosidasas nativas y recombinantes de *B. longum* KN29.1 fueron estables 30 minutos hasta 45 °C (Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska y col. 2011) y una β -fructofuranosidasa nativa de *B. infantis* JCM 7007 fue estable por 30 minutos a 40 °C (Imamura, Hisamitsu y col. 1994). Aunque los resultados no son del todo comparables, nuestros resultados sugieren que B.longum_11 es la fructanasa bifidobacteriana más estable funcionalmente reportada hasta el momento.

El modelo tridimensional de B.longum_11 (figura 7) mostró que cuatro de las cisteínas encontradas en esta enzima (residuos 81, 63, 208 y 240), y ausentes en las demás secuencias alineadas, se encuentran cerca en el modelo, pero no orientadas de forma correcta para formar puentes disulfuro. Sin embargo, es importante recalcar que tres de las cisteínas mencionadas están localizadas en regiones poco alineadas con el molde utilizado

para construir el modelo, por lo tanto, la posición y orientación real de estos residuos podría estar modificada en el modelo. La presencia de puentes disulfuro adicionales en B.longum_11, y ausentes en las demás enzimas caracterizadas hasta el momento, podría ser la explicación de la mayor estabilidad térmica funcional de esta enzima.

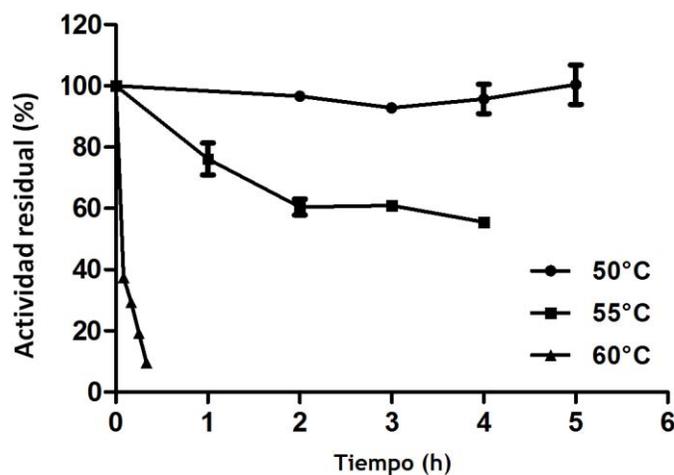


Figura 13. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la actividad de la fructanasa B.longum_11 de *B. longum*.

7.3.3 Actividad de la fructanasa B.longum_11 sobre fructanas de distintos orígenes

Se determinó la actividad de la enzima B.longum_11 sobre fructanas de diversos orígenes. Los sustratos utilizados fueron Raftilosa p95® (FOS y oligofructosa tipo inulina DP 2-8), Raftilina HP® (inulina DP 2-60), Raftilosa synergy 1® (mezcla 50:50 de Raftilosa p95 y Raftilina HP), agavina (DP promedio 38), inulina producida por la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28 (DP promedio 20 000), levana de alto (Lev A) y de bajo (Lev B) peso molecular producidas por la levansacarasa SacB de *B. subtilis*, para las cuales sólo se sabe el rango de DP para LevB (DP 45-70), FOS tipo levana (FOS y oligofructosa DP 2-8) y finalmente sacarosa. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

Se observa que la enzima es capaz de hidrolizar una gran diversidad de sustratos: sustratos de estructura tipo inulina y tipo levana, de origen vegetal y bacteriano, de alto y de bajo peso molecular. La mayor actividad se obtuvo con FOS de tipo levana (β 2-6), seguido de Raftilosa p95. En general, la actividad de la enzima resulta menor cuando se emplean sustratos de alto peso molecular, independientemente del tipo de enlace. Ambos sustratos

hidrolizados con mayor eficiencia son una mezcla que contiene FOS de DP 2 a 8; sin embargo, los FOS tipo levana presentan mayor proporción de FOS y oligofructosa DP 2-4; mientras que Raftilosa p95 contiene mayor proporción de FOS y oligofructosa DP 4-6. Así, el hecho de que los FOS tipo levana tiendan a ser de menor peso molecular pudiera ser la razón por la que se ha obtenido mayor actividad con respecto a los FOS tipo inulina.

Las endo-inulinasas y las endo-levanasas generalmente reconocen un solo tipo de enlace. *B.longum_11* hidroliza ambos tipos de enlace, β 2-1 y β 2-6, y es más activa con FOS que con fructanas de mayor peso molecular, por lo que su mecanismo de hidrólisis es de tipo exo.

Tabla 3. Actividad relativa de la fructanasa *B.longum_11* de *B. longum* sobre sustratos de diversas estructuras y orígenes*.

Sustrato	PM (Da)	Actividad relativa (%)
FOS β(2-6)	829	100
Raftilosa p95	829	82
Sinergy®	6200	49
Agavina	3220	20
Sacarosa	342	11
Inulina HP®	5693	8
Lev B	8300	4.5
Inulina <i>L. citreum</i>	3000000	0.5
Lev A	3500000	0.3

*El 100 % de actividad corresponde a 31.8 U/mg medidas con FOS β 2-6 10 g/L a 50 °C y pH 6.5.

La tasa de actividad invertasa por actividad inulinasa (S/I) resultó ser de 1.28 para *B.longum_11*. Se ha reportado que esta relación es mayor a 1500 para las verdaderas invertasas y menor a 10 para las inulinasas (Vandamme y Derycke 1983). Por esta razón la enzima puede ser clasificada como una β -fructofuranosidasa, dada su preferencia para hidrolizar inulina y levana sobre sacarosa y su capacidad para hidrolizar ambos tipos de enlace β (2-1) y β (2-6) con una velocidad similar.

7.3.4 Caracterización cinética de la β -fructofuranosidasa *B.longum_11*

La actividad relativa nos da una idea de la preferencia con la que actúa la enzima ante diversos sustratos, lo que resulta de suma utilidad si consideramos que la mayor parte de

ellos son considerados prebióticos. Sin embargo, para poder evaluar el desempeño de la enzima con cada sustrato de manera formal es necesario compararlos en términos de los parámetros cinéticos con los que actúa en el proceso de hidrólisis. Se decidió caracterizar cinéticamente a la enzima con los dos mejores sustratos: FOS tipo levana y Raftilosa p95, así como con agavina por ser de interés en este estudio y con sacarosa por ser una referencia importante.

En la tabla 4 se muestran los parámetros cinéticos de la enzima B.longum_11 hacia estos sustratos. Cabe señalar que debido a que los sustratos que se desea evaluar son mezclas de carbohidratos con diferente grado de polimerización y de estructura diversa, los parámetros calculados sólo pueden usarse con fines comparativos y serán llamados parámetros cinéticos aparentes para diferenciarlos de aquellos parámetros para sustratos menos complejos, como la sacarosa, para los que el peso molecular y la concentración molar del sustrato están bien definidos.

Como se puede observar, la afinidad de la enzima (K_m) fue mucho mayor para cualquiera de las fructanas evaluadas que para la sacarosa, lo que corrobora la clasificación de la enzima como β -fructofuranosidasa y no como invertasa. Este parámetro cae en el mismo orden de magnitud para las tres fructanas, y no hay una diferencia significativa entre ellas en términos de afinidad, lo que nos permite concluir que la enzima tiene una afinidad similar para las fructanas en general, independientemente de su estructura.

Sorprendentemente, la mayor actividad específica se obtuvo con la agavina. De hecho, se alcanzaron mayores velocidades específicas (k_2) para los FOS tipo levana y para la agavina. Conviene recordar que los FOS tipo levana tienen el mismo rango de DP que la Raftilosa p95, sin embargo, los primeros tienen una mayor proporción de FOS con DP 2-4, mientras que en la Raftilosa p95 la mayor proporción es de FOS con DP 4-6, por lo que para una misma concentración molar hay mayor número de moléculas de los FOS tipo levana que de Raftilosa p95 en el medio de reacción. Esto podría dar lugar a un aumento en la velocidad de reacción que justificara las diferencias, ya que hay más extremos no reductores donde puede actuar la enzima. Si pensamos en la agavina ocurre algo similar: para una misma concentración, dada su estructura ramificada, en la agavina se tiene un mayor número de extremos no reductores sobre los cuales puede actuar la enzima. Esta puede ser la explicación al hecho de haber alcanzado mayores velocidades de reacción cuando se trabajó

con agavina. Esto influenció también la eficiencia catalítica de la enzima (K_{cat}/K_m), la cual fue mayor para la agavina, seguida de los FOS tipo levana, Raftilosa p95 y por último sacarosa.

Tabla 4. Parámetros cinéticos aparentes de la β -fructofuranosidasa B.longum_11 hacia diferentes sustratos*.

Sustrato	K_m (mM)	k_2 ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ prot)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Sacarosa	60.2 ± 4.2	303.2 ± 6.3	383.3	6.4
Raftilosa p95	4.6 ± 0.7	724.9 ± 33.8	917.5	199.5
FOS tipo levana	9.2 ± 2.2	907.6 ± 85.9	1148.6	124.9
Agavina	7.7 ± 1.7	1637.5 ± 117.3	2000.0	261.0

*Parámetros cinéticos calculados asumiendo un peso molecular promedio de 828.7 g/mol para FOS tipo levana, 828.7 g/mol para Raftilosa p95, 6200 g/mol para agavina, 342 g/mol para la sacarosa y 75 934 g/mol para la enzima.

7.3.5 Perfil de productos de la β -fructofuranosidasa B.longum_11 durante la hidrólisis de diversas fructanas

Se decidió estudiar la evolución de la reacción usando inulina (Raftilina HP) al 1 % como sustrato modelo. En la figura 14 se muestran los cromatogramas que muestran el perfil de productos a diferentes tiempos de reacción, obtenidos mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se puede observar la liberación progresiva de fructosa al medio, asociada con una disminución en la señal de los picos de mayor peso molecular (mayor tiempo de elución) y un desplazamiento de dichas señales hacia productos de menor peso molecular (menor tiempo de elución). Después de 6.5 horas de reacción, el principal producto fue fructosa. Con esto, se puede concluir que la enzima actúa mediante un mecanismo exo, tomando una cadena de inulina e hidrolizando el residuo de fructosa terminal.

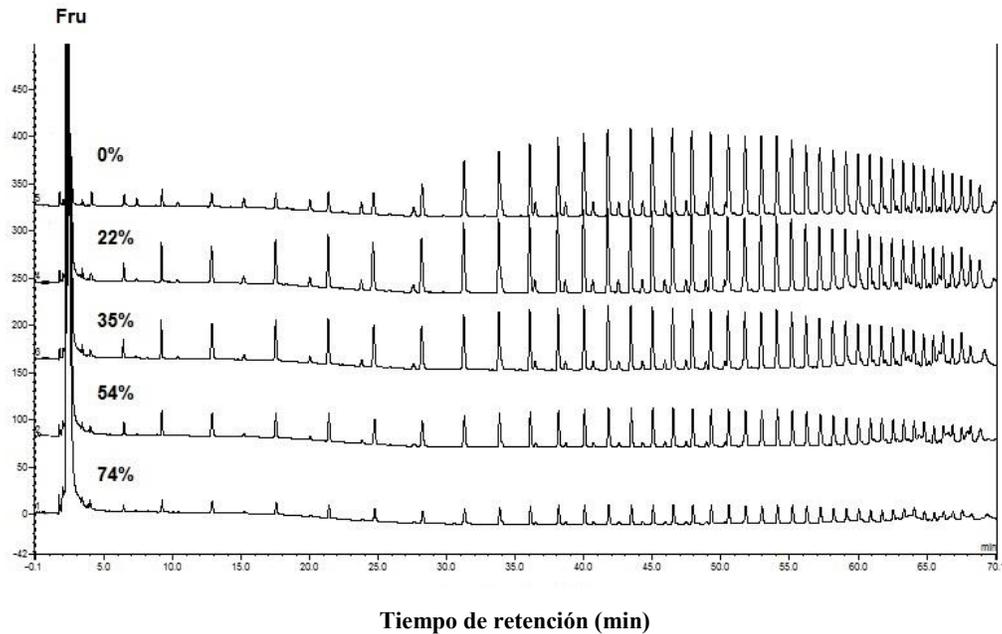


Figura 14. Evolución del perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por la β -fructofuranosidasa B.longum_11 de *B. longum* analizado por HPAEC-PAD. Se muestra el porcentaje de conversión en base a la fructosa (Fru) liberada.

De igual forma, se exploró el perfil de productos obtenido durante la hidrólisis de levana de alto peso molecular (LevA) por B.longum_11 (Figura 15). Este análisis se realizó por cromatografía de permeación en gel, debido a que el alto peso molecular del polímero no permite observarlo por HPAEC-PAD. El comportamiento observado es el mismo: la liberación progresiva de fructosa al medio acompañada de una disminución del peso molecular de la fructana y por lo tanto un desplazamiento de la señal de LevA hacia mayores tiempos de retención (nótese que en esta técnica los mayores tiempos de retención indican menor peso molecular, a diferencia del HPAEC-PAD, donde es el caso contrario). Se exploró también el perfil de productos a lo largo de la reacción utilizando agavina al 1 % como sustrato. En la figura 16 se muestran los cromatogramas a diferentes tiempos de reacción. Se observó el mismo mecanismo exo-hidrolítico que da lugar a fructosa como el principal producto.

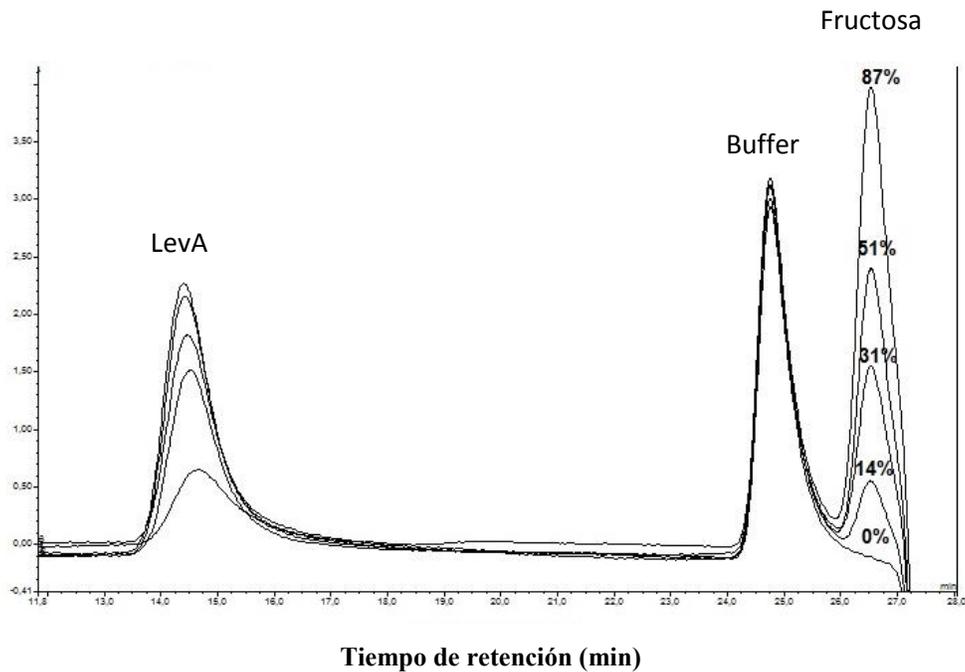


Figura 15. Evolución del perfil de productos durante la hidrólisis de levana de alto peso molecular (LevA) al 1 % por la β -fructofuranosidasa B.longum_11 de *B. longum* analizado por GPC. Se muestra el porcentaje de conversión con base en la fructosa liberada.

Un elemento importante a destacar en el proceso de hidrólisis de agavina, es el hecho de que a los 10 minutos (20 % de conversión), se puede apreciar la aparición de dos señales a los 8.5 y 11.25 minutos y el aumento de una señal a los 5.7 minutos (marcadas con una flecha en la figura). Estas señales corresponden a los principales productos obtenidos después de la fructosa, y se acumulan para posteriormente ser degradados. Su patrón de elución sugiere que se trata de FOS que constan de una misma base estructural a la que se van añadiendo residuos fructosilo. La primera de ellas (5.7 minutos) se identificó como 6-kestosa en función de su tiempo de elución igual que el estándar de este azúcar. El segundo intermediario (8.5 minutos) se identificó como bifurcosa. La bifurcosa es el producto resultante de añadir un residuo fructosilo a la 6-kestosa en la posición 1 de la fructosa proveniente de la sacarosa. El tercer producto acumulado (11.25 minutos) correspondería a fructofuranosil-bifurcosa, el producto de añadir un residuo fructosilo a la bifurcosa en la posición 1 de la fructosa terminal unida mediante enlace $\beta(2-1)$. Estos FOS se acumulan durante la hidrólisis de agavina debido a que se trata de unidades de moléculas ramificadas, por lo que son más difíciles de degradar por la enzima. A pesar de que se acumulan al

inicio de la reacción, acaban por ser hidrolizados más lentamente, una vez que se consumen las cadenas por las que la enzima tiene mayor afinidad.

Como se planteó en los antecedentes, se ha propuesto que las fructanas del agave se sintetizan a partir de bifurcosa (Mancilla-Margalli y López 2006). Nuestros resultados muestran que esta molécula también es un intermediario importante durante su degradación.

La identificación de la bifurcosa se logró con el apoyo de la Dra. Érika Mellado Mojica (CINVESTAV, Unidad Irapuato). Se utilizó el patrón de elución de muestras de agavina caracterizadas estructuralmente y se comparó con los intermediarios de reacción obtenidos. Debido a que la identificación de la 6-kestosa y la bifurcosa se realizó únicamente en función de la similitud en los tiempos de elución, es necesario confirmar las estructuras purificando y analizando estos productos, una perspectiva a corto plazo de este trabajo de investigación.

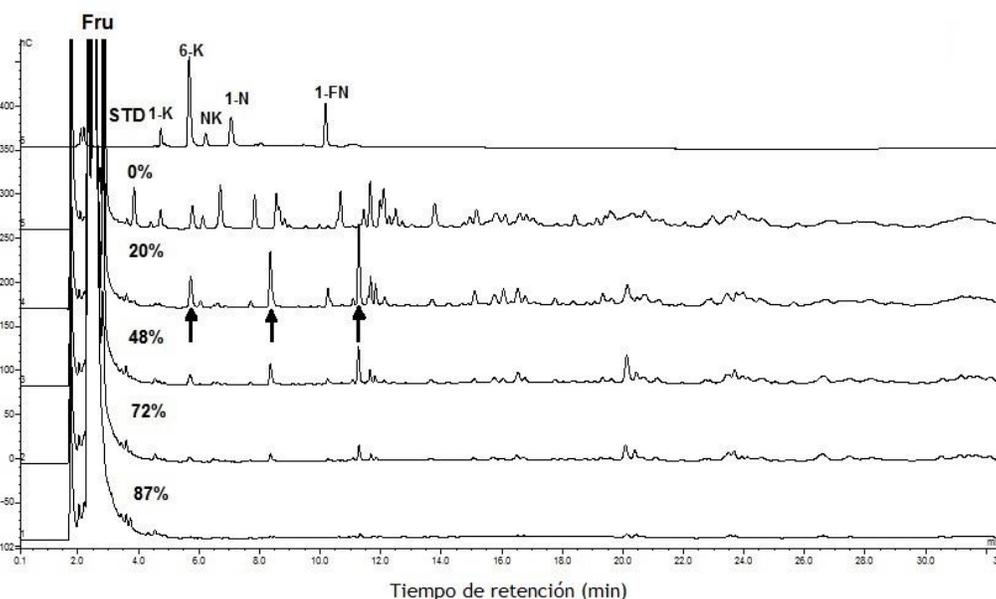


Figura 16. Efecto del tiempo de reacción en el perfil de productos de hidrólisis de agavina al 1 % por la β -fructofuranosidasa B.longum_11 de *B. longum* analizado por HPAEC-PAD. Se señala el porcentaje de conversión y los principales intermediarios. El estándar (STD) corresponde a 1-kestosa (1-K), 6-kestosa (6-K), neokestosa (NK), 1-nistosa (1-N) y 1-fructofuranosil nistosa (1-FN).

VIII CONCLUSIONES A LA PRIMERA PARTE

Se aisló y se caracterizó la enzima B.longum_11 de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. Esta enzima tiene un comportamiento similar a las β -fructofuranosidasas ya reportadas en cuanto a temperatura y pH óptimo; sin embargo, es la enzima más estable, funcionalmente hablando, reportada hasta el momento y también la de mayor peso molecular. La diferencia en estabilidad podría deberse a que B.longum_11 contiene mayor número de cisteínas, que podrían estar formando puentes disulfuro que le confieren mayor estabilidad funcional a la enzima. Por otro lado, la diferencia en peso molecular se debe a que B.longum_11 contiene alrededor de 100 aminoácidos adicionales al promedio reportado para β -fructofuranosidasas de bifidobacterias. Sesenta de los residuos adicionales se encuentran después del motivo RDP y antes del motivo ECP, el resto se encuentran en la región amino terminal. Se ha reportado que las β -fructofuranosidasas de bifidobacterias contienen una α -hélice en la región N-terminal que las distingue del resto de las estructuras pertenecientes a la familia 32 de las glucosil hidrolasas y que podría ser resultado de una adaptación que le permite a la enzima funcionar bajo las condiciones del sistema digestivo humano. La predicción de estructura secundaria de la región N-terminal de B.longum_11, llevada a cabo con el servidor CFSSP, sugirió que los residuos 65 a 93 forman una α -hélice, por lo que algunos de los aminoácidos adicionales de B.longum_11 podrían corresponder a la α -hélice identificada en otras β -fructofuranosidasas de bifidobacterias, pero más larga, ya que la hélice formada en B.longum_11 contiene 12 residuos más que la hélice previamente descrita. Para el resto de aminoácidos adicionales aún se desconoce su función.

B.longum_11 es una β -fructofuranosidasa de amplio espectro, ya que puede actuar sobre fructanas de diferentes estructuras y tipos de enlace. Al igual que otras β -fructofuranosidasas de bifidobacterias, posee un mecanismo exo-hidrolítico que libera fructosa como principal producto al final de una reacción.

Los resultados en cuanto a la especificidad de la enzima sugieren que una misma enzima podría participar en la hidrólisis de fructanas de diferente estructura por *B. longum*. El parámetro estructural del sustrato que más afecta la actividad de la enzima es su peso molecular, por lo que si pudiéramos decir que es una enzima especializada en la

degradación de algún tipo de fructana, no sería para inulina, levana ni agavina, sino para FOS u oligofructosa.

Nuestros resultados concuerdan con las características fisiológicas reportadas para *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, una cepa caracterizada por su capacidad para crecer en un amplio rango de sustratos prebióticos. Además, se identificaron secuencias en otras cepas de bifidobacterias que presentan entre 75 y 99 % de identidad con B.longum_11, por lo que esta enzima de amplia especificidad al parecer está presente también en otras bifidobacterias menos estudiadas. La amplia especificidad de la enzima B.longum_11 podría contribuir a la competitividad y persistencia de estas cepas en el colon.

IX RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SEGUNDA PARTE: CULTIVOS DE *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 EN INULINA Y AGAVINA

9.1 Crecimiento y degradación de inulina y agavina por *B. longum*

Debido a que la enzima identificada y caracterizada se aisló de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 se decidió trabajar con esta cepa en cultivos con fructanas, llevando a cabo un análisis comparativo del proceso de hidrólisis del sustrato, similar al que se hizo para la β -fructofuranosidasa, pero ahora con el cultivo completo y sus fracciones, analizando las enzimas que se inducen en cada caso. Se utilizó inulina y agavina, a fin de identificar si existen diferencias en las enzimas y mecanismo de hidrólisis utilizado para una fructana de estructura simple y otra compleja.

En la figura 17 se observa el crecimiento de *B. longum* en inulina y agavina y la caída de pH en función del tiempo de fermentación. En las figuras 18 y 19 se muestran los cromatogramas de la degradación de inulina y agavina a lo largo de la fermentación obtenidos por HPAEC-PAD.

En el caso del crecimiento en inulina, podemos observar una fase lag de aproximadamente 3 horas, tiempo en el cual el perfil de inulina observado por HPAEC-PAD se mantiene inalterado. A las 6 horas el crecimiento ya se encuentra en fase exponencial; y en ese punto, el perfil de inulina muestra que desaparecen las señales correspondientes a las cadenas menores a DP 16, mientras que los sustratos de mayor peso molecular permanecen sin modificación. El crecimiento se mantiene exponencial entre las 8 y 10 horas, a pesar de que el perfil de inulina sigue sin modificarse durante ese tiempo, es decir no existe una degradación del polímero en ese periodo. Probablemente el crecimiento se mantiene por el consumo de los FOS menores a DP 16 que desaparecen desde las 6 horas de cultivo.

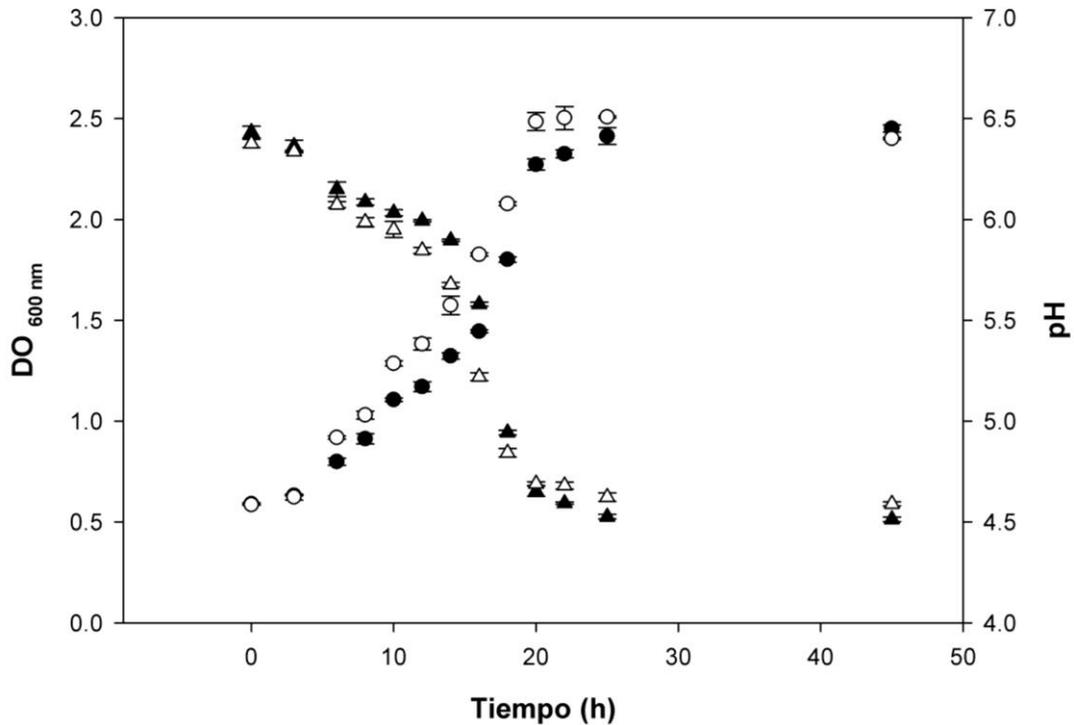


Figura 17. Crecimiento (círculos) y caída de pH (triángulos) de cultivos de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 con inulina (símbolos negros) y agavina (símbolos blancos).

De las 10 a las 12 horas hay una reducción de la velocidad de crecimiento que se manifiesta como un ligero cambio en la pendiente de la curva de crecimiento, como se puede observar en la figura 17. Por otro lado, el perfil de los componentes de la inulina permanece sin modificación entre las 10 y 12 horas, es decir todavía no existe una degradación del polímero durante ese tiempo.

A partir de las 14 horas de cultivo se puede observar la aparición constante de señales de menor DP a lo largo del tiempo, y al mismo tiempo un decremento de las señales correspondientes a las cadenas de mayor peso molecular. Esto significa que las moléculas de mayor tamaño se están degradando, dando lugar a productos de menor peso molecular. A partir de este tiempo se restablece el crecimiento exponencial, que continúa hasta las 20 horas. A las 20 horas empieza la fase estacionaria, a pesar de que en el cromatograma de inulina todavía se observan señales de sustrato sin hidrolizar. Probablemente el sustrato remanente no es suficiente para mantener el crecimiento, por el agotamiento de otro elemento limitante para el cultivo o por el uso del sustrato para el mantenimiento de las

células ya presentes. Esto se corroboró con los resultados de las 45 horas, cuando se observa que el microorganismo ha dejado de crecer (se mantiene la D.O._{600nm} constante) y toda la inulina ya se ha hidrolizado.

El comportamiento con agavina es muy similar al observado con inulina. A pesar de que las señales no se definen claramente como para el caso de la inulina, se puede observar cómo disminuyen las señales de menor peso molecular durante las primeras 6 horas de la fermentación, mientras que las señales de mayor peso molecular empiezan a disminuir sólo después de las 12 horas de cultivo (Figura 19). En el caso de la agavina, las señales de mayor peso molecular eluyen juntas como una meseta que va desapareciendo a lo largo del tiempo.

De esta forma, el crecimiento de *B. longum* en inulina y agavina parece presentar un comportamiento diaúxico, donde primeramente se consumen las cadenas más pequeñas (<DP 16) y posteriormente se hidrolizan las cadenas de mayor peso molecular. Probablemente esto se debe a que durante las primeras horas de la fermentación la actividad β -fructofuranosidasa en el medio es muy poca. Si al igual que *B.longum_11*, el resto de enzimas presentes tienen afinidad por fructanas de menor peso molecular, o si *B.longum_11* es la actividad predominante, es lógico que las cadenas de menor tamaño se hidrolicen primero. La hidrólisis de las cadenas de menor peso molecular da lugar a fructosa que induce la producción de más actividad β -fructofuranosidasa, según lo reportado previamente (Perrin, Warchol y col. 2001). Es hasta que se produce más actividad que las cadenas más grandes se hidrolizan. De igual forma, pudiera estar ocurriendo que las fructanas más pequeñas se transporten primero por la célula, sin necesidad de una hidrólisis extracelular. En este caso la producción de β -fructofuranosidasa sería también el paso limitante para el consumo de las cadenas de mayor tamaño, que sí requieren ser hidrolizadas para poder ser internalizadas. Algo que refuerza este último punto es que en los cromatogramas no se observan intermediarios de hidrólisis menores a DP 11, a diferencia de los perfiles de productos obtenidos en la reacción con *B.longum_11*. Por lo tanto, cabe la hipótesis de que las moléculas de DP < 11 estén siendo transportadas al interior celular conforme se producen, sin necesidad de una hidrólisis mayor.

La hidrólisis preferencial de fructanas de menor DP, seguida de la hidrólisis de fructanas de mayor peso molecular ya ha sido reportada para esta y otras cepas de bifidobacterias (Van

der Meulen, Avonts y col. 2004; Van-der-Meulen, Makras y col. 2006). Perrin, Fournies y col. (2002) encontraron que *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 consumía primero los FOS tipo inulina de DP entre 3 y 5; y posteriormente los de DP entre 5 y 18. Sin embargo, en ese estudio *B. longum* no fue capaz de crecer utilizando la inulina de DP mayor a 20, probablemente debido a la acidificación del medio, según reportan. Nuestros resultados muestran que esta cepa efectivamente puede utilizar fructanas de mayor peso molecular y que, independientemente de la estructura compleja de la agavina, ésta se consume mediante el mismo mecanismo que la inulina: primeramente los productos de menor peso molecular, para después consumirse los productos de mayor tamaño. Debido a que los intermediarios se consumen a lo largo de la fermentación, no se puede concluir si la hidrólisis de los sustratos es endo o exo.

La velocidad específica de crecimiento de *B. longum* fue similar con ambos sustratos, 0.081h^{-1} para inulina y 0.072h^{-1} para agavina, por lo que tanto inulina como agavina estimulan en la misma medida el crecimiento de esta cepa de bifidobacteria. De igual forma, el pH al final de la fermentación fue similar para ambos sustratos, siendo de 4.51 para inulina y de 4.59 para agavina, respectivamente. Esto está directamente relacionado con la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales presentan diversos efectos benéficos para el hospedero. Estos resultados sugieren que inulina y agavina poseen un efecto prebiótico comparable en la cepa evaluada.

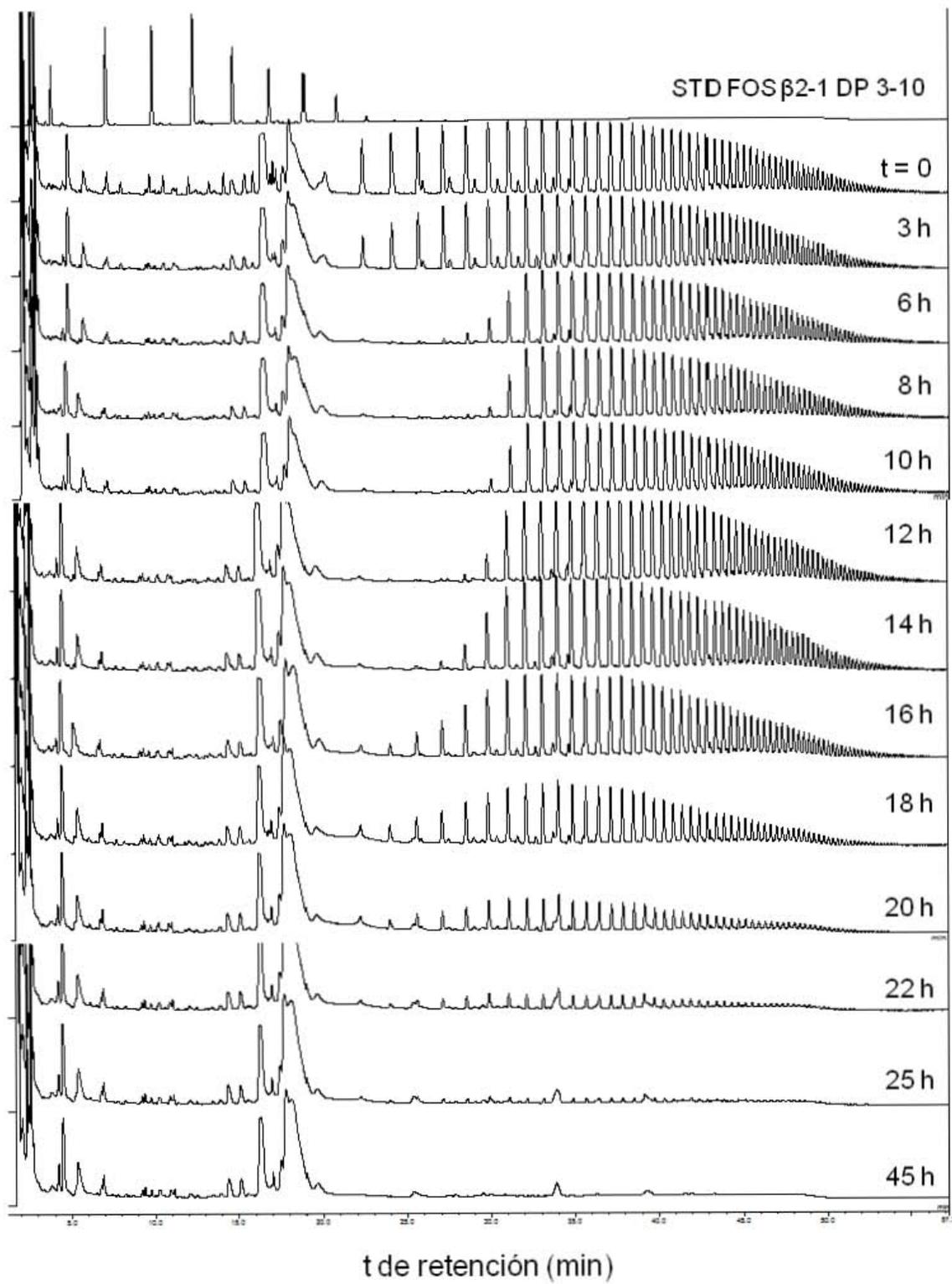


Figura 18. Perfil de productos durante la degradación de inulina por *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697.

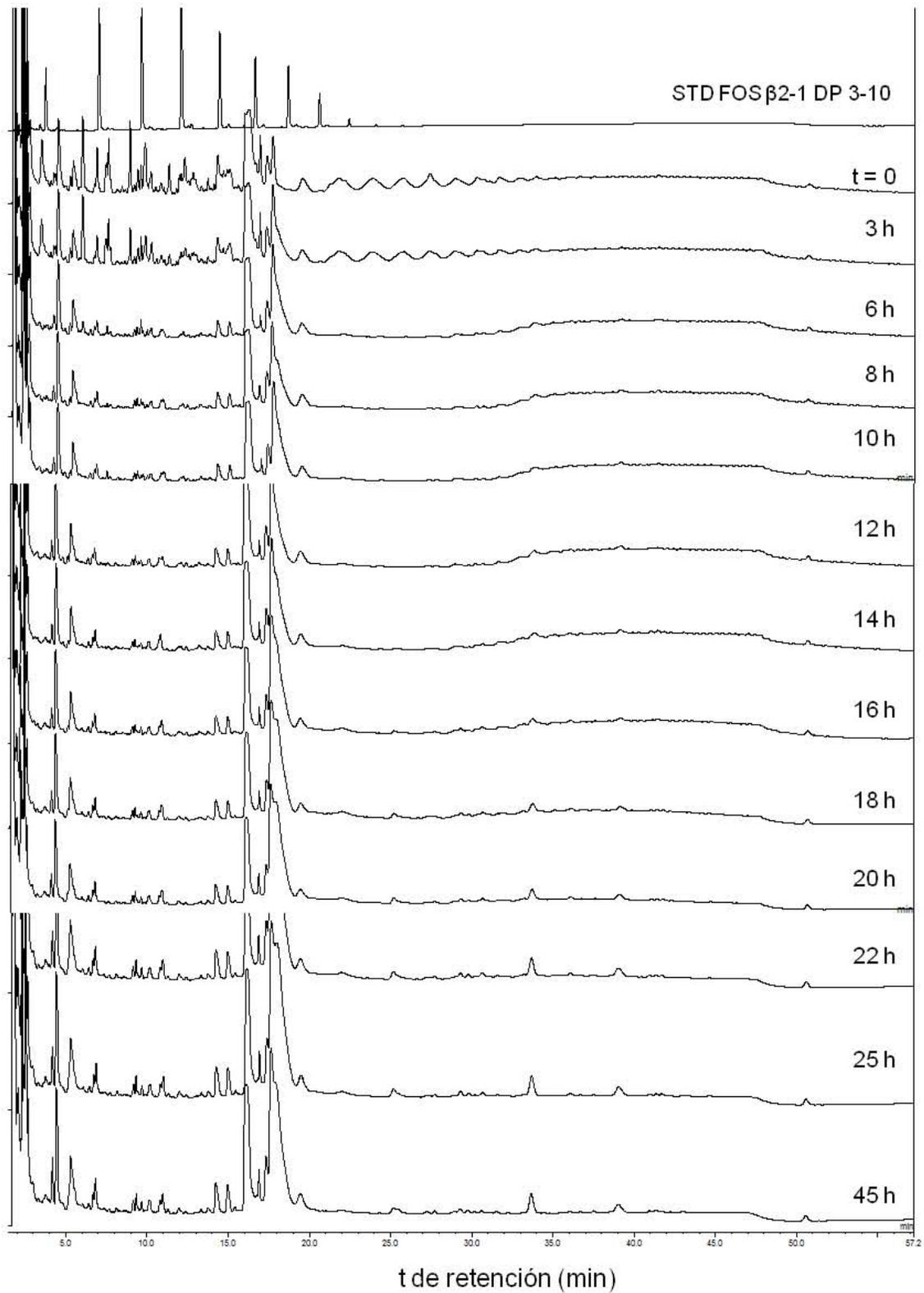


Figura 19. Perfil de productos durante la degradación de agavina por *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697.

9.2 Localización y cuantificación de la actividad fructanasa de las distintas fracciones celulares de *B. longum*

Como se describió en Materiales y Métodos, se obtuvieron dos sobrenadantes concentrados (Sob-I y Sob-A), dos fracciones enriquecidas en proteína intracelular (Intra-I e Intra-A), así como dos fracciones enriquecidas en pared celular (Par-I y Par-A) de los cultivos con Inulina (I) y Agavina (A). Adicionalmente se obtuvieron las fracciones de *B. longum* en medio con 5 g/L de glucosa como control (Sob-G, Intra-G y Par-G). La actividad fructanasa de cada una de estas fracciones al final de la fermentación se reporta en la tabla 5.

En el caso de las fracciones obtenidas de la fermentación de glucosa, no se detectó actividad en las fracciones enriquecidas en pared celular, ni en las fracciones enriquecidas en proteína intracelular. La actividad del sobrenadante fue alrededor de 100 veces menor que en los casos en los que se usó agavina e inulina como sustratos de la fermentación.

Perrin, Warchol y col. (2001) encontraron que la actividad β -fructofuranosidasa se induce al usar fructosa como sustrato de fermentación de esta cepa, lo que concuerda con nuestros resultados, ya que la actividad resultó muy baja o nula en las fracciones obtenidas de la fermentación con glucosa, pero se incrementó en aquellos casos donde se usaron sustratos que liberan fructosa al hidrolizarse. Nótese que el Sob-G contiene una actividad fructanasa mínima (actividad basal), la misma que podría estar presente al inicio de la fermentación de inulina y agavina. Esta actividad podría ser suficiente para iniciar la hidrólisis de las cadenas más pequeñas de inulina y agavina, tal como se observa en la figuras 18 y 19. Esta hidrólisis libera fructosa, que a su vez induce la síntesis de β -fructofuranosidasa.

En un estudio proteómico previo se propuso que la hidrólisis de inulina por esta cepa es intracelular (Kim, An y col. 2013), ya que el análisis sugiere que la localización de las inulinasas hipotéticas (Blon_2056 y Blon_0787) de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 es intracelular. En el presente estudio la mayor actividad fructanasa se encontró en las fracciones enriquecidas en pared celular, seguidas de los sobrenadantes concentrados (tabla 5), demostrando que debe haber enzimas que la célula está exportando y que existe una hidrólisis extracelular de fructanas por esta cepa. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Rossi, Corradini y col. (2005), quienes encontraron que de 55 cepas de bifidobacterias evaluadas, sólo aquellas que producen actividad β -fructofuranosidasa extracelular son capaces de crecer en inulina.

La baja actividad encontrada en las fracciones enriquecidas en proteína intracelular podría deberse a que la hidrólisis de las fructanas ocurre en el espacio extracelular principalmente. Los productos de esta hidrólisis, monosacáridos y/o FOS, probablemente la célula los internaliza y requieren ya de poca actividad para terminar su conversión a fructosa, la cual entra a la ruta bifidus shunt (Scardovi y Trovatelli 1965).

Tanto la inulina como la agavina inducen en la misma medida la actividad fructanasa, ya que para una misma fracción se obtuvo aproximadamente la misma actividad independientemente de si ésta se obtuvo de la fermentación de agavina o de inulina.

Tabla 5. Actividad fructanasa global de las distintas fracciones del cultivo de *B. longum* en inulina, agavina y glucosa*.

	Sobrenadante	Pared	Intracelular
Inulina	2.1 ± 0.6	5.9 ± 0.3	0.3 ± 0.1
Agavina	1.7 ± 0.5	6.1 ± 1.5	0.1 ± 0.0
Glucosa	0.02 ± 0.0	0	0

*Unidades recuperadas de 50 mL de fermentación

9.3 Especificidad hacia sustratos y perfil de productos obtenidos con la actividad enzimática presente en los sobrenadantes (Sob-I y Sob-A)

Se decidió llevar a cabo un análisis más detallado de cada fracción celular: la fracción extracelular, la fracción enriquecida en pared celular y la fracción enriquecida en proteína intracelular, a fin de tratar de identificar las actividades enzimáticas específicas que están actuando en cada fracción y el perfil de productos completo obtenido durante la hidrólisis de inulina y de agavina por cada fracción.

En la figura 20 se muestra el perfil de productos obtenido durante la degradación de inulina (Raftilina HP®) por Sob-I y Sob-A. Los productos corresponden a FOS provenientes de la hidrólisis exo de las fructanas de mayor peso molecular, tal como ocurre durante la hidrólisis de Raftilina HP por *B.longum_11*. Esto nos indica que la degradación de inulina por las enzimas presentes en el sobrenadante ocurre principalmente por un mecanismo exo-hidrolítico, que produce fructosa como principal producto.

Se obtuvo el mismo perfil de productos durante la hidrólisis de inulina por Sob-A y por Sob-A, lo que nos permite concluir que el mismo mecanismo de degradación predomina con las enzimas de ambos sobrenadantes (exo-hidrólisis), aun si uno fue inducido con inulina y otro con agavina. Ambos sobrenadantes podrían contener las mismas actividades enzimáticas, independientemente del tipo de fructana que se emplea como inductor en el medio de cultivo.

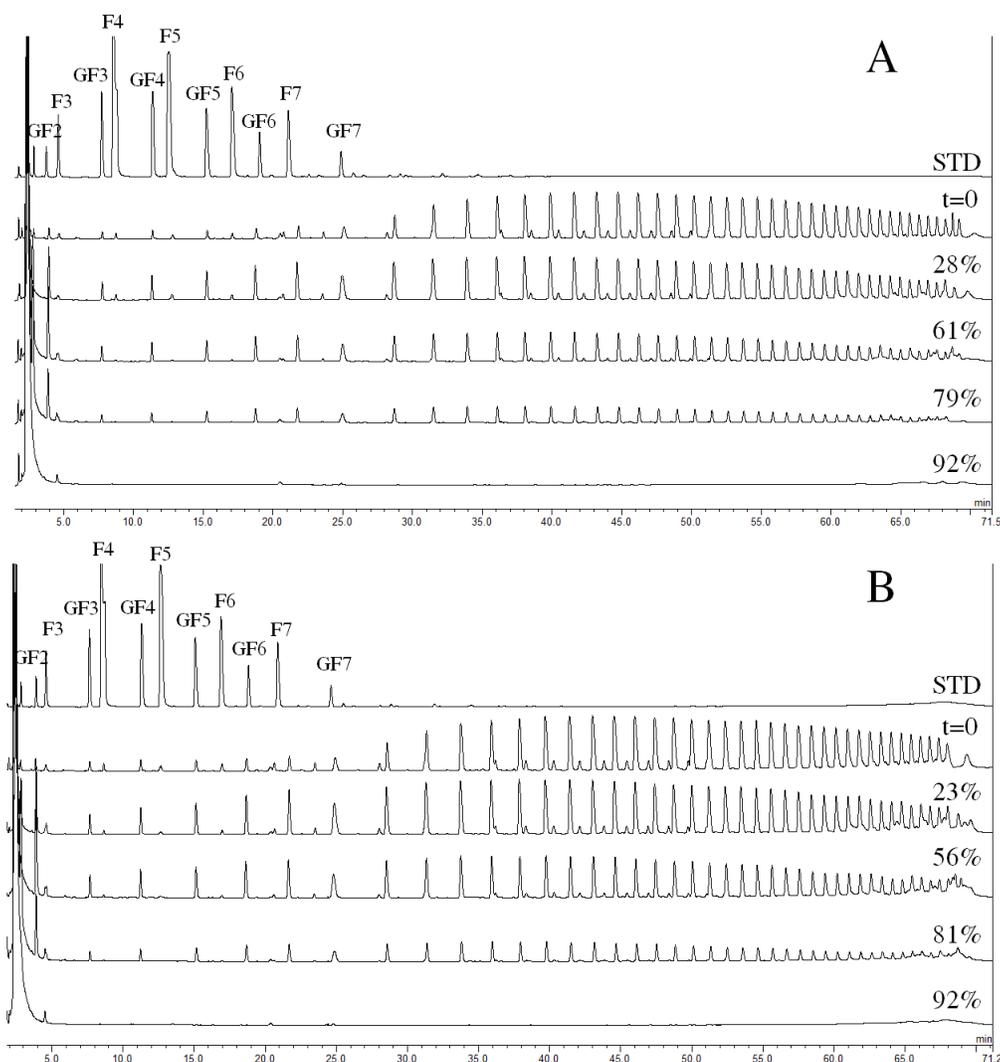


Figura 20. Perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por Sob-I (A) y Sob-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se muestra el porcentaje de conversión y un estándar (STD) de fructooligosacáridos de la serie GF_n y F_n.

En la figura 21 se muestra el perfil de productos obtenidos durante la hidrólisis de agavina por Sob-I y Sob-A. Se puede observar la acumulación de fructosa a lo largo de la reacción y cuatro intermediarios identificados como 1-kestosa, neokestosa, fructofuranosil nistosa y un producto de la serie de las oligofructosas DP 4. Estos productos provienen de la hidrólisis exo de agavina y corresponden tanto a productos la serie GF, como a productos de la serie de las neofructanas, debido a que la agavina posee tanto graminanas como neofructanas.

La acumulación de fructosa a lo largo de la reacción indica un claro mecanismo exo-hidrolítico, al igual que el mecanismo de acción de la enzima B.longum_11. Sin embargo, los intermediarios que se acumulan en ambas reacciones no son los mismos. Esto se debe probablemente a que B. longum_11 no está presente en el sobrenadante, o a que existen otras enzimas, además de B.longum_11, que dan lugar a productos diferentes.

Se obtuvo el mismo perfil de productos durante la hidrólisis de agavina por ambos sobrenadantes, lo que nos indica de nuevo que probablemente son las mismas enzimas las que se inducen con ambas fructanas.

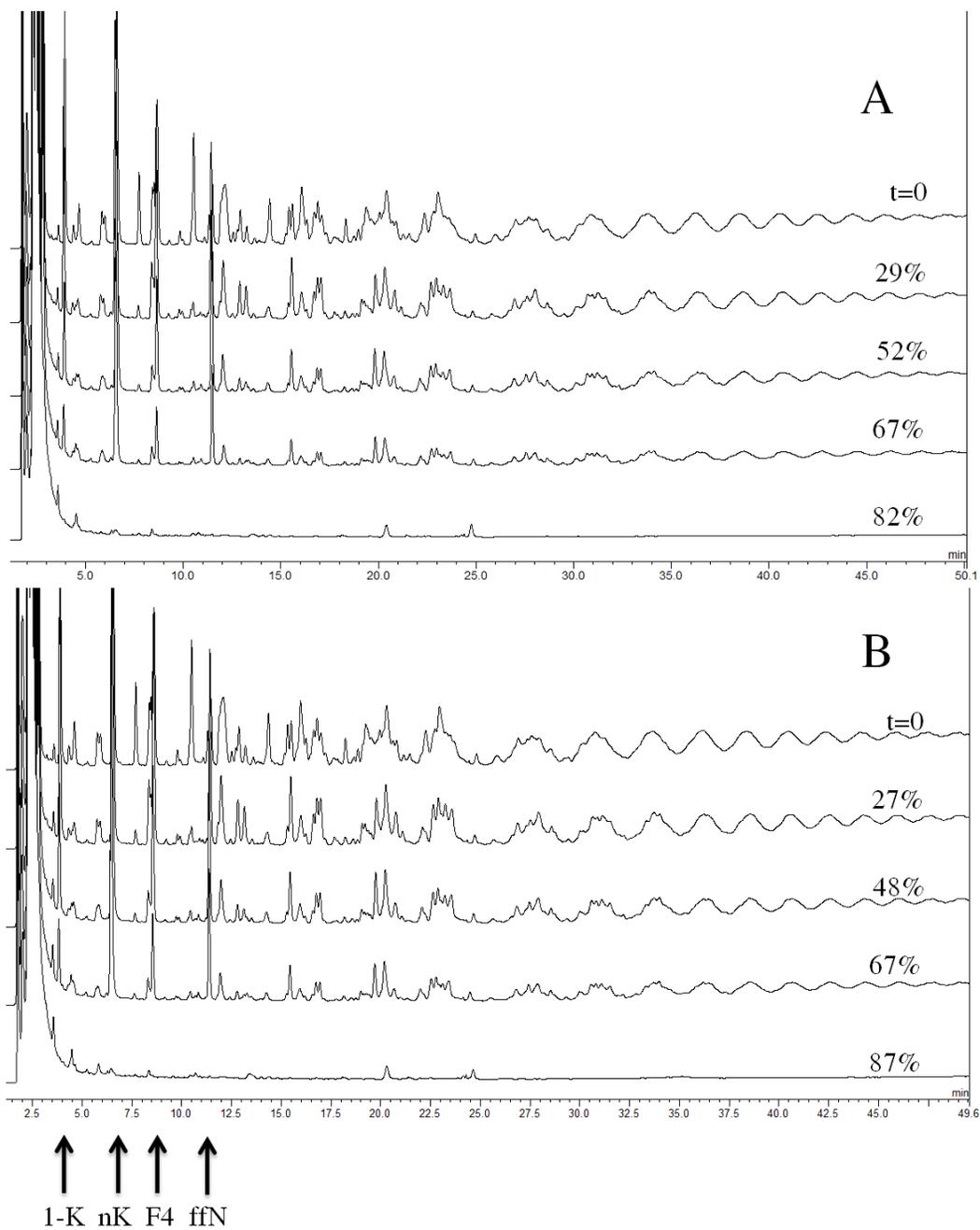


Figura 21. Evolución del perfil de productos durante la hidrólisis de agavina al 1 % por Sob-I (A) y Sob-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se indica el porcentaje de conversión y las flechas indican los principales intermediarios: 1-kestosa (1-K), neokestosa (nK), oligofructósido DP 4 (F4) y fructofuranosil nistosa (ffN).

9.4 Especificidad hacia sustrato y perfil de productos obtenidos con la actividad enzimática presente en la fracción enriquecida en pared celular (Par-I y Par-A)

En la figura 22 se muestra el perfil de productos obtenido durante la hidrólisis de inulina (Raftilina HP®) por la fracción enriquecida en pared celular obtenida de la fermentación de inulina (Par-I) y de la fermentación de agavina (Par-A). Se puede observar la disminución de las señales de mayor peso molecular, asociada a la aparición de productos de menor tamaño conforme aumenta el tiempo de reacción. A diferencia del perfil de productos obtenido con los sobrenadantes y con *B.longum_11*, en este caso se observa la aparición de productos tanto de la serie GFn (contienen glucosa en un extremo), como de la serie Fn (contienen fructosa en ambos extremos). Cabe mencionar que los FOS de la serie Fn sólo pueden provenir de una hidrólisis tipo endo de la inulina. La aparición y la acumulación de estos intermediarios nos hace concluir que existe una endo-enzima asociada a la pared celular. Al final de la reacción estos FOS se han hidrolizado casi completamente, por lo que debe existir otra u otras exo-enzimas que los degradan al mismo tiempo que se producen. Estos intermediarios no se encuentran presentes durante la degradación de inulina por los sobrenadantes (Figura 20), por lo que la enzima responsable de su producción probablemente se expresa exclusivamente asociada a la pared celular. El mismo perfil de productos se obtuvo durante la hidrólisis de inulina por Par-I y por Par-A, por lo que las endo y exo enzimas se expresan durante el crecimiento de la bacteria tanto en inulina, como en agavina.

Todas las enzimas caracterizadas de bifidobacterias capaces de hidrolizar fructanas degradan inulina mediante un mecanismo exo, es decir, liberan fructosa como principal producto. La fructosa es un monosacárido fácilmente metabolizable por la mayoría de las bacterias heterótrofas, por lo que esta hidrólisis no representa ninguna ventaja competitiva sobre el resto de las bacterias presentes en la microbiota intestinal. En cambio, una endo-hidrólisis libera FOS, los cuales pueden internalizarse por las bifidobacterias por medio de los transportadores específicos que éstas poseen. El hecho de que se haya identificado una endo-enzima asociada a la pared celular de *B. longum* concuerda con la definición de prebiótico que se ha dado a las fructanas, ya que estimulan selectivamente el crecimiento de bifidobacterias.

Finalmente, se identificó una enzima con mecanismo endo en *B. longum*, por lo que si este mecanismo ocurre en esta cepa es probable que también ocurra en otras, a pesar de que las enzimas responsables de este tipo de hidrólisis no se han identificado aún en otras bifidobacterias.

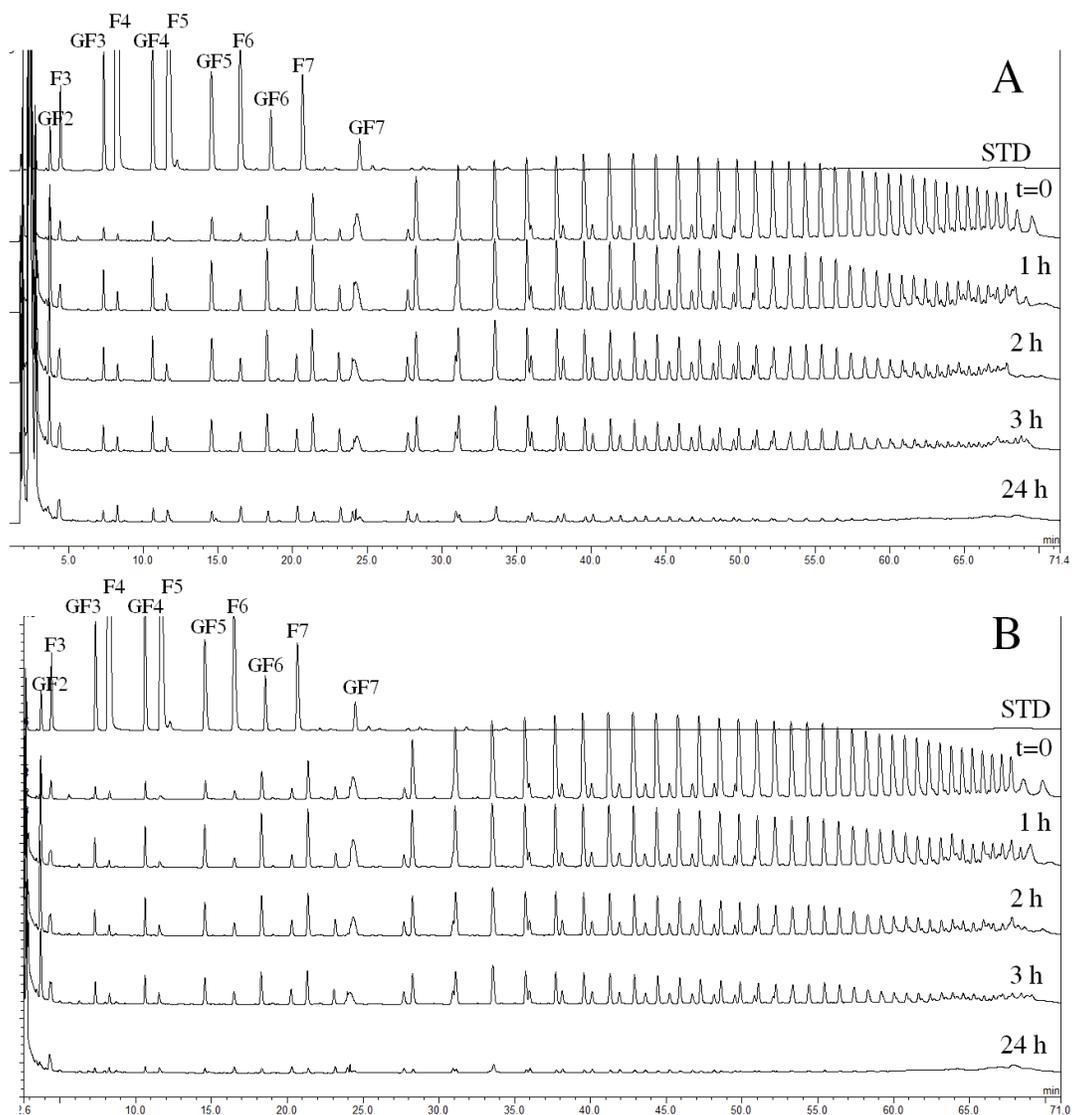


Figura 22. Perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por Par-I (A) y Par-A (B) analizado por HPAEC-PAD.

En la figura 23 se muestra la hidrólisis de agavina por la fracción enriquecida en pared celular obtenida de la fermentación de inulina (Par-I) y de la fermentación de agavina (Par-A). Se observó que durante los primeros 20 minutos de la reacción los intermediarios obtenidos son los mismos que los obtenidos durante la hidrólisis de agavina por los

sobrenadantes (1-kestosa, neokestosa, oligofructósido DP4 y fructofuranosil nistosa). Adicionalmente, se obtiene 6-kestosa como intermediario. Los intermediarios se consumen casi por completo al final de la reacción, excepto la 6-kestosa y la neokestosa (ambos DP3), que son los productos principales después de la fructosa. Estos fructooligosacáridos son estructuralmente diferentes al resto de intermediarios. Ambos contienen fructosas enlazadas por medio de enlaces β 2-1 así como β 2-6; y la neokestosa en particular posee fructosas unidas tanto al carbono 1 como al carbono 6 de la glucosa. El resto de intermediarios poseen sólo enlaces de tipo β 2-1. Esta diferencia estructural podría estar dificultando su hidrólisis por las enzimas presentes en la pared celular, razón por la que se acumulan al final de la reacción.

Debido a que la 6-kestosa es el único intermediario diferente durante la hidrólisis de agavina por las fracciones enriquecidas en pared celular, comparada con la hidrólisis de agavina por los sobrenadantes, la 6-kestosa podría tratarse de un producto de la endoenzima identificada. A diferencia de la hidrólisis endo de la inulina, donde se obtuvo toda una serie diferente de FOS, durante la degradación de agavina sólo se identificó un producto. El hecho de que sólo se obtenga un intermediario correspondiente a la hidrólisis endo de la agavina podría significar que esta enzima no tiene mucha actividad sobre fructanas mezcladas, debido a su estructura compleja, que dificulta el acceso de las enzimas endo. Este resultado concuerda con lo que se ha visto en estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, donde se ha observado que las endo-fructanasas comerciales (provenientes de hongos) tienen poca o nula actividad sobre agavina (Porrás-Domínguez 2012).

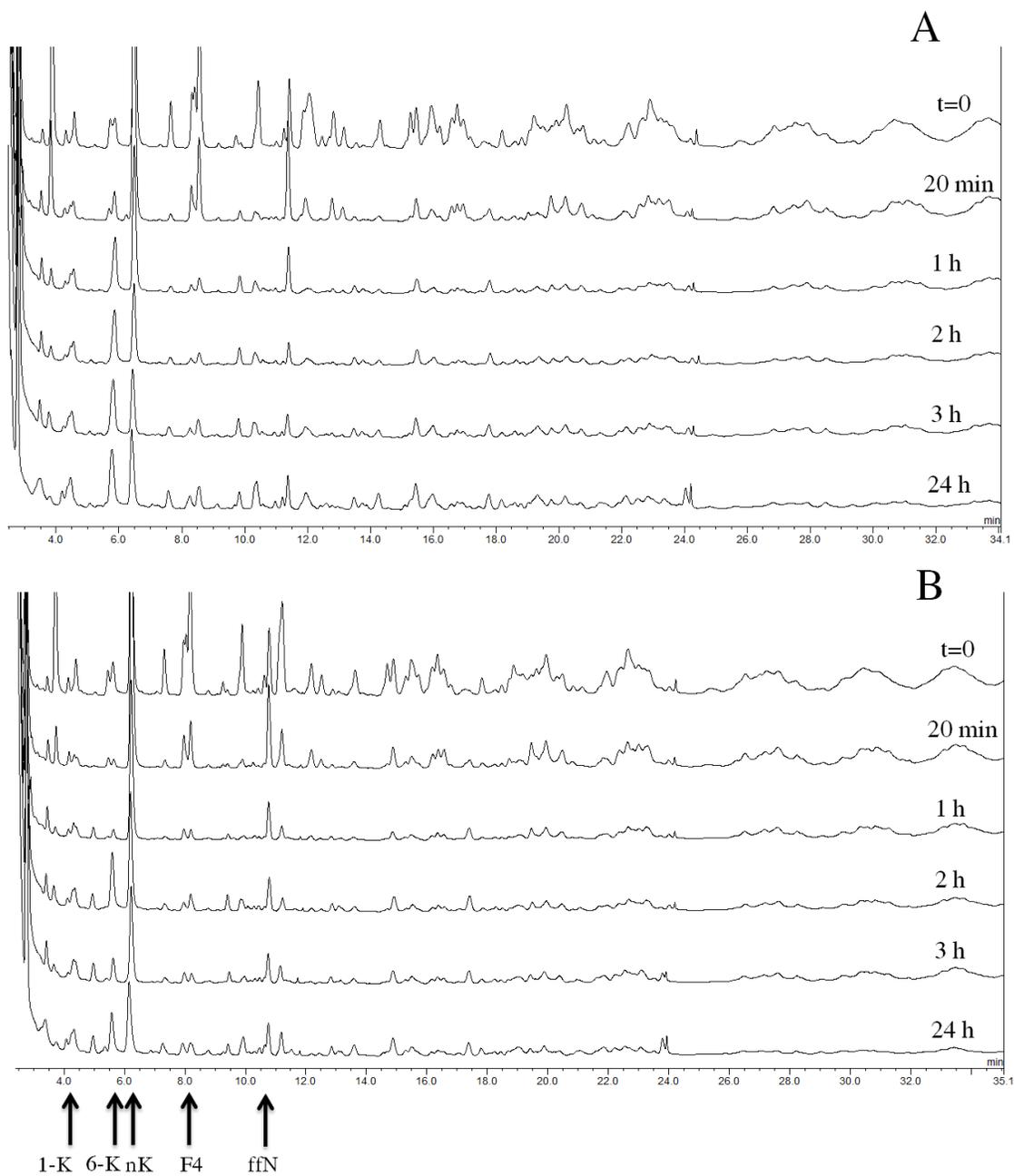


Figura 23. Perfil de productos durante la hidrólisis de agavina al 1 % por Par-I (A) y Par-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Las flechas indican los principales intermediarios: 1-kestosa (1-K), 6-kestosa (6-K), neokestosa (nK), oligofruktosa DP 4 (F4) y fructofuranosil nistosa (ffN).

9.5 Especificidad hacia sustrato y perfil de productos obtenidos con la actividad enzimática presente en la fracción enriquecida en proteína intracelular (Intra-I e Intra-A)

En la figura 24 se muestra el perfil de productos durante la hidrólisis de inulina por la fracción enriquecida en proteína intracelular obtenida de la fermentación de inulina (Intra-I) y de la fermentación de agavina (Intra-A). Conforme avanza la reacción, se observa la acumulación de señales de menor peso molecular, provenientes de la hidrólisis de las cadenas de mayor peso molecular de inulina. Las señales de menor peso molecular que se van acumulando corresponden a FOS de la serie GFn. Este perfil de productos es característico de una hidrólisis exo de la inulina, al igual que con los sobrenadantes y B.longum_11. Esto indica que la actividad predominante intracelular es actividad exo. Este resultado tiene lógica si pensamos que una vez dentro de la célula, la fructana necesita hidrolizarse hasta moléculas de fructosa que puedan metabolizarse por la vía de la bifidus shunt.

De nuevo, se obtuvo el mismo perfil de productos durante la hidrólisis de inulina, independientemente de la fracción enriquecida en proteína intracelular utilizada (Intra-I o Intra-A), lo que nos dice que muy probablemente son las mismas enzimas actuando en ambos casos.

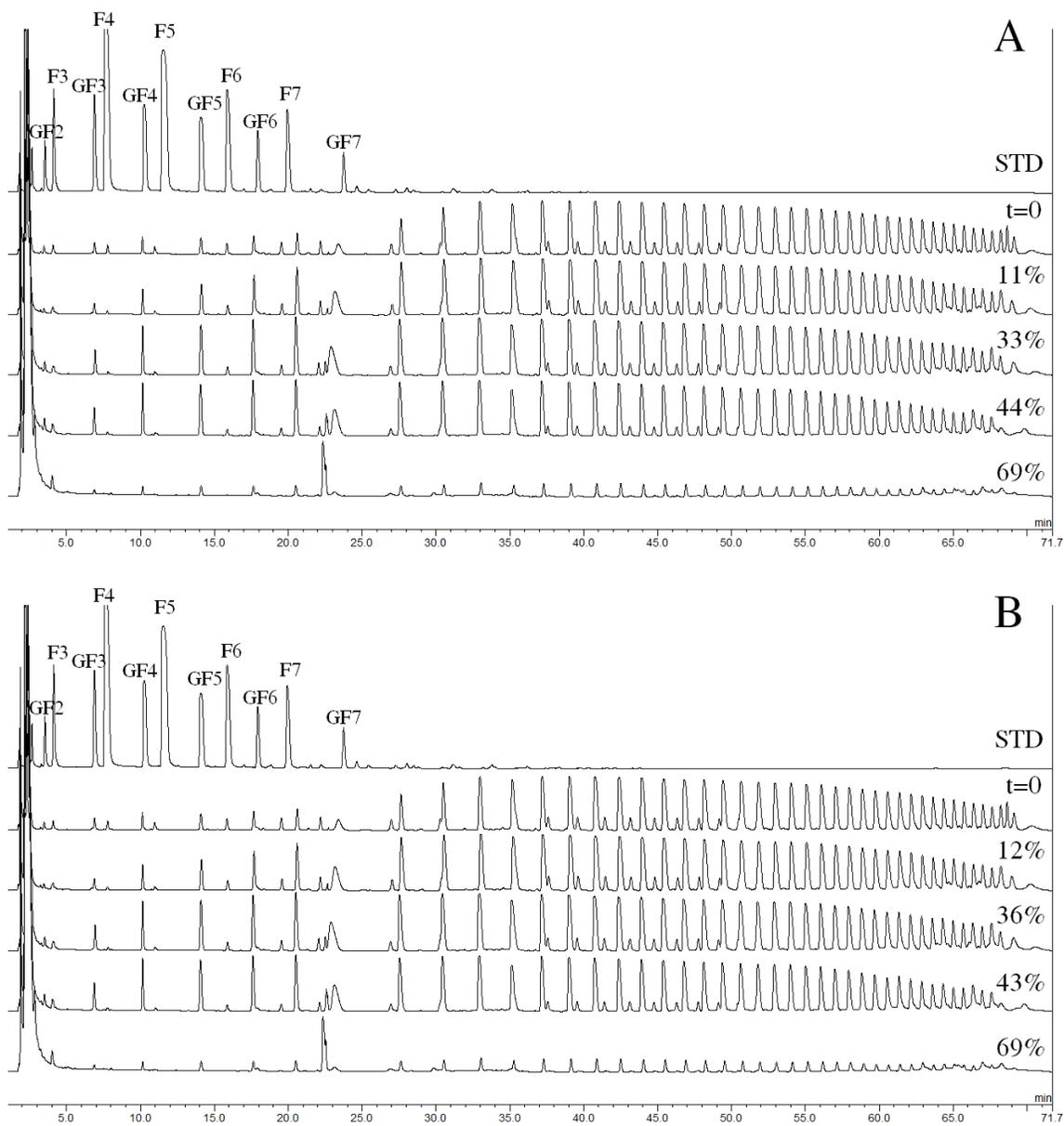


Figura 24. Perfil de productos durante la hidrólisis de Raftilina HP al 1 % por Intra-I (A) e Intra-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se muestra el porcentaje de conversión y un estándar (STD) de fructooligosacáridos de la serie GF_n y F_n.

En la figura 25 se muestran los productos durante la hidrólisis de agavina por Intra-I e Intra-A. Se puede observar la aparición de tres intermediarios principales. Estos intermediarios coinciden con los formados durante la hidrólisis de agavina por *B.longum_11* (Figura 26). Se trata de 6-kestosa, bifurcosa y fructofuranosil bifurcosa.

El hecho de que coincidan los intermediarios podría significar que B.longum_11 es la actividad predominante intracelularmente. Esto concuerda con el hecho de que B.longum_11 es una β -fructofuranosidasa no específica con alta afinidad por oligosacáridos. Las moléculas transportadas al interior de la bacteria deben ser FOS de bajo DP. Una vez dentro, B.longum_11 podría hidrolizar fácilmente estos FOS hasta fructosa para su posterior metabolismo, debido a su alta afinidad por oligosacáridos tanto de tipo β 2-1 como β 2-6. Esta enzima está presente tanto durante la fermentación de inulina como de agavina, ya que se obtuvo el mismo perfil de productos utilizando Intra-I o Intra-A.

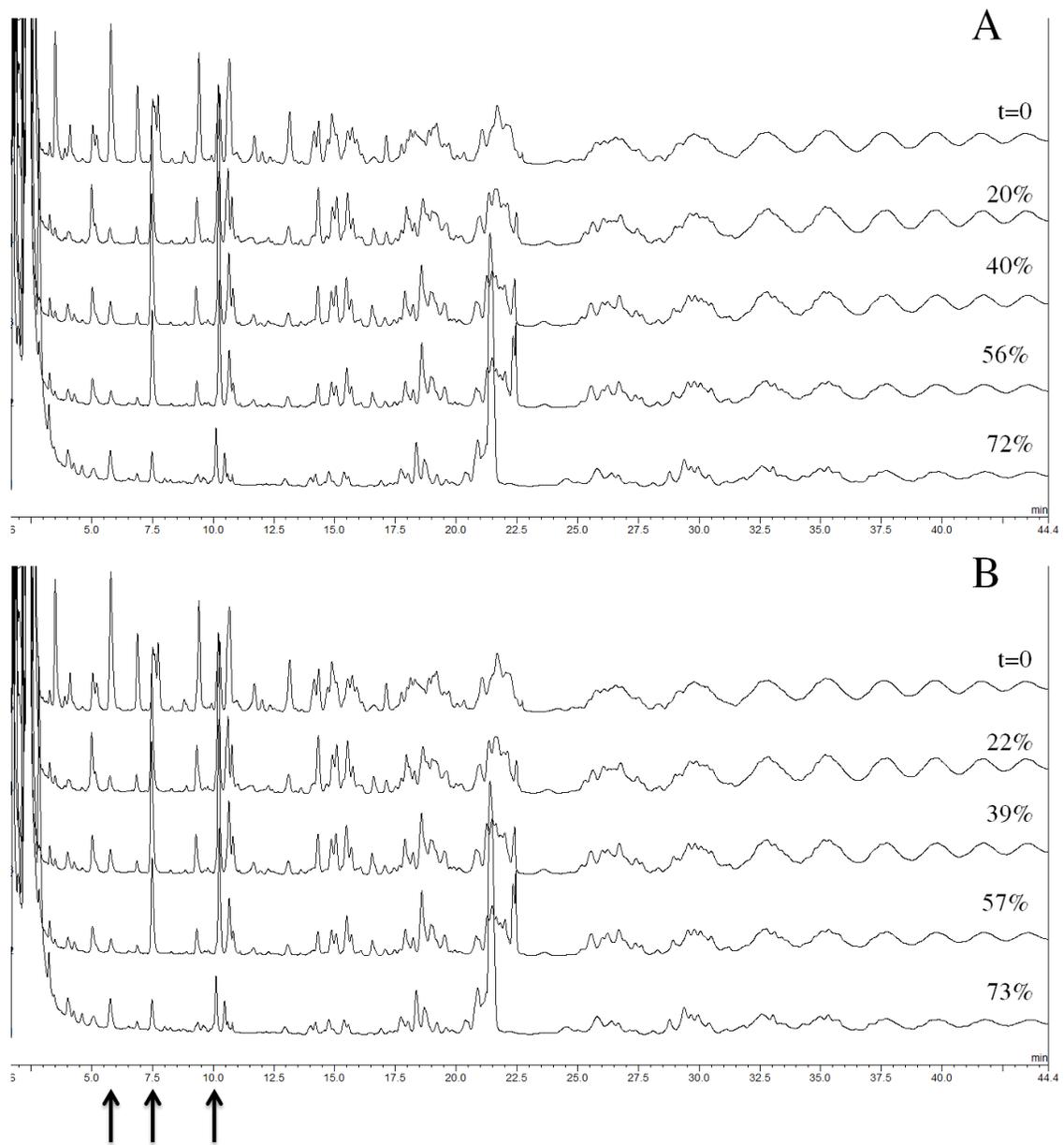


Figura 25. Perfil de productos durante la hidrólisis de agavina al 1 % por Intra-I (A) e Intra-A (B) analizado por HPAEC-PAD. Se indica el porcentaje de conversión y las flechas señalan los principales intermediarios.

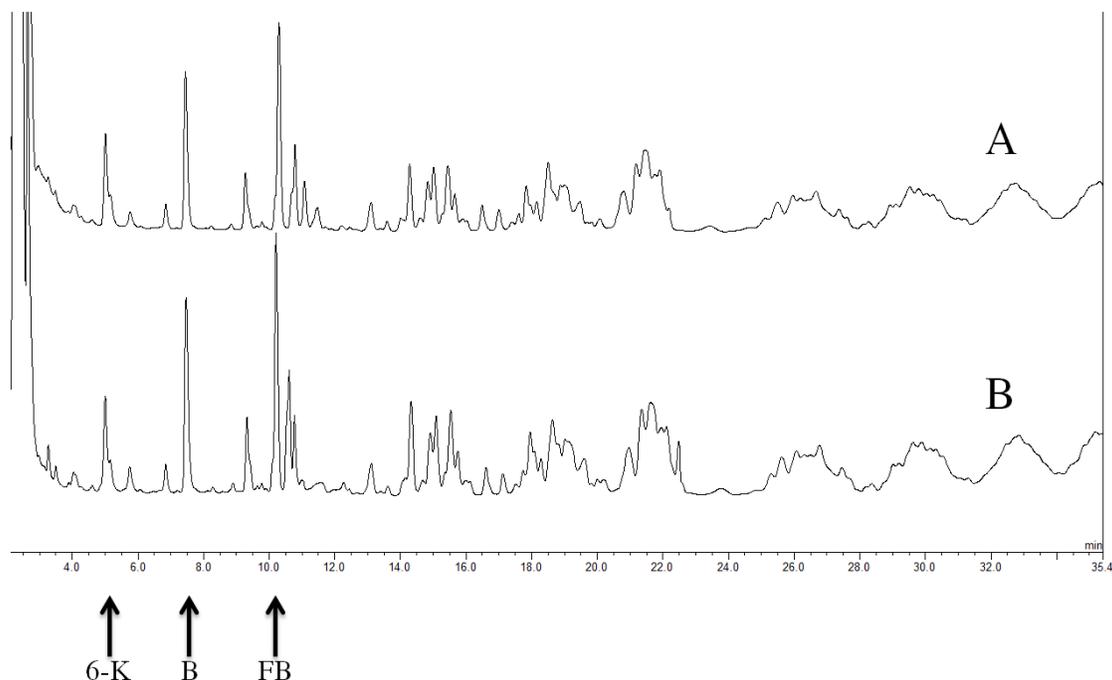


Figura 26. Comparación de los intermediarios de hidrólisis de agavina por *B.longum*_11 (A) y las fracciones enriquecidas en proteína intracelular (B). Se señalan los principales intermediarios: 6-kestosa (6-K), bifurcosa, (B) y fructofuranosil bifurcosa (FB).

9.6 Análisis comparativo de las características y las actividades enzimáticas presentes en los cultivos de *B. longum* utilizando inulina o agavina como fuente de carbono

En la tabla 6 se presenta un resumen del crecimiento y de los mecanismos de degradación de *B. longum* en fructanas de diferente estructura. Como se observa, la principal diferencia en el mecanismo de degradación de estos sustratos es que durante la degradación de inulina se produce toda una serie de FOS diferentes (Fn) debido a la acción de una endo-enzima de la pared celular. Esta enzima no tiene mucha actividad sobre agavina, por lo que los intermediarios producidos durante su degradación son prácticamente los de una exo hidrólisis. De esta forma, el mecanismo de degradación de inulina por *B. longum* es un mecanismo combinado de endo y exo-hidrólisis; mientras que el mecanismo de degradación de agavina es un mecanismo exo-hidrolítico, esto a nivel de las actividades enzimáticas que actúan en cada caso (Figura 27).

A nivel global, esta diferencia no se refleja en el potencial prebiótico de la fructana, ya que con ambos sustratos se obtiene una velocidad de crecimiento y acidificación del medio similares. Los resultados del cuadro comparativo sugieren que no son los tipos de enlace o las ramificaciones presentes en el sustrato, sino el peso molecular lo que podría afectar el potencial prebiótico de una fructana. Como se puede observar, los sustratos de menor peso molecular se consumen e internalizan de forma preferencial, por lo que éstos podrían estimular más eficientemente el crecimiento selectivo de bifidobacterias.

Se ha propuesto antes por otros autores que es el peso molecular y no el tipo de enlace lo que afecta el potencial prebiótico de una fructana y que las fructanas de menor DP ejercen mayor efecto prebiótico (Marx, Winkler y col. 2000; Biedrzycka y Bielecka 2004), pero esto no ha sido probado de forma contundente, probablemente debido a la falta de sustratos estructuralmente puros.

Tabla 6. Resumen comparativo del crecimiento y los patrones de degradación de *B. longum* en fructanas de diferente estructura.

	Inulina	Agavina
Velocidad de crecimiento de <i>B. longum</i>	0.081 h ⁻¹ ± 0.001	0.072 h ⁻¹ ± 0.002
Acidificación del medio	pH final = 4.51	pH final = 4.59
Consumo durante la fermentación	Primero DP<16, posteriormente DP>16	Primero DP<16, posteriormente DP>16
Acumulación de intermediarios durante la fermentación	DP>11 (DP<11 se internalizan)	DP>11 (DP<11 se internalizan)
Consumo del sustrato al final de la fermentación	100%	100%
Hidrólisis por las enzimas del sobrenadante	Exo	Exo
Hidrólisis por las enzimas de la pared celular	Endo y exo	Principalmente exo
Hidrólisis por las enzimas intracelulares	Exo	Exo

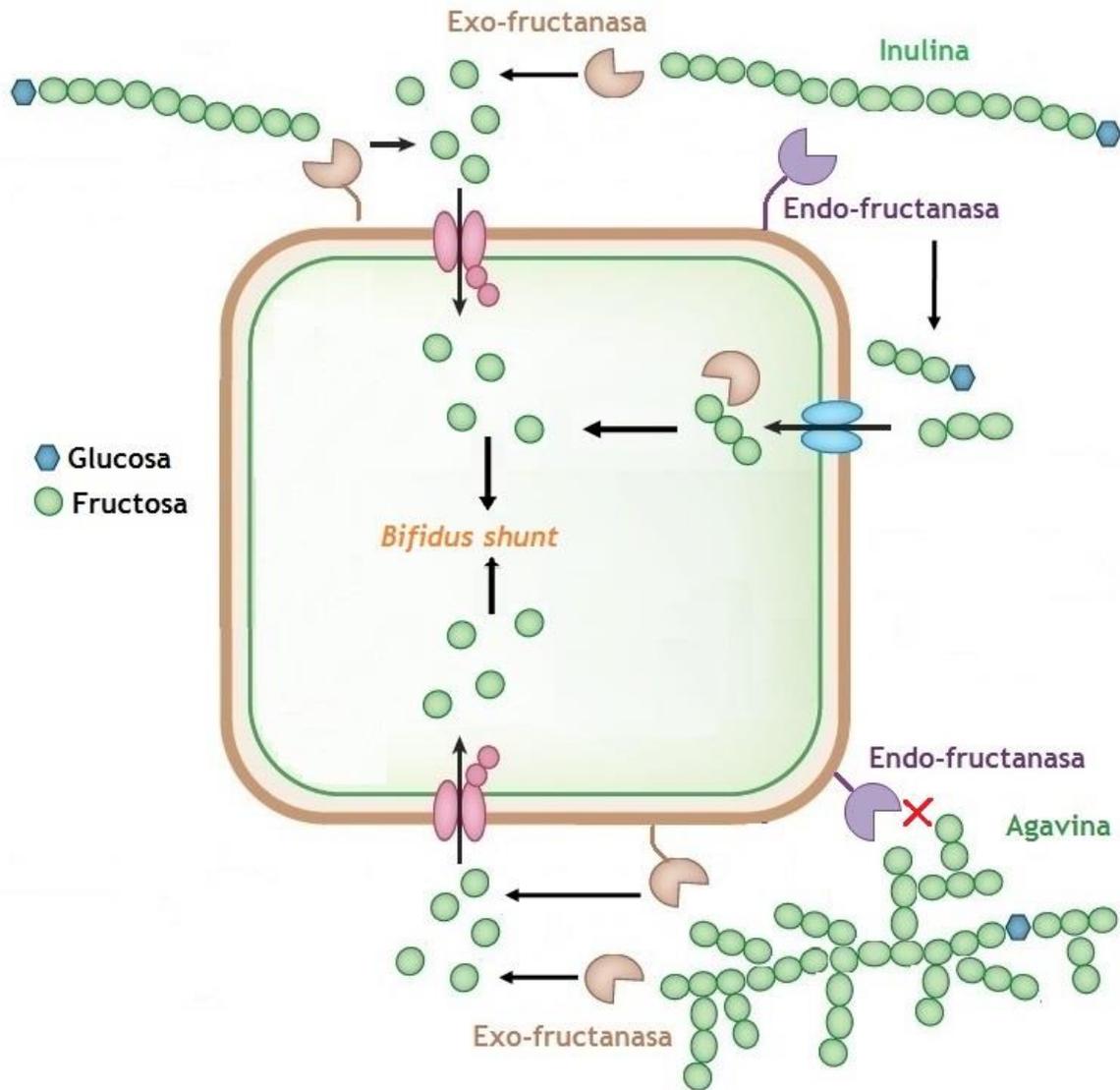


Figura 27. Modelo propuesto del mecanismo de degradación de inulina y agavina por *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697.

9.7 Análisis de proteínas y especificidad de hidrólisis en las distintas fracciones celulares

Con el fin de identificar y comparar las actividades enzimáticas presentes durante la degradación de agavina e inulina, las fracciones obtenidas de las fermentaciones se analizaron por medio de zimogramas. Se utilizó inulina y levana como sustratos para

determinar si las actividades que actúan sobre enlaces β 2-1 podrían ser las mismas que actúan sobre enlaces β 2-6. Los resultados se muestran en las figuras 27 y 28. Por el perfil de bandas de actividad que se obtuvo en los zimogramas, se puede concluir que se inducen las mismas enzimas durante la fermentación de agavina y durante la fermentación de inulina en las tres fracciones.

Se observaron múltiples bandas de actividad en cada fracción. Esto podría indicar que hay varias enzimas actuando en cada fracción. Sin embargo, podría tratarse también de una sola enzima con diferente grado de proteólisis. En algunos casos las enzimas se someten a una proteólisis controlada, ya sea para adquirir su forma activa o para ser exportadas al exterior celular; en otros casos la proteólisis de una enzima es un proceso no controlado que se da debido a que la proteína entra en contacto con proteasas que reconocen los sitios de corte en la enzima, degradándola. En ambos casos, si los intermediarios de la proteólisis conservan actividad, es posible observar múltiples bandas en el zimograma que en realidad corresponden a la misma enzima.

Interesantemente, las actividades observadas corresponden a proteínas de muy alto peso molecular (>95 kDa en casi todos los casos), especialmente las actividades identificadas en el zimograma de levana (figura 28). La β -fructofuranosidasa de bifidobacteria de mayor peso molecular reportada hasta el momento es B.longum_11 (71 kDa), caracterizada en este estudio. Esto sugiere que el polímero incluido en el gel como sustrato podría estar retrasando la movilidad de las proteínas en el zimograma; sin embargo, la endolevanasa incluida como control migró de acuerdo a su peso molecular (figura 28). Esto pareciera indicar que las actividades identificadas en el zimograma de levana no corresponden a las mismas identificadas en el zimograma de inulina, si no que se trata de enzimas diferentes y mucho más grandes en el caso de las que actúan sobre levana.

En ningún caso fue posible identificar a la enzima B.longum_11 por su peso molecular (71 kDa). Aunque como se mencionaba anteriormente, el perfil de productos de la hidrólisis de agavina por la fracción enriquecida en proteína intracelular parece indicar que esta enzima es intracelular, además no se identificó un péptido señal en su secuencia. El hecho de que no observemos a B.longum_11 en el zimograma en el peso molecular esperado podría deberse a que la enzima nativa sufre algún grado de proteólisis. Algo que apoya esta teoría es que según el tiempo de almacenamiento que tenga el extracto intracelular, van

apareciendo más bandas con actividad en el zimograma, con peso molecular menor al que se aprecia originalmente (resultado no mostrado). Esto se observa sólo en la fracción enriquecida en proteína intracelular. En esta fracción se encuentran todas las proteínas intracelulares de *B. longum*, incluidas las necesarias para la proteólisis de proteínas.

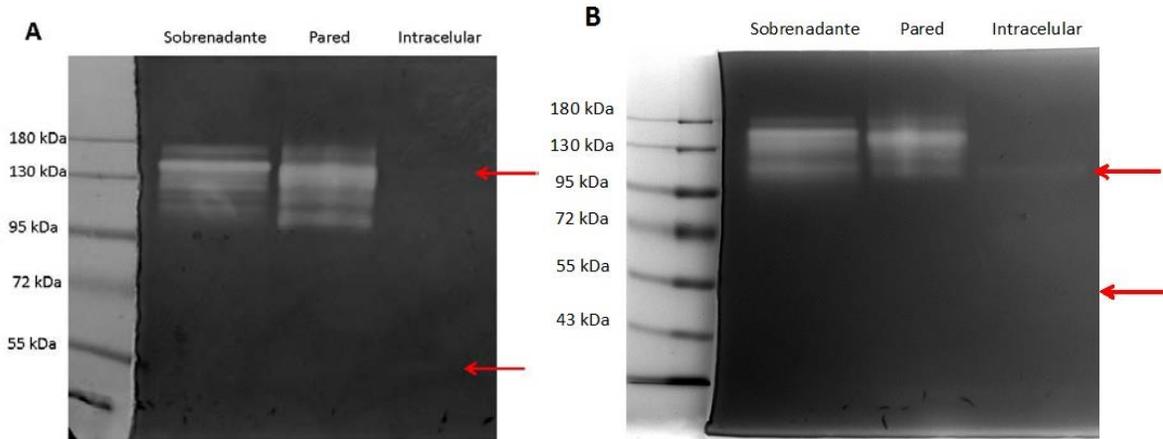


Figura 28. Zimogramas de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Se usó inulina de *L. citreum* como sustrato. Las flechas señalan la actividad intracelular observada poco perceptible al capturar la imagen.

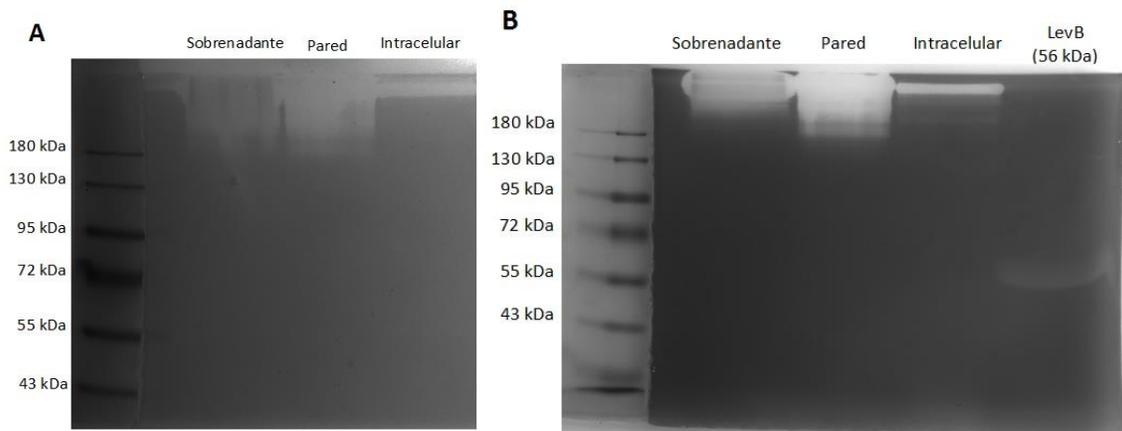


Figura 29. Zimograma de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Se usó levana de alto peso molecular de SacB como sustrato. Se incluye una endolevanasa (LevB) como control.

En un futuro se secuenciarán las enzimas contenidas en cada fracción a fin de determinar cuántas y cuáles son las que están participando en la hidrólisis de cada fructana. Como se aprecia en los análisis de SDS-PAGE (figuras 29 y 30), pareciera que estas enzimas se encuentran en muy baja concentración en las fracciones, respecto al resto de proteínas de la muestra, lo cual representa un inconveniente para su secuenciación. De igual forma, no se puede dejar de lado la posibilidad de que el sustrato presente en el zimograma pudiera estar retrasando la movilidad de las enzimas, por lo que es deseable mandar secuenciar directamente las bandas del zimograma en vez del gel SDS-PAGE. Una vez resueltos estos inconvenientes se podrá proceder a identificar las enzimas por su secuencia.

En este momento, por el perfil de bandas de actividad obtenido en los zimogramas, se puede concluir que se inducen las mismas actividades enzimáticas durante la fermentación de agavina y durante la fermentación de inulina. No obstante, sólo la secuenciación de las proteínas nos permitirá corroborar esto.

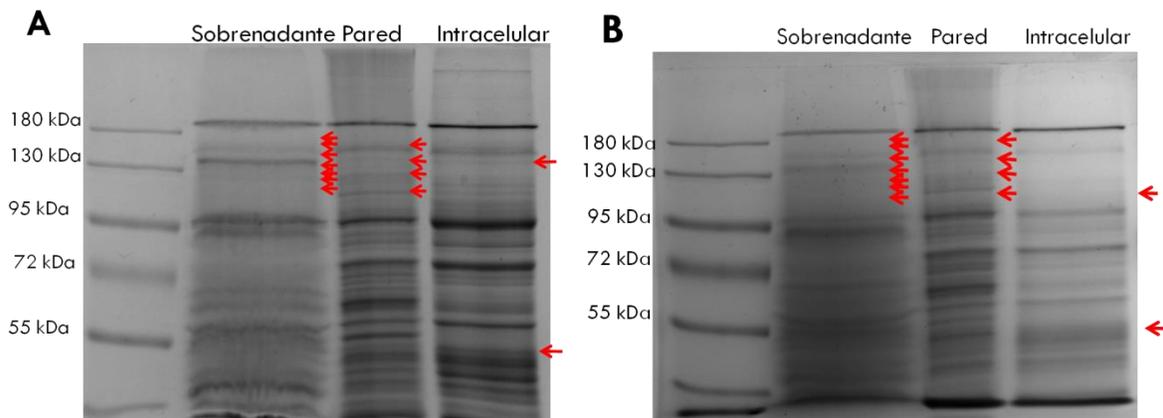


Figura 30. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Las flechas señalan la región donde se observó actividad en el zimograma de inulina.

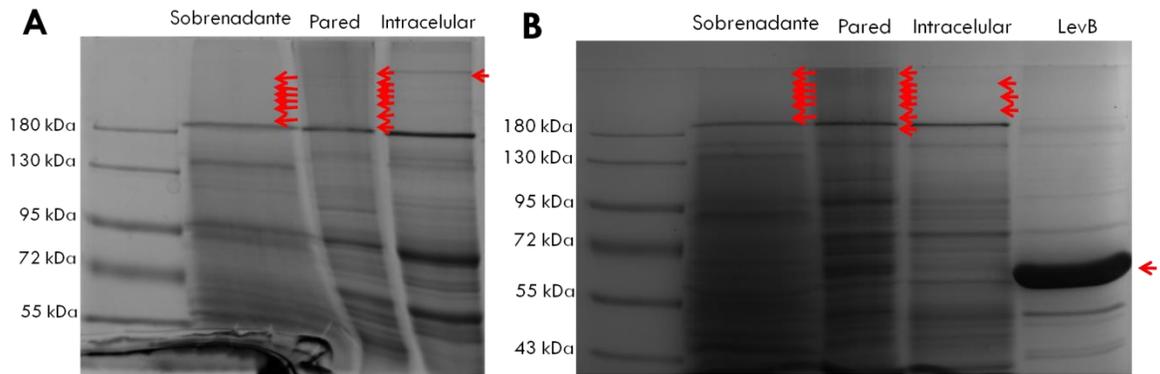


Figura 31. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la fermentación de A) inulina y B) agavina por *B. longum*. Las flechas señalan la región donde se observó actividad en el zimograma de levana. LevB corresponde a una endolevanasa usada como control.

X CONCLUSIONES A LA SEGUNDA PARTE

Durante la fermentación de fructanas, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697 consume primero aquellas cadenas de menor peso molecular para después hidrolizar los sustratos de mayor grado de polimerización, tanto en presencia de inulina (fructana simple) como de agavina (fructana mezclada).

B. longum produce actividad β -fructofuranosidasa intracelular, extracelular y asociada a la pared celular y esta actividad se induce con fructosa. El hecho de que *B. longum* produzca actividad β -fructofuranosidasa extracelular y asociada a la pared, nos indica que esta bifidobacteria hidroliza las fructanas extracelularmente, para después internalizar los productos de hidrólisis.

El mecanismo de hidrólisis de inulina es un mecanismo combinado de endo y exo-hidrólisis, debido a que se identificó una endo-fructanasa asociada a la pared celular, así como enzimas exo en el sobrenadante y en la pared. La hidrólisis endo produce FOS y la hidrólisis exo produce fructosa. Ambos productos pueden internalizarse y posteriormente metabolizarse.

Los productos obtenidos durante la degradación de inulina y agavina por las distintas fracciones celulares de *B. longum*; así como el análisis de los zimogramas, muestran que son las mismas enzimas con actividad fructanasa que están presentes durante la degradación de inulina y agavina por esta bacteria.

El mecanismo de hidrólisis de agavina por *B. longum* parece ser más bien un mecanismo exo-hidrolítico, ya que la endo-enzima identificada en la pared celular no tiene mucho efecto en su degradación. De esta forma, aunque se expresan las mismas enzimas en presencia de inulina y de agavina, la estructura de la fructana sí influye en el mecanismo de hidrólisis.

Las diferencias observadas en el mecanismo de degradación no afectan el potencial prebiótico de las fructanas evaluadas, ya que tanto inulina como agavina estimularon de forma similar el crecimiento de *B. longum*. Se sugiere que el factor estructural que más influye en el metabolismo de fructanas y por lo tanto en su efecto prebiótico es el peso molecular, no el tipo de enlace.

XI PERSPECTIVAS

- Purificar y caracterizar estructuralmente los intermediarios de hidrólisis de agavina por *B.longum_11*.
- Corroborar la localización intracelular de la enzima *B.longum_11*.
- Cuantificar la fructosa liberada a lo largo de la fermentación de inulina y agavina por *B. longum*, a fin de saber si los FOS presentes en el medio y los producidos durante la fermentación son hidrolizados o internalizados.
- Secuenciar las enzimas identificadas mediante los zimogramas.
- Identificar el gen correspondiente a la endo-enzima identificada, clonarlo y expresar la enzima recombinante para su caracterización.

XII REFERENCIAS

- Ashraf, R. y Shah, N. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54: 938-956.
- Ávila-Fernández, Á., Cuevas-Juárez, E., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C. y López-Munguía, A. (2016). Functional characterization of a novel β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on structurally diverse fructans. *Journal of Applied Microbiology* doi:10.1111/jam.13154.
- Ávila-Fernández, Á., Galicia-Lagunas, N., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C. y López-Munguía, A. (2011). Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chemistry* 129: 380-386.
- Baumgartner, S., Dax, T. G., Praznik, W. y Falk, H. (2000). Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). *Carbohydrate Research* 328: 177-183.
- Biedrzycka, E. y Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science and Technology* 15: 170-175.
- Boffa, L., Lupton, J., Mariani, M., Ceppi, M., Newmark, H., Scalmati, A. y Lipkin, M. (1992). Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Research* 52: 5906-5912.
- Bouvier, M., Meance, S., Bouley, C., Berta, J. y Grimaud, J. (2001). Effects of consumption of a milk fermented by the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on colonic transit times in healthy humans. *Bioscience Microflora* 20: 43-48.
- Bugaut, M. y Bentejac, M. (1993). Biological effects of short-chain fatty acids in nonruminant mammals. *Annual Review of Nutrition* 13: 217-241.
- Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzyna, I. y Bujacz, G. (2011). Crystal structures of the apo form of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *FEBS J* 278: 1728-1744.
- Deguchia, Y., Morishitaa, T. y Mutai, M. (1984). Comparative Studies on Synthesis of Water-soluble Vitamins among Human Species of Bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 13-19.
- Duffy, L., Zielezny, M., Riepenhoff-Talty, M., Dryja, D., Sayahtheri-Altai, S., Griffiths, E., Ruffin, D., Barrett, H. y Ogra, P. (1994). Reduction of virus shedding by *B. bifidum* in experimentally induced MRV infection. *Statistical application for ELISA. Digestive Diseases and Sciences* 39: 2334-2340.
- Ehrmann, M. A., Korakli, M. y Vogel, R. F. (2003). Identification of the gene for beta-fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140(T) and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 46: 391-397.
- Ejtahed, H., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M. y Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 28: 539-543.
- Falony, G., Lazidou, K., Verschaeren, A., Weckx, S., Maes, D. y De-Vuyst, L. (2008). *In vitro* kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 454-461.

- Fooks, L. J. y Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88: 39-49.
- Franck, A. (2007). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87: S287.
- Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. y Forstner, J. (1997). Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 506-512.
- Gibson, G. y Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 412-420.
- Gibson, G. R. y Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* 125: 1401-1412.
- Goh, Y. y Klaenhammer, T. (2015). Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annual Review of Food Science and Technology* 6: 137-156.
- Gomez, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Klinder, A. y Costabile, A. (2010). *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *J Appl Microbiol* 108: 2114-2121.
- Hendry, J. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123: 3-14.
- Imamura, L., Hisamitsu, K. y Kobashi, K. (1994). Purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 17: 596-602.
- Janer, C., Rohr, L., Peláez, C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T. y Meile, L. (2004). Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium lactis*. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 279-285.
- Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Tkaczuk, K. L. y Bielecki, S. (2011). Biosynthesis, purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1. *Process Biochemistry* 46: 1963-1972.
- Kawakamia, A., Yoshidaa, M. y Van den Endeb, W. (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358: 93-101.
- Kim, J. H., An, H. J., Garrido, D., German, J. B., Lebrilla, C. B. y Mills, D. A. (2013). Proteomic Analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Reveals the Metabolic Insight on Consumption of Prebiotics and Host Glycans. *PLoS ONE* 8: e57535.
- Kullin, B., Abratt, V. R. y Reid, S. J. (2006). A functional analysis of the *Bifidobacterium longum* *cscA* and *scrP* genes in sucrose utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 975-981.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A. y Van den Ende, W. (2009). Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *J Exp Bot* 60: 727-740.

- López, M., Mancilla-Margalli, N. y Mendoza, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7835-7840.
- Mancilla-Margalli, A. y López, M. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *Journal of agriculture and food chemistry* 54: 7832-7839.
- Marx, S. P., Winkler, S. y Hartmeier, W. (2000). Metabolization of B-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 182: 163-169.
- Miller, G. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical chemistry* 31: 426-428.
- Muramatsu, K., Onodera, S., Kikuchi, M. y Shiomi, N. (1994). Substrate specificity and subsite affinities of B-fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 58: 1642-1645.
- Omori, T., Ueno, K., Kikuchi, M., Onodera, S. y Shiomi, N. (2010). Properties of a recombinant β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* JCM 1217. *Journal of Applied Glycoscience* 57: 73-76.
- Omori, T., Ueno, K., Muramatsu, K., Kikuchi, M., Onodera, S. y Shiomi, N. (2010). Characterization of recombinant β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Chemistry Central Journal* 4: 9.
- Ortiz-Soto, M. E., Olivares-Illana, V. y López-Munguía, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* 22: 275-281.
- Perrin, S., Fougnes, C., Grill, J. P., Jacobs, H. y Schneider, F. (2002). Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 759-763.
- Perrin, S., Warchol, M., Grill, J.-P. y Schneider, F. (2001). Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *J Appl Microbiol* 90: 859-865.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F. y Matuchansky, C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22: 495-512.
- Porras-Domínguez, J. R. (2012). Obtención de fructooligosacáridos a partir de levanas bacterianas mediante el uso de endolevanasas. TESIS DE MAESTRÍA. Maestro en Ciencias, UNAM.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M. E. y López Munguía, A. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers* 132: 338-344.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, A., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C. y López Munguía, A. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry* 49: 783-790.
- Ramnani, P., Costabile, A., Bustillo, A. G. y Gibson, G. R. (2015). A randomised, double-blind, cross-over study investigating the prebiotic effect of agave fructans in healthy human subjects. *J Nutr Sci* 4: e10.
- Ritsema, T. y Smeekens, S. (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.

- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S. y Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of FOS and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6150-6158.
- Ryan, S. M., Fitzgerald, G. F. y Sinderen, D. (2005). Transcriptional Regulation and Characterization of a Novel B-Fructofuranosidase-Encoding Gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3475-3482.
- Ryan, S. M., Fitzgerald, G. F. y van Sinderen, D. (2005). Transcriptional regulation and characterization of a novel beta-fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3475-3482.
- Ryan, S. M., Fitzgerald, G. F. y van Sinderen, D. (2005). Transcriptional regulation and characterization of a novel beta-fructofuranosidase-encoding gene from *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Appl Environ Microbiol* 71: 3475-3482.
- Sasaki, T., Fujimori, M., Hamaji, Y., Hama, Y., Ito, K., Amano, J. y Taniguchi, S. (2006). Genetically engineered *Bifidobacterium longum* for tumor-targeting enzyme-prodrug therapy of autochthonous mammary tumors in rats. *Cancer Science* 97: 649-657.
- Scardovi, V. y Trovatelli, L. D. (1965). Fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annals of Microbiology and Enzymology* 15: 19.
- Schell, M., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, D. y Arigoni, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *PNAS* 99: 14422-14427.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N. y Reddy, B. (1997). *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 8: 833-841.
- Van-der-Meulen, R., Makras, L., Verbrugghe, K., Adriany, T. y De-Vuyst, L. (2006). *In vitro* kinetic analysis of oligofructose consumption by *Bacteroides* and *Bifidobacterium* spp. indicates different degradation mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1006-1012.
- Van der Meulen, R., Avonts, L. y De-Vuyst, L. (2004). Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1923-1930.
- Vandamme, E. J. y Derycke, D. G. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology* 29: 139-176.
- Velázquez-Martínez, J. R., González-Cervantes, R. M., Hernández-Gallegos, M. A., Campos Mendiola, R., Jiménez Aparicio, A. R. y Arenas Ocampo, M. L. (2014). Prebiotic potential of *Agave angustifolia* Haw fructans with different degrees of polymerization. *Molecules* 19: 12660-12675.
- Ventura, M., Turróni, F., Lugli, G. A. y van Sinderen, D. (2014). Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 163-168.

- Vijn, I. y Smeekens, S. (1999). Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120: 351-359.
- Warchol, M., Perrin, S., Grill, J.-P. y Schneider, F. (2002). Characterization of a purified beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Letters in Applied Microbiology* 35: 462-467.
- Whorwel, P., Altringer, L., Morel, J., Bond, Y., Charbonneau, D., O'Mahony, L., Kiely, B., Shanahan, F. y Quigley, E. (2006). Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology* 10: 11581-11590.
- Yazawa, K. y Tamura, Z. (1982). Search for sugar sources for selective increase of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 1: 39-44.
- Zeeshan, M., Imran, M., Hussain, T., Hussain, K., Habib, Y. y Ahmad, B. (2014). Probiotics and their beneficial effects against various diseases. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 127: 405-415.