

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Estudio de la producción y extracción de α -L-fucosidasa
de bifidobacterias

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

Presenta

Mauricio Eduardo Pavón Chimal

Directora de tesis:

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesores:

Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaria

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Noviembre de 2019

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

Este trabajo fue realizado con apoyo del CONACyT (Becario 638147).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00268

Matrícula: 2173801844

Estudio de la producción y extracción de α -L-fucosidasa de bifidobacterias.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 27 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ
DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN RODRIGUEZ
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES
DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: MAURICIO EDUARDO PAVON CHIMAL

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

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Mauricio Chimal

MAURICIO EDUARDO PAVON CHIMAL
ALUMNO

REVISÓ

Rosalía Ferrano de la Paz
MTRA. ROSALÍA FERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

Sara Lucía Camargo Ricalde
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

Lorena del Carmen Gomez Ruiz
M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ

VOCAL

Francisco Javier Guzman Rodriguez

DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN
RODRIGUEZ

VOCAL

Luis Guillermo Gonzalez Olivares

DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

SECRETARIO

Sergio Andres Alatorre Santamaria

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE
SANTAMARIA

Índice

Índice de figuras	VI
Índice de tablas.....	VIII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	X
1 Introducción	1
2 Antecedentes.....	2
2.1 La leche humana	2
2.1.1 Lípidos.....	3
2.1.2 Proteínas.....	3
2.1.3 Carbohidratos.....	3
2.2 Microbiota intestinal y su interacción con LH.....	8
2.2.1 Beneficios de la microbiota intestinal	10
2.2.1.1 Efecto sobre alergias.....	11
2.3 Prebióticos	13
2.3.1 Criterios para definir a un prebiótico.....	13
2.3.2 Tipos de prebióticos.....	14
2.4 Bifidobacterias	16
2.4.1 La Familia Bifidobacteriaceae.....	16
2.4.2 El genoma bifidobacteriano	17
2.4.3 El genoma y el metabolismo.....	18
2.4.4 Transporte de carbohidratos.....	19
2.4.5 Hidrólisis de oligosacáridos	21
2.5 Síntesis de OLH.....	28
2.5.1 Síntesis química.....	29
2.5.2 Síntesis enzimática	30
2.5.3 Síntesis mediante ingeniería metabólica de microorganismos.....	32
2.6 Producción y extracción de enzimas.....	34
2.6.1 Extracción de enzimas.....	34

2.6.2	Uso de detergentes.....	36
2.6.3	Métodos mecánicos de lisis celular	36
2.6.4	Consideraciones en la extracción de enzimas.....	40
2.7	Antecedentes en el grupo de investigación	41
3	Hipótesis	42
4	Objetivos.....	42
4.1	Objetivo general.....	42
4.2	Objetivos particulares	42
5	Metodología.....	43
5.1	Propagación de bifidobacterias	43
5.2	Preparación de suspensión de biomasa.....	43
5.3	Actividad enzimática (hidrólisis)	43
5.4	Cuantificación del <i>p</i> -nitrofenol liberado	44
5.5	Cuantificación de la concentración de la suspensión de biomasa	44
5.6	Cuantificación de crecimiento de biomasa.....	44
5.7	Ajuste de la concentración de la suspensión de biomasa.....	45
5.8	Sonicación	45
5.8	Plan de trabajo.....	46
5.9	Metodología por etapa.....	47
5.9.1	Etapa 1	47
5.9.2	Etapa 2.....	47
5.9.2	Etapa 3.....	48
6	Resultados y discusión.....	49
6.2	Efecto de la fuente de carbono en la producción de α -L-fucosidasa	51
6.2.1	Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento de las bifidobacterias.....	53
6.3	Purificación parcial de α -L-fucosidasa	54
6.3.1	Primer tratamiento de sonicación	54
6.3.2	Segundo tratamiento de sonicación	56
6.3.3	Tercer tratamiento de sonicación	59
7	Conclusiones	65

8 Bibliografía.....	66
9 Anexos.....	73
9.1 Curva patrón de <i>p</i> -nitrofenol.....	73
9.2 Composición del medio MRS modificado	74
9.3 Tratamientos de sonicación tercera etapa.....	75
9.3.1 ANOVA del primer diseño de superficie de respuesta.....	78
9.3.2 Gráficos de superficie del primer diseño experimental.....	79
9.3.3 ANOVA del segundo diseño de superficie de respuesta.....	80

Índice de figuras

Figura 1 Composición de la leche humana	2
Figura 2 Carbohidratos que componen a los OLH	4
Figura 3 Estructura base de OLH	5
Figura 4 Ejemplos de estructuras de OLH.....	6
Figura 5 Habilidad de diferentes microorganismos para crecer utilizando 2'-fucosil-lactosa ...	7
Figura 6 Habilidad de diferentes microorganismos para hidrolizar 2'-fucosil-lactosa	7
Figura 7 Diferencias en la composición de la microbiota intestinal de infantes alimentados con leche humana y alimentados con formula láctea.....	9
Figura 8 Diferencias entre la composición de la leche humana y la fórmula láctea.....	10
Figura 9 Beneficios atribuidos a la presencia de Bifidobacterias.....	11
Figura 10 Estructura química de la lactulosa.....	14
Figura 11 Estructura química de la inulina.....	15
Figura 12 Mapa de calor de agrupamiento jerárquico que representa la variabilidad de <i>B. longum</i> en términos de presencia / ausencia de familias de genes.....	18
Figura 13 Representación de dos métodos de importación de carbohidratos en bifidobacterias para ser empleados en el metabolismo.....	20
Figura 14 Expresión génica de F1SBP de <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> cultivada con inulina como única fuente de carbono.....	21

Figura 15 Perfiles de consumo de OLH en bifidobacterias, los identificados con un asterisco son oligosacáridos fucosilados.	22
Figura 16 Vía de la derivación bífida	23
Figura 17 Familias de GH identificadas solo en genomas de <i>B. longum</i>	24
Figura 18 Mecanismo básico de retención e inversión de las glicosil-hidrolasas.....	26
Figura 19 Diagrama de reacción de la α -L-fucosidasa.....	26
Figura 20 Expresión de gen fucosidasa ATCC 15697 durante la fermentación de carbohidratos.	28
Figura 21 Ejemplos de algunos oligosacáridos sintetizados mediante síntesis química	29
Figura 22 Ejemplo de síntesis química	30
Figura 23 Ruta metabólica en una síntesis de oligosacáridos mediante ingeniería metabólica de microorganismos	33
Figura 24 Cavitación producida por ondas de ultrasonido	37
Figura 25 Plan de trabajo	46
Figura 26 Actividad de α -L-fucosidasa de las tres bifidobacterias.....	49
Figura 27 Actividad enzimática de las tres bifidobacterias.....	51
Figura 28 Actividades específicas para las tres bifidobacterias crecidas en dos fuentes de carbono.....	52
Figura 29 Crecimiento de bifidobacterias utilizando como fuente de carbono glucosa e inulina	54
Figura 30 Actividad enzimática de las tres bifidobacterias sometidas a ultrasonido.....	55
Figura 31 Actividad enzimática <i>B. longum</i> sometida a ultrasonido.....	56
Figura 32 Actividad residual de α -L-fucosidasa en la biomasa sonicada y el extracto enzimático a diferente tiempo de sonicación	58
Figura 33 Actividad residual de la α -L-fucosidasa obtenida en el extracto de sonicación	60
Figura 34 Gráficos de superficie y contorno de la extracción de la α -L-fucosidasa de <i>B. longum</i>	61
Figura 35 Actividad residual de α -L-fucosidasa en la biomasa sonicada y el extracto enzimático a diferente tiempo de sonicación, volumen y potencia.....	64
Figura 36 Absorbancia vs μ M de <i>p</i> -nitrofenol.....	73
Figura 37 Gráficos de superficie de la extracción de la α -L-fucosidasa de <i>B. longum</i> , primer diseño experimental	79

Índice de tablas

Tabla 1 α -L-fucosidasas microbianas empleadas en la reacción de transfucosilación.....	31
Tabla 2 Metodologías de la Etapa 1	47
Tabla 3 Metodologías de la Etapa 2	47
Tabla 4 Metodologías de la Etapa 3	48
Tabla 5 Velocidad inicial (V_0) y actividad específica de la α -L-fucosidasa de las tres bifidobacterias.....	50
Tabla 6 Velocidad inicial (V_0) para las tres bifidobacterias crecidas con diferente fuente de carbono.....	52
Tabla 7 Velocidad inicial (V_0) del extracto enzimático obtenido de la sonicación de las bifidobacterias.....	55
Tabla 8 V_0 y actividad específica de biomasa sonicada y extracto enzimático	57
Tabla 9 Composición del medio MRS modificado.....	74
Tabla 10 Tratamientos de sonicación tercera etapa	75
Tabla 11 ANOVA del primer diseño de superficie de respuesta.....	78
Tabla 12 ANOVA del segundo diseño de superficie de respuesta	80
Tabla 13 ANOVA paa variables del segundo diseño de superficie de respuesta	80
Tabla 14 ANOVA para estimadores del segundo diseño de superficie de respuesta.....	81

Resumen

Los oligosacáridos fucosilados de la leche humana son compuestos de interés por su acción prebiótica en la microbiota intestinal de lactantes. Es por ello que existe un incremento en las investigaciones asociadas a la síntesis de oligosacáridos por diferentes técnicas. Una de las vías de obtención es la síntesis enzimática mediante glicosil-hidrolasas como la α -L-fucosidasa, la cual es una enzima que se encuentra en una amplia variedad de organismos. Es así que en este trabajo, el objetivo fue producir y extraer α -L-fucosidasa de bifidobacterias. Para esta investigación se dividió el trabajo en tres partes, empleando tres especies de bifidobacterias: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *Bifidobacterium bifidum*. Primero se evaluó la actividad enzimática de las tres bifidobacterias, tanto para la actividad asociada a la célula como la actividad extracelular, encontrando actividad solamente asociada a la célula. En la segunda etapa se incrementó la producción de enzima induciendo la producción mediante el empleo de inulina como fuente de carbono en el medio de cultivo, logrando el incremento deseado en la actividad específica de α -L-fucosidasa en las tres bifidobacterias. Finalmente se utilizó ultrasonido para realizar una purificación parcial de α -L-fucosidasa de *Bifidobacterium longum* crecida en medio de cultivo con inulina, optimizando la extracción mediante un método de superficie de respuesta con tres variables (tiempo, potencia y volumen). Es así que se logró extraer aproximadamente un tercio de la actividad residual que estaba asociada a la célula. Con estos resultados se comprobó que es posible aumentar la actividad de la α -L-fucosidasa y extraer y purificar la α -L-fucosidasa proveniente de *Bifidobacterium longum*.

Abstract

The fucosylated human milk oligosaccharides are compounds of interest for their prebiotic action in the intestinal microbiota of infants. That is why there is an increase in research associated with the synthesis of oligosaccharides by different techniques. One way of obtaining is enzymatic synthesis by glycosyl hydrolases such as α -L-fucosidase, which is an enzyme found in a wide variety of organisms. Thus, in this work, the objective was to produce and extract α -L-fucosidase from bifidobacteria. For this research, the work is divided into three parts, using three species of bifidobacteria: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* and *Bifidobacterium bifidum*. First, the enzymatic activity of the three bifidobacteria was evaluated, both for the cell associated activity and extracellular activity, finding cell associated activity only. In the second stage, enzyme production was increased by inducing its production by using inulin as a sole carbon source in the culture medium, achieving the desired increase in the specific activity of α -L-fucosidase in the three bifidobacteria. Finally, an ultrasound method was performed to perform a partial purification of α -L-fucosidase from *Bifidobacterium longum* grown in culture medium with inulin, optimizing the extraction using a response surface method with three variables (time, power and volume). Releasing, approximately one third of the cell associated residual activity. With these results it was found that it is possible to increase the activity of α -L-fucosidase and extract and purify the α -L-fucosidase from *Bifidobacterium longum*.

1 Introducción

La leche humana contiene entre 3 y 20 g/L de oligosacáridos compuestos de extremos reductores de lactosa alargados con hasta 25 unidades, que pueden ser fucosilados y/o sialilados. Uno de los monosacáridos más comunes presente en los extremos no reductores de oligosacáridos de muchos glicoconjugados, incluidos los oligosacáridos ligados a glicoproteínas, glicolípidos en la superficie celular y oligosacáridos en la leche humana es la L-fucosa.

La importancia de encontrar L-fucosa en los oligosacáridos de la leche humana es que guía la microbiota al seleccionar negativamente a ciertas poblaciones. Esta propiedad permite que otros grupos bacterianos prosperen, como bifidobacterias y lactobacilos, lo que se relaciona con una disminución de padecimientos gastrointestinales, entre otros padecimientos asociados a esta relación con la microbiota.

De entre las diferentes variedades de bifidobacterias comúnmente presentes en la microbiota intestinal de los lactantes, se tiene documentado que *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* presenta una muy buena capacidad para metabolizar fucooligosacáridos de la leche humana, además este microorganismo tiene una actividad relativamente alta de α -L-fucosidasa.

En condiciones normales, la α -L-fucosidasa realiza una reacción de hidrólisis sobre residuos de fucosa presentes en estos oligosacáridos, sin embargo, a concentraciones altas de sustrato y en condiciones específicas, la enzima usa los oligosacáridos como nucleófilos entrantes en lugar del agua, lo que da como resultado el intercambio de los residuos de carbohidratos y puede conducir a la formación de nuevos oligosacáridos con un mayor grado de polimerización, como es el caso de los fucooligosacáridos.

En este sentido, las bifidobacterias cuentan con varias enzimas con actividad α -L-fucosidasa, que experimentalmente pueden ser aisladas y purificadas.

Para tener un mayor control sobre la actividad enzimática para su uso en la síntesis de fucooligosacáridos es recomendable la producción y purificación de la α -L-fucosidasa, por lo que se deben probar estrategias para que las células produzcan la enzima en mayor cantidad, como el uso de inductores y utilizar un método de extracción adecuado de entre los múltiples métodos que se tienen disponibles, que permita recuperar una buena fracción de la actividad enzimática produciendo la menor cantidad de interferencias posibles.

Es por ello que en el presente trabajo, se evaluó la actividad de la α -L-fucosidasa de tres Bifidobacterias (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y *Bifidobacterium bifidum*) y su producción mediante el uso de inulina como una fuente de carbono que induce la producción de esta enzima, así como su extracción mediante un proceso de sonicación.

2 Antecedentes

2.1 LA LECHE HUMANA

La leche humana (LH) se considera la forma natural y óptima de nutrir al recién nacido. Se cree que su composición se formó a través de la evolución exclusivamente para este propósito. Es un alimento complejo, contiene una amplia gama de moléculas bioactivas en más de 100 compuestos diferentes, que incluyen péptidos bioactivos, lactoferrina, enzimas glucolíticas, anticuerpos, citocinas, nucleótidos y ácidos grasos, entre otros, y proporciona en un solo alimento todos los nutrientes necesarios para el crecimiento del lactante (Thomson, Medina, & Garrido, 2017).

Los componentes nutricionales de la LH provienen de tres fuentes: algunos se originan por síntesis en el lactocito, algunos son de origen dietético y otros se originan en las reservas maternas. La composición de macronutrientes de la LH varía en las madres y en la lactancia, pero se conserva notablemente en todas las poblaciones a pesar de las variaciones en el estado nutricional de la madre, se estima que la composición media de macronutrientes de la leche madura (de 4 a 6 semanas posteriores al parto) es de aproximadamente 1% de proteína, 4% de lípidos y 8% de carbohidratos, de los cuales un 6% corresponde a lactosa y 2% a oligosacáridos en peso húmedo, correspondiendo el resto a agua y otros componentes (Fig. 1) (Ballard & Morrow, 2013).

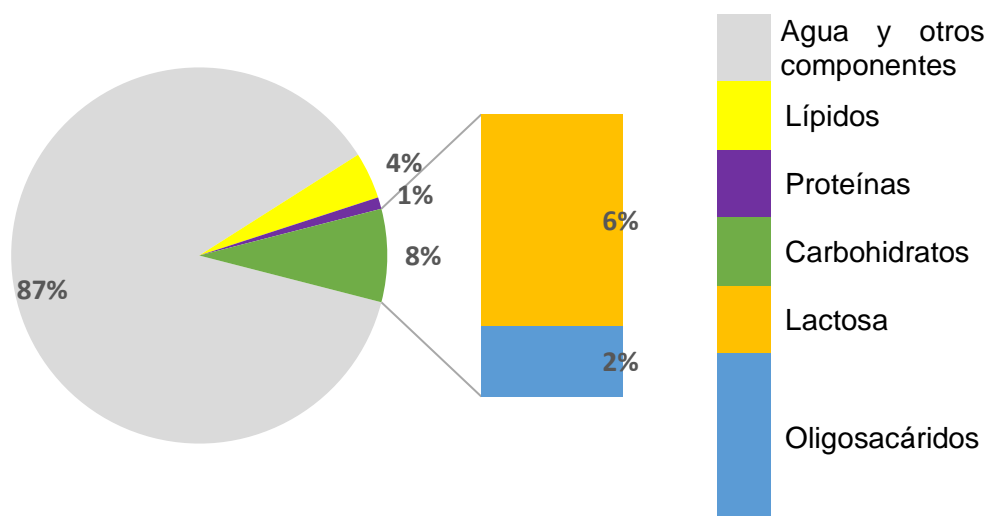


Figura 1 Composición de la leche humana

2.1.1 Lípidos

Los lípidos son la mayor fuente de energía en la LH, ya que contribuyen con un 40-55% de la energía total. Estos lípidos están presentes como una emulsión. La gran mayoría de los lípidos secretados son triacilglicéridos, que contribuyen al 98% de la fracción lipídica (Andreas, Kampmann, & Mehring Le-Doare, 2015). Son el macronutriente más variable y su perfil de ácidos grasos varía en relación con la dieta materna, particularmente, en los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Ballard & Morrow, 2013). Contiene más de 200 ácidos grasos; sin embargo, muchos de estos están presentes en concentraciones muy bajas, mientras que otros dominan. Por ejemplo, el ácido oleico que se puede encontrar en cantidades de 30-40 g / 100 g de lípidos de la LH.

2.1.2 Proteínas

Las proteínas de la leche humana se dividen en fracciones de suero de leche y caseínas, cada uno de los cuales está compuesto por una notable variedad de proteínas y péptidos específicos. Cuenta con más de 400 proteínas diferentes que realizan varias funciones, proporcionan nutrición, tienen actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras, y estimulan la absorción de nutrientes. Las proteínas más abundantes son la caseínas, la lactoalbúmina, la lactoferrina, la inmunoglobulina IgA secretora, la lisozima y la albúmina sérica (Ballard & Morrow, 2013). Como ejemplo de las funciones realizadas por la proteínas de la LH se tiene a las inmunoglobulinas, presentes en concentraciones particularmente altas al principio de la lactancia, la IgA secretora, es la forma más predominante, seguida de IgG. Estas proporcionan protección inmunológica para el lactante, mientras que su sistema inmune madura.

2.1.3 Carbohidratos

El principal carbohidrato de la leche humana es el disacárido lactosa. Su concentración en la LH es la menos variable entre los macronutrientes (Ballard & Morrow, 2013), además está presente en una concentración más alta en los seres humanos en comparación con cualquier otra especie, lo que corresponde a las altas demandas de energía del cerebro humano (Andreas *et al.*, 2015). Sin embargo, existen oligosacáridos de importancia biológica que se encuentran en concentraciones más bajas.

2.1.3.1 Oligosacáridos de la leche humana

La leche humana confiere beneficios a corto y largo plazo a los lactantes amamantados, incluido un riesgo reducido de otitis media, protección ante enfermedades gastrointestinales y

del tracto respiratorio, obesidad, diabetes, dermatitis atópica, leucemia infantil y síndrome de muerte súbita del lactante. Aunque aún no se conoce por completo cómo se producen estos beneficios, las investigaciones han señalado un importante papel de los oligosacáridos de la leche humana (OLH) para conferir protección y mejorar el desarrollo de los lactantes (Andreas *et al.*, 2015).

Los OLH representan el tercer componente sólido más abundante en LH después de la lactosa y los lípidos (Andreas *et al.*, 2015). La leche humana contiene una mezcla compleja de OLH, que se administran al lactante en altas concentraciones de entre 3 y 20 g/L, dependiendo de la etapa de lactancia y de los factores genéticos maternos. Este tipo de carbohidratos son oligosacáridos compuestos no conjugados, su concentración en la LH es 100 a 1000 veces mayor que la concentración de oligosacáridos en la leche bovina, que es la base de la mayoría de las fórmulas lácteas. Los OLH constan de cinco bloques de construcción de monosacáridos que se aprecian en la Figura 2.

- Galactosa (Gal)
- Glucosa (Glc)
- N-acetilglucosamina (GlcNAc)
- ▲ Fucosa (Fuc)
- ◆ Ácido siálico (Sia)

Figura 2 Carbohidratos que componen a los OLH

Todos los OLH tienen lactosa ($\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}$) en el extremo reductor, que puede alargarse en el enlace $\beta 1\text{-3}$ o $\beta 1\text{-6}$ por dos disacáridos diferentes, formando cadenas de tipo I si se unen en el enlace $\beta 1\text{-3}$ o de tipo II si la unión se da en el enlace $\beta 1\text{-4}$ (Bode, 2015). Pueden formar oligosacáridos de hasta 25 unidades, que pueden ser fucosilados y/o sialilados a través de enlaces R-glicosídicos, produciendo moléculas tales como 2'-fucosil-lactosa, o sialilactosa, como puede verse en la Figura 3 (LoCascio *et al.*, 2007). Los OLH de cadena tipo 1 son más abundantes que los de tipo 2, siendo el oligosacárido de cadena tipo I, 2'-fucosil-lactosa el más abundante de todos los OLH. (Thomson *et al.*, 2017).

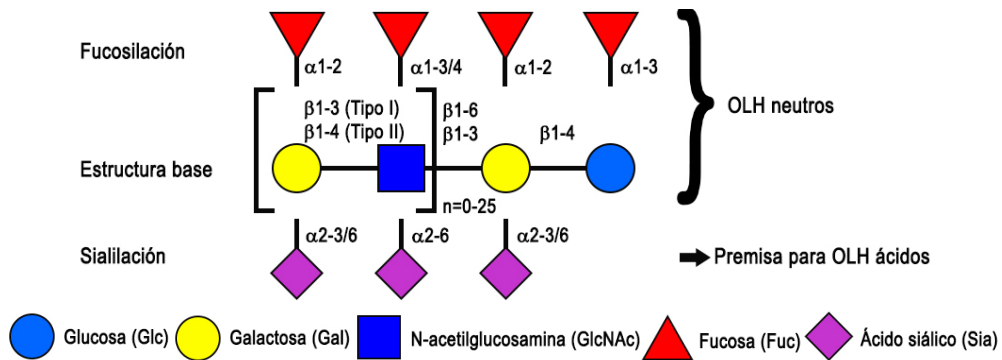


Figura 3 Estructura base de OLH (Sprenger, Baumgärtner, & Albermann, 2017)

Se ha documentado que existen más de 200 diferentes tipos de OLH, los cuales tienen estructuras de diferentes longitudes, tipos de sustituciones y configuraciones de enlaces, siendo la gran mayoría de ellos fucosilados, algunos ejemplos se presentan en la Figura 4 (Zeuner *et al.*, 2018).

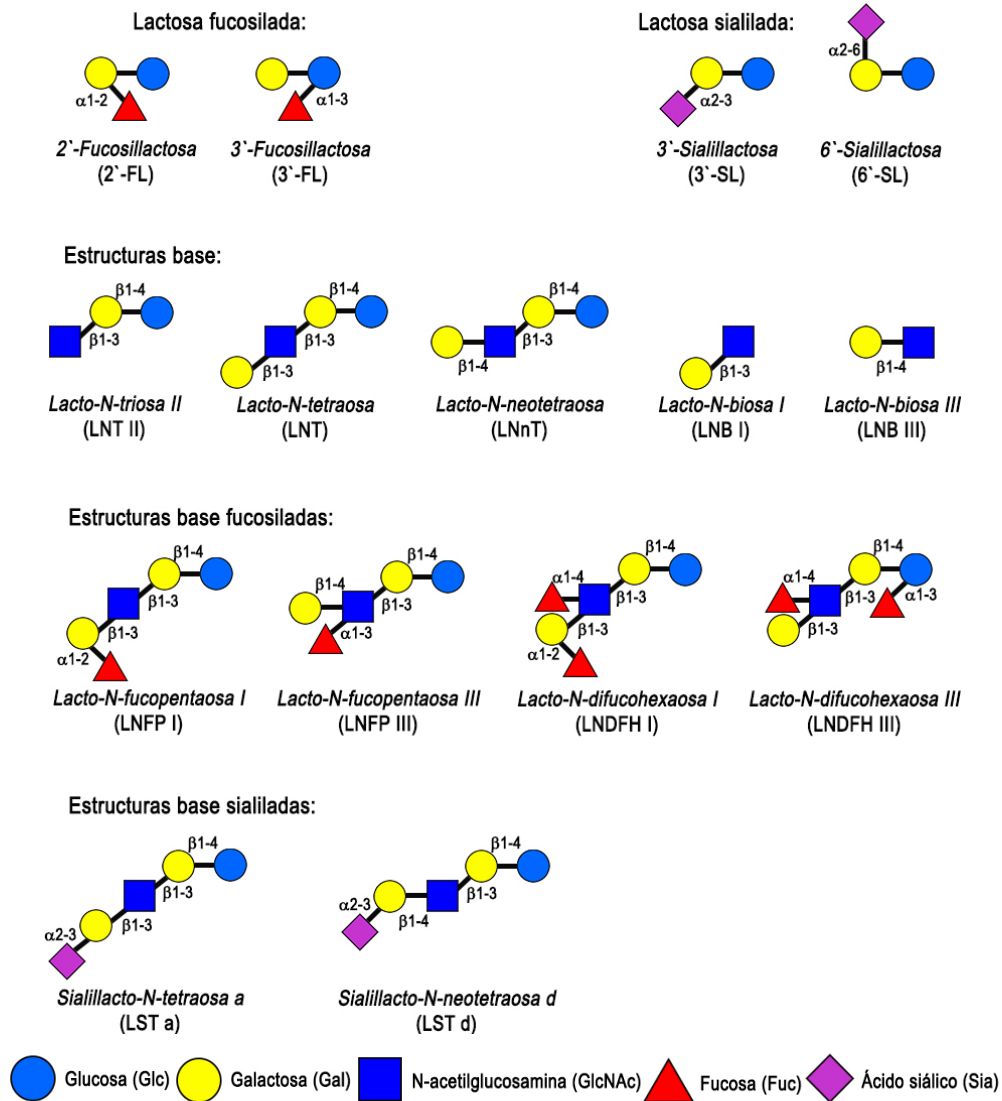


Figura 4 Ejemplos de estructuras de OLH (Sprenger et al., 2017)

Los OLH resisten el pH bajo del estómago, así como la degradación por las enzimas pancreáticas de los lactantes. Aproximadamente, el 1% de los OLH ingeridos se absorben, alcanzan la circulación sistémica del lactante y se excretan intactos en la orina. Una parte de los OLH son metabolizados por la microbiota intestinal del lactante mientras que otros se excretan intactos con las heces. Además, los OLH sirven como sustratos metabólicos para bacterias específicas, por lo que, tienen una ventaja de crecimiento y prosperan. Otras bacterias que no pueden utilizar OLH tienen una desventaja y no crecen bien o no lo hacen. Por lo tanto, los OLH son los primeros prebióticos que los humanos encuentran con su dieta, generalmente desde el primer día de vida (Bode, 2015).

Existen ejemplos de microorganismos que metabolizan este tipo de oligosacáridos. Por ejemplo, se tiene documentado que *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* muestra una buena capacidad para metabolizar fucooligosacáridos (FUCOS) de la leche humana, como 2'-fucosil-lactosa (Fig. 5), de entre las diferentes variedades de bifidobacterias comúnmente presentes en la microbiota intestinal de los lactantes, así como también muestra una actividad de α -L- α -L-fucosidasa relativamente alta (Fig. 6).

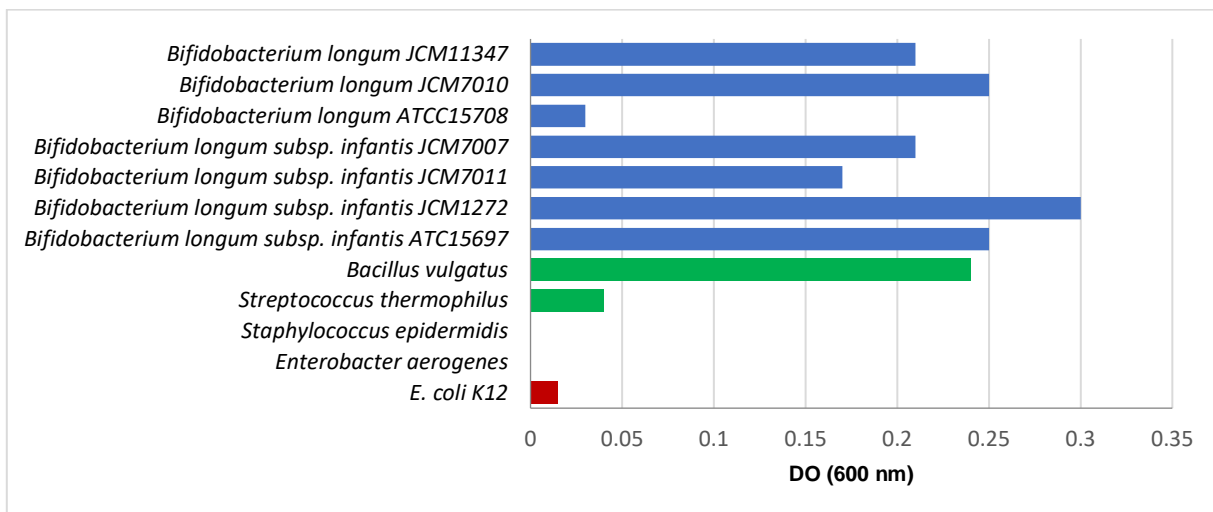


Figura 5 Habilidad de diferentes microorganismos para crecer utilizando 2'-fucosil-lactosa (Yu, Chen, & Newburg, 2013)

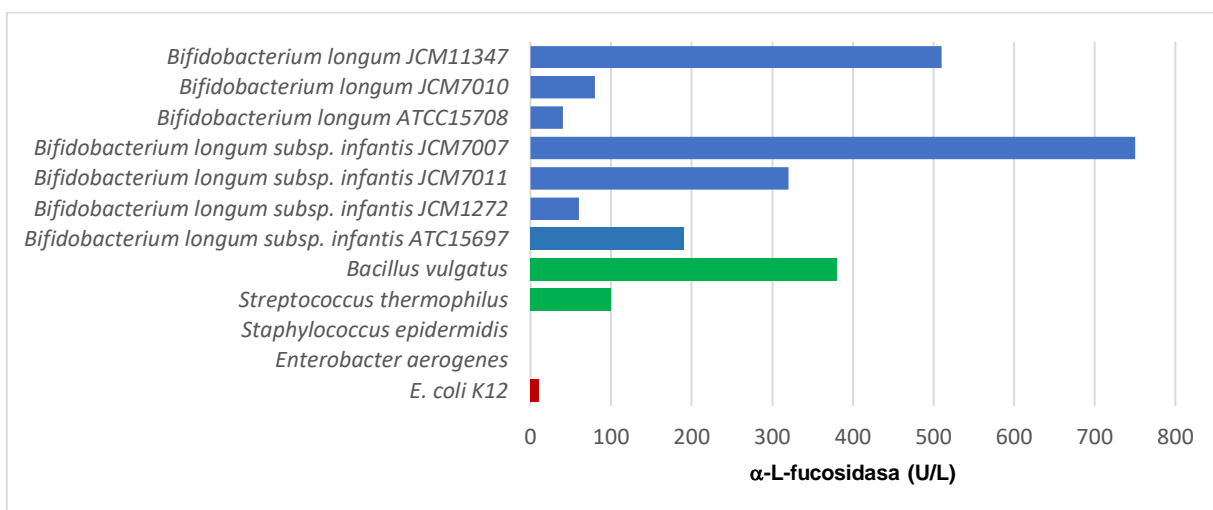


Figura 6 Habilidad de diferentes microorganismos para hidrolizar 2'-fucosil-lactosa (Yu et al., 2013)

Adicionalmente, se han realizado experimentos para evaluar el potencial prebiótico *in vitro* de OLH, comparando microorganismos mutualistas de la microbiota intestinal como *Bifidobacterium longum* ATCC15697 y *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 y no mutualistas, como *Campylobacter jejuni* S107 y *Escherichia coli* K12. En dichos ensayos se observó que los OLH permitieron el crecimiento de *B. longum* y *L. acidophilus*, mientras que ninguno de estos oligosacáridos permitió un crecimiento significativo de microorganismos no mutualistas. Además se observó que *B. longum* metabolizó eficientemente los OLH mientras que *L. acidophilus* los metabolizó en menor grado (Zeuner, Jers, Mikkelsen, & Meyer, 2014).

Dado que los OLH se absorben y aparecen en la circulación sistémica, es probable que lleguen a muchos órganos además del intestino, incluidos el hígado y el cerebro, así como a las vías respiratoria y urinaria. Por lo tanto, las funciones biológicas de los OLH pueden no estar localizadas solo en el intestino; y pueden afectar al lactante en múltiples niveles del cuerpo.

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL Y SU INTERACCIÓN CON LH

El intestino de los neonatos se asemeja al de un animal libre de gérmenes. La colonización microbiana comienza poco después del nacimiento y en pocas horas las bacterias comienzan a aparecer en las heces, inicialmente los microorganismos se adquieren por el contacto con la madre; posteriormente, el recién nacido está expuesto a microorganismos del medio ambiente. Un factor importante que puede influir en la composición de la microbiota intestinal en recién nacidos es el tipo de alimentación. En neonatos a término amamantados, *Bacteroides spp.* y bifidobacterias aparecen 4 días después del nacimiento, y después de 1 semana, dominan la microbiota intestinal, constituyendo el 80-90% de la microbiana total. Por el contrario, la microbiota intestinal de los lactantes alimentados con fórmula láctea es más compleja, con *Bifidobacterium spp.*, *Enterobacteriaceae* y *Streptococcus spp.* en una proporción similar (Fig. 7). Otra diferencia notable es que los bebés alimentados con fórmula láctea tienen recuentos mucho más altos de *Clostridium spp.* que los bebés alimentados con leche humana.

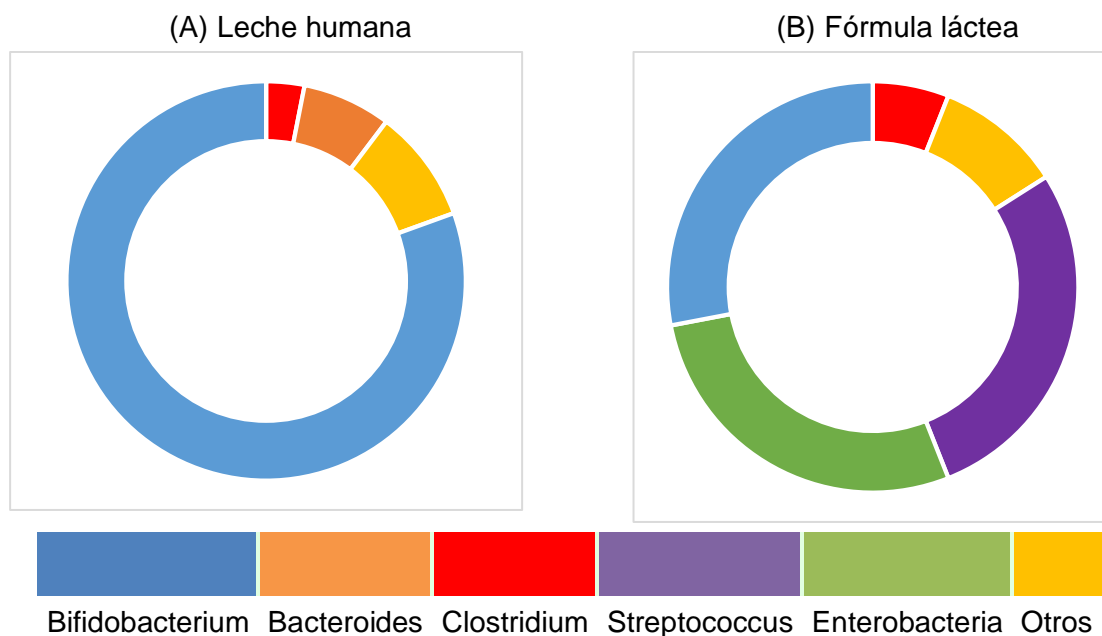


Figura 7 Diferencias en la composición de la microbiota intestinal de infantes alimentados con leche humana (A) y alimentados con fórmula láctea (B) (Bottacini, Ventura, Sinderen, & Motherway, 2014)

La leche humana y la fórmula láctea cuentan con varias diferencias, mientras que la leche humana cuenta con todos los macro y micronutrientes esenciales necesarios durante la primera infancia, las fórmulas lácteas carecen de una gran cantidad de componentes presentes en la leche humana (Fig. 8). En situaciones donde la lactancia materna no es una opción o cuando la leche no está disponible, la alimentación con fórmula se convierte en la dieta básica. Actualmente se pueden encontrar una gran variedad de fórmulas lácteas para diferentes necesidades alimenticias, como por ejemplo fórmulas a base de soya, hipoalergénicas y a base de leche de cabra; sin embargo, no hay un tipo de fórmula que sea superior a otra o que se adapte a todos los lactantes en desarrollo. Sin embargo, cada vez hay más fórmulas enriquecidas, basadas en una evaluación científica adecuada, que buscan tener un mejor impacto en el crecimiento y el desarrollo de los lactantes (Ahern, Hennessy, Ryan, Ross, & Stanton, 2019). Otra diferencia importante entre las fórmulas comerciales y la LH es la capacidad de amortiguación del pH, las fórmulas lácteas tienen buena capacidad amortiguadora, estableciendo el pH del colon de los lactantes en 6.5, mientras que la LH tiene una capacidad menor, estableciendo el pH del colon de los lactantes en 5.1, el cual favorece el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos, pero es inhibidor de muchas otras bacterias, lo que se cree que guía la composición de la microbiota al seleccionar negativamente a ciertas poblaciones (Di Gioia *et al.*, 2014).



Figura 8 Diferencias entre la composición de la leche humana y la fórmula láctea (Ahern et al., 2019)

Los prebióticos no fueron añadidos a las fórmulas lácteas a base de leche bovina hasta que Gibson y Roberfroid propusieron su uso en la modulación de la microbiota intestinal. (Ahern et al., 2019). En algunos estudios se ha demostrado que la administración de inulina y oligosacáridos de fructosa a lactantes aumenta el número de bifidobacterias, especialmente en infantes con niveles iniciales de colonización más bajos. (Charalampopoulos & Rastall, 2009)

2.2.1 Beneficios de la microbiota intestinal

Aunque la microbiota intestinal es dinámica, realiza algunas funciones básicas en los aspectos inmunológicos, metabólicos, estructurales y neurológicos del cuerpo humano, ejerciendo una influencia significativa en la salud física y mental de un individuo (Adak & Khan, 2019). Algunos de los diferentes beneficios a la salud que se pueden tener, especialmente por la presencia de bifidobacterias, pueden verse en la Figura 9.

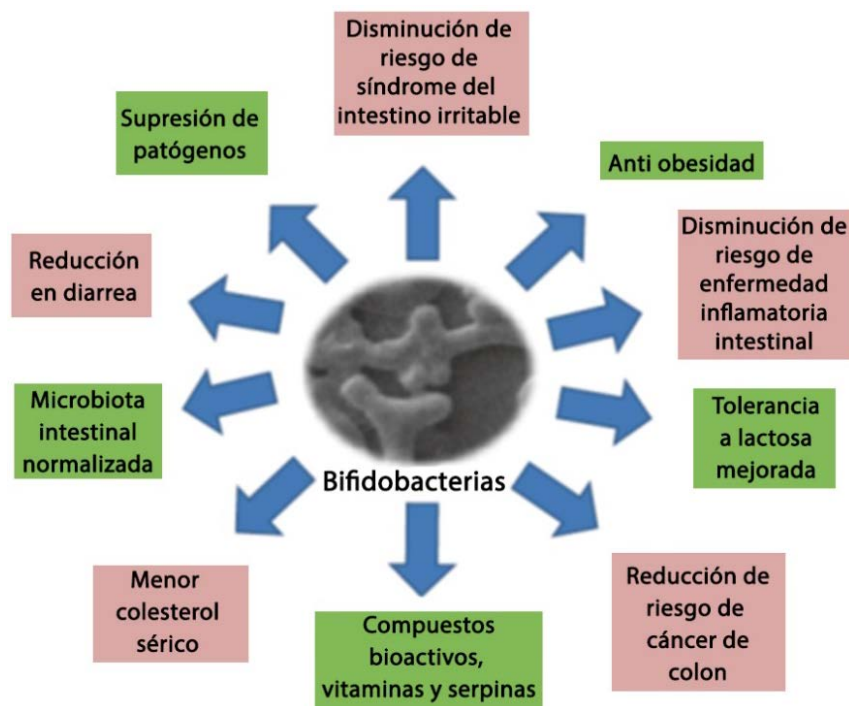


Figura 9 Beneficios atribuidos a la presencia de Bifidobacterias (Kalia, Shouche, Purohit, & Rahi, 2017).

2.2.1.1 EFECTO SOBRE ALERGIAS

Considerando que la microbiota de los lactantes alimentados con fórmula láctea es semejante a la de un adulto, se ha sugerido que los factores bifidogénicos presentes en la leche materna favorecen el desarrollo de una microbiota infantil que a su vez puede proteger del desarrollo de alergias. Las especies de *Bifidobacterium* de lactantes alérgicos también tienen una adhesión reducida a la mucosa intestinal humana, por lo tanto, la posibilidad de usar probióticos para prevenir el desarrollo de enfermedades alérgicas es una opción viable (Di Gioia *et al.*, 2014).

2.2.1.2 Obesidad

La obesidad se ha asociado con un perfil específico de la microbiota intestinal, se encontraron asociaciones significativas entre la obesidad y la presencia de algunos grupos bacterianos como *Staphylococcus aureus* y *E. coli* (Million *et al.*, 2013). Por otro lado, otros grupos microbianos, como las bifidobacterias, se han asociado con un estado de peso normal, en un estudio realizado en niños, los miembros del género *Bifidobacterium* fueron más numerosos en niños que permanecieron con peso normal a los 7 años que en niños con sobrepeso, lo que permite señalar que un desarrollo composicional aberrante de la microbiota intestinal

precede al sobrepeso y esto puede ofrecer nuevas posibilidades para las aplicaciones preventivas y terapéuticas de las bifidobacterias en el control del peso.

En los últimos años, meta-análisis (Owen *et al.*, 2005) han demostrado que la lactancia materna se asocia con una menor probabilidad de sobrepeso u obesidad en la infancia y que la duración de la lactancia materna está inversamente relacionada con el riesgo de sobrepeso. Varios resultados realizados principalmente en modelos animales sugieren que algunas cepas de bifidobacterias pueden tener una acción sobre el metabolismo de los lípidos y pueden ser potenciales candidatos terapéuticos para el tratamiento de la obesidad (Di Gioia *et al.*, 2014).

2.2.1.3 Colesterol

Las enfermedades cardiovasculares están asociadas con altos niveles de colesterol y/o triglicéridos (Bottacini *et al.*, 2014). En estudios se ha reportado la reducción del colesterol con el consumo de fructooligosacáridos en sujetos diabéticos y una mejora en los perfiles de lípidos al consumir inulina, además gracias a sustancias como el propionato que es producido por bifidobacterias, también se reducen los niveles de colesterol en suero y se inhibe la expresión de los genes asociados con la biosíntesis de colesterol intestinal (Enam & Mansell, 2019).

Un estudio preliminar reportó que una cepa de *B. longum* mostró un efecto significativo en la disminución del colesterol sérico total tanto en ratas como en humanos y que este efecto fue mayor cuando una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fue utilizado (Di Gioia *et al.*, 2014).

2.2.1.4 Tolerancia a la glucosa

Un estudio evidenció que *Bifidobacterium spp.* se correlaciona significativa y positivamente con una tolerancia a la glucosa, con la secreción de insulina inducida por glucosa y la disminución de las citocinas proinflamatorias plasmáticas y del tejido adiposo en ratones tratados con probióticos (Di Gioia *et al.*, 2014).

2.2.1.5 Efectos sobre el sistema nervioso

La comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro se conoce como eje intestino-cerebro. El intestino está conectado al cerebro a través del sistema nervioso entérico que involucra la salida paralela de los sistemas nerviosos parasimpático (nervio vago) y simpático (ganglios prevertebrales) y el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. El sistema nervioso entérico es considerado como el "segundo cerebro", consta de millones de neuronas y se divide en dos tipos de ganglios (plexos mientérico y submucoso). Las actividades de la microbiota intestinal

pueden controlar el sistema nervioso entérico y el sistema nervioso central a través de producción, expresión y renovación de neurotransmisores y factores neurotróficos.

Más del 90% de la serotonina y el 50% de la dopamina se originan en el intestino, que son producidos principalmente por la microbiota intestinal. Estos dos neurotransmisores juegan un papel importante en la transmisión del mensaje de "lucha para huir" al cerebro, en el control del estado de ánimo, la felicidad y el placer de un individuo (Adak & Khan, 2019). Metabolitos bacterianos, inducen la triptófano hidroxilasa 1 en las células enterocromafines para liberar serotonina en el intestino, que puede estimular el sistema nervioso simpático para influir en la memoria y el proceso de aprendizaje. Estos datos respaldan el hecho de que la disbiosis en la microbiota intestinal durante los trastornos gastrointestinales interrumpe el eje intestino-cerebro y conduce a trastornos del estado de ánimo (Adak & Khan, 2019).

2.3 PREBIÓTICOS

La definición original de un prebiótico se limitó a un beneficio para el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, se definió como "un ingrediente alimentario no digestible que afecta beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon y, por lo tanto, mejora la salud del huésped" (Gibson y Roberfroid 1995). Una definición adoptada más recientemente por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) es "un ingrediente fermentado selectivamente que resulta en cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficios a la salud del huésped". (Liong, 2015).

2.3.1 Criterios para definir a un prebiótico

Para ser clasificado como un prebiótico genuino, el compuesto tiene que cumplir tres criterios (Charalampopoulos & Rastall, 2009):

1. Resistencia a la acidez gástrica, resistencia a la hidrólisis por enzimas de mamíferos y absorción gastrointestinal
2. Fermentación por la microbiota intestinal
3. Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales asociadas con la salud y el bienestar.

Dado el hecho de que en la actualidad se busca conseguir un efecto benéfico en otras áreas del huésped (además del tracto gastrointestinal), estos criterios ya no son del todo aplicable. Sin embargo, la mayoría de los prebióticos desarrollados hasta la fecha están orientados hacia el tracto gastrointestinal (Liong, 2015).

2.3.2 Tipos de prebióticos

Durante los años 70' y 80' del siglo pasado las primeras publicaciones científicas sobre oligosacáridos como prebióticos ocurrieron en Japón y fueron seguidas poco después por una serie de documentos de investigadores que examinaron, en particular, varios galacto y fructooligosacáridos. Las primeras patentes sobre métodos para la producción de oligosacáridos se produjeron en 1982, en Japón (Fox & McSweeney, 2003).

La mayoría de los prebióticos que se han desarrollado hasta ahora (y que tienen suficiente evidencia científica) son carbohidratos. Sin embargo, aunque la mayoría de los prebióticos son fibras, no todas las fibras son prebióticos.

Ejemplos de prebióticos bien establecidos son inulina y fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS); también conocidos como transgalacto-oligosacáridos (TOS) y lactulosa. Los prebióticos menos estudiados incluyen lactitol, isomalto-oligosacáridos (IMO), gluco-oligosacáridos (GI-OS), lactosucrosa, xilo-oligosacáridos (XOS), arabinoxilo-oligosacáridos (AXOS), almidón resistente, rafinosa (Gal-Glc-Fru) y estaquiosa (Gal-Gal-Glc-Fru) de soya y oligosacáridos pécticos (Fox & McSweeney, 2003).

2.3.2.1 Lactulosa

La lactulosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructosa) es un disacárido sintético que se forma a partir de una molécula de fructosa y una molécula de galactosa a través del enlace glicosídico β-1,4 (Fig. 10). Se sintetizó por primera vez en 1930 al producir una isomerización de la lactosa en lactulosa a través de la transformación de Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein en condiciones alcalinas (H. Wang *et al.*, 2013).

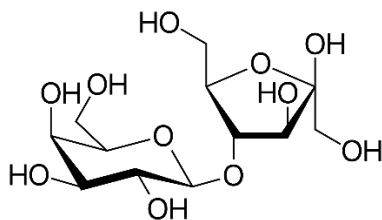


Figura 10 Estructura química de la lactulosa

En 1953, se descubrió una cepa de *Bifidobacterium bifidum* que creció solo en presencia de LH, o más específicamente en presencia de derivados de *N*-acetilglucosamina, también se identificaron requisitos específicos adicionales para el crecimiento de diferentes cepas de bifidobacterias, como el uso de la lactulosa como factor de crecimiento para las bifidobacterias en la leche infantil. Por la capacidad de la lactulosa de favorecer el crecimiento de

bifidobacterias se le reconoció como “factor bífido” en 1957 y para 1960 ya se comercializaba leche con lactulosa en Japón (Fox & McSweeney, 2003).

2.3.2.2 Inulina

La inulina es un polisacárido no digerible de fructosa (fructano) que ha sido parte de la alimentación diaria de la humanidad durante siglos. Los fructanos de tipo inulina ocurren naturalmente en muchas plantas comestibles como carbohidratos de almacenamiento. Están presentes en la cebolla, ajo, trigo, achicoria, alcachofa y plátano. (Charalampopoulos & Rastall, 2009).

A escala industrial, los fructanos de tipo inulina se obtienen de las raíces de la planta de achicoria. Después del proceso de extracción, la inulina y la oligofructosa se procesan y purifican para su uso como ingredientes alimentarios funcionales en una gran variedad de alimentos, como productos de panadería, bebidas, derivados lácteos entre otros. (Charalampopoulos & Rastall, 2009)

La inulina es un carbohidrato polidisperso que consiste principalmente en enlaces β -(2-1) fructosil-fructosa, donde puede estar presente un resto de glucosa inicial. En la inulina de achicoria, el número de unidades (n) de fructosa unidas a una glucosa terminal puede variar de 2 a 70 unidades (Fig. 11). Esto significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros.

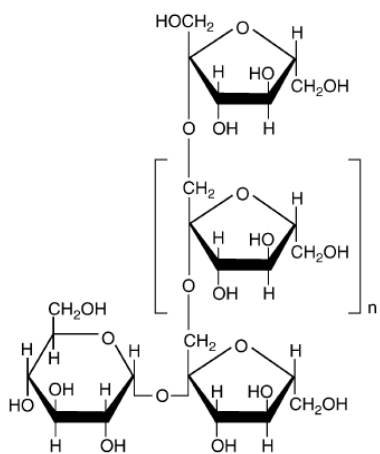


Figura 11 Estructura química de la inulina

Las longitudes de las cadenas de inulina se pueden reducir por medio de una endoinulinasa a un grado de polimerización entre 2 y 8. Al producto resultante se le denomina "oligofructosa". Los fructanos de tipo inulina tienen varios efectos fisiológicos, metabólicos, hormonales e

inmunológicos, siendo beneficiosos para la salud y el bienestar del huésped. El origen de estos efectos radica en su fermentación por la microbiota del tracto gastrointestinal inferior, produciendo un efecto prebiótico, aumentando el crecimiento y/o la actividad de bifidobacterias y lactobacilos principalmente, que son géneros bacterianos que se consideran biomarcadores de una microbiota intestinal saludable por sus múltiples beneficios a la salud (Charalampopoulos & Rastall, 2009).

2.4 BIFIDOBACTERIAS

2.4.1 La Familia Bifidobacteriaceae

Las bifidobacterias son habitantes típicos del intestino, son *Gram* positivas, anaeróbicas o facultativamente anaeróbicas (algunas especies de *Bifidobacterium* pueden tolerar el O₂ solo en presencia de CO₂). Presentan pruebas negativas para lo siguiente: indol, hidrólisis de gelatina, catalasa (excepto *B. indicum* y *B. asteroides* cuando crecen en presencia de aire) y oxidasa. Pertenecen a la familia *Bifidobacteriaceae* y al filo *Actinobacteria*, siendo esta última una de las unidades taxonómicas más grandes y pobladas del dominio *Bacteria*, y está compuesto por seis clases y 16 órdenes.

La familia consta de varillas pleomórficas que se presentan individualmente o en cadenas o grupos de muchas células. Las células no tienen cápsula y son no formadoras de esporas, no son móviles y no son filamentosas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35–39 °C y su pH óptimo al comienzo del crecimiento se sitúa entre 6.5 y 7.0. No registran crecimiento a pH inferior a 4.5 o superior a 8.5 con la excepción de *B. thermacidophilum*, que puede crecer a pH 4.0.

Poseen fructosa-6-fosfocetolasa (EC 4.1.2.2), que hidroliza la fructosa-6-fosfato en acetilfosfato y eritrosa-4-fosfato. Son quimioorganótrofas y tienen un tipo de metabolismo fermentativo. Producen ácido, pero no gas a partir de una variedad de carbohidratos.

No son patógenas, excepto las bifidobacterias aisladas de la caries dental (y probablemente involucradas en la patología de la caries) (Biavati & Mattarelli, 2006).

2.4.1.1 El género Bifidobacterium

Durante las últimas tres décadas, las bifidobacterias se han convertido en objeto de escrutinio científico porque representan un abundante componente bacteriano de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) humano, mientras que se ha reportado que son el grupo bacteriano dominante que se encuentra en la microbiota intestinal de lactantes que se alimentan de LH. También se sabe que colonizan de forma estable el TGI de otros huéspedes eucarióticos,

incluidos mamíferos, aves e insectos. Su descubrimiento ha sido atribuido a Henri Tissier quien en 1899 aisló al llamado *Bacillus bifidus* de heces de infantes alimentados con LH; las bifidobacterias se asignaron incorrectamente al género *Lactobacillus* durante gran parte del siglo XX, y solo recientemente obtuvieron una clasificación apropiada como un género separado, *Bifidobacterium*.

El género *Bifidobacterium* actualmente comprende 48 especies reconocidas, varias de las cuales se han aisladas de humanos, entre las cuales están (Pokusaeva, Fitzgerald, & van Sinderen, 2011):

- *Bifidobacterium pseudocatenulatum*
- *Bifidobacterium catenulatum*
- *Bifidobacterium adolescentis*
- *Bifidobacterium longum*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium angulatum*
- *Bifidobacterium dentium*

2.4.2 El genoma bifidobacteriano

Las bifidobacterias se han aislado de diversas fuentes que incluyen aguas residuales, productos lácteos fermentados, instalaciones de tratamiento anaeróbico de aguas residuales, entre otras. Pero la mayoría de ellas están vinculadas con el tracto alimentario de humanos, animales e insectos; (Kalia *et al.*, 2017)

La primera secuencia completa del genoma de *B. longum* subsp. *longum* fue publicado en 2002. Los genomas de algunas cepas de bifidobacterias como *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium dentium* y *Bifidobacterium breve* se han secuenciado completamente. Los genomas bifidobacterianos secuenciados completa o parcialmente varían en tamaño de 1,9 a 2,9 Mb, y se han identificado 1604 genes en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011 mientras que *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC15697 se han identificado 2588 genes (Pokusaeva *et al.*, 2011).

Arboleya *et al.* (2018) comparó los genomas completa o parcialmente secuenciados de más de 20 cepas de *B. longum*, definiendo un grupo de 1200 familias de genes que son comunes entre estos genomas, lo que representa al genoma central. Estos genes centrales, están presentes al menos una vez en cada genoma examinado, y representan aproximadamente un 33% del total de familias de genes obtenidas en dicho análisis. El 67% restante (que en total constituyen 2433 familias de genes) representan genes que forman el genoma variable o

prescindible, que consiste en genes que están presentes en algunos, pero no en todos los genomas de las bifidobacterias (Fig. 12) (Arboleya *et al.*, 2018).

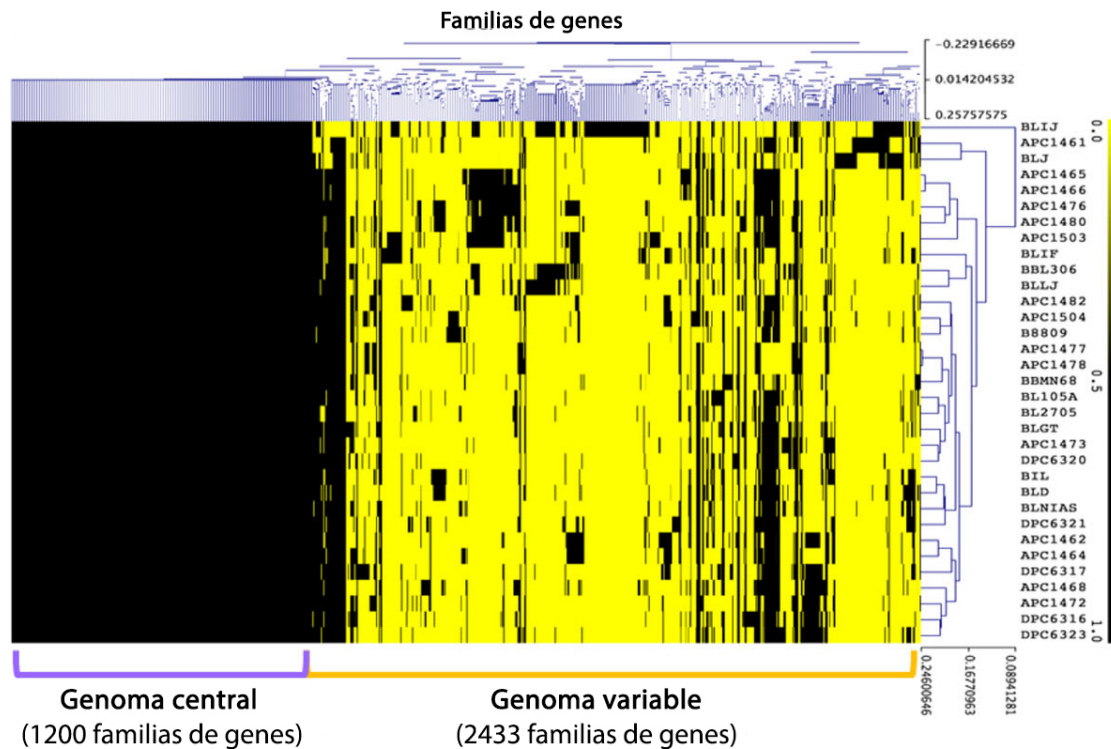


Figura 12 Mapa de calor de agrupamiento jerárquico que representa la variabilidad de *B. longum* en términos de presencia / ausencia de familias de genes (Arboleya *et al.*, 2018)

Las funciones predichas codificadas por estas secuencias del genoma bifidobacteriano han proporcionado evidencia genética de que las bifidobacterias son prototróficas y están muy bien adaptadas para la colonización del tracto gastrointestinal humano (Pokusaeva *et al.*, 2011).

2.4.3 El genoma y el metabolismo

Se predice que más del 13% de los genes presentes en los genomas bifidobacterianos están involucrados en el metabolismo de carbohidratos (Arboleya *et al.*, 2018) lo que refleja su adaptación al TGI humano, esto debido a la presencia de genes que codifican una variedad de enzimas modificadoras de carbohidratos, como glicosil-hidrolasas (GH) y transportadores de tipo ABC, permeasas y PEP-PTS (PEP: fosfoenolpiruvato; PTS: sistema de fosfotransferasa), transportadores que representan aproximadamente la mitad de los genes dedicados a la absorción de carbohidratos (Pokusaeva *et al.*, 2011).

Estas bacterias también son capaces de utilizar glicanos y glicoproteínas producidas por el huésped, por ejemplo, mucinas producidas por el huésped y liberadas en el intestino. (Kalia *et al.*, 2017) lo que las ayuda a colonizar transitoriamente el TGI. Durante la colonización, se cree que las bifidobacterias establecen un contacto inicial con la superficie del anfitrión, seguido de una adhesión más estrecha y específica (Bottacini *et al.*, 2014), que se ve favorecida gracias a que los OLH alteran las respuestas de las células epiteliales e inmunes, influyendo indirectamente al alterar las respuestas de las células del huésped, facilitando esta colonización (Bode, 2015).

2.4.4 Transporte de carbohidratos

Para el uso de carbohidratos en su metabolismo, las bifidobacterias necesitan introducirlos a la célula, lo cual realizan por dos métodos diferentes: el primero puede verse en el genoma de *B. longum* DJO10A, el cual contiene 52 genes que representan un estimado de 10 sistemas transportadores ABC, responsables de la absorción de varios carbohidratos, así como de un sistema de absorción PEP-PTS específico de glucosa. Se cree que el transporte de carbohidratos como ribosa, maltosa, lactosa, FOS, rafinosa, oligosacáridos que contienen manosa, xilosa y xilósidos es facilitado por sistemas de tipo ABC en este microorganismo, mientras que la glucosa se internaliza utilizando un PEP-PTS específico de glucosa (Fig. 13 A), para posteriormente ser hidrolizados por un conjunto de glicosil-hidrolasas intracelulares. El segundo método puede verse en *B. bifidum*, la cual cuenta con un conjunto de glicosil-hidrolasas asociadas a la membrana, con las cuales hidroliza los oligosacáridos para importarlos en fragmentos más pequeños, motivo por el cual cuenta con una menor cantidad de genes que codifica transportadores (Fig. 13 B).

Por otra parte, un genoma de *B. breve* UCC2003 contiene cuatro sistemas PEP-PTS, uno de los cuales es un sistema PTS de absorción de fructosa/glucosa, por lo que es posible ver que la capacidad de metabolizar carbohidratos particulares depende de la especie y la cepa (Pokusaeva *et al.*, 2011), en el caso particular de *B. longum*, su diversidad y capacidades para metabolizar una amplia gama de carbohidratos, considerados como el resultado de la duplicación de genes y la transferencia horizontal de genes, parecen hacerlos competidores microbianos particularmente poderosos en el complejo ambiente intestinal humano (Adak & Khan, 2019).

Garrido (2011) estudió la expresión de varios genes que codifican proteínas de unión a solutos de la familia F1 (F1SBP), que forman parte de los transportadores ABC, asociados con la importación de oligosacáridos en *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697. Se sospechaba que la producción de estas proteínas podía ser inducida por la fuente de carbono disponible en el medio. Para examinar esto, se cultivaron células de *B. longum* subsp. *infantis* en medio MRS con 2% de los siguientes carbohidratos como única fuente de carbono: lactosa, una mezcla de OLH, inulina, fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS), posteriormente se estudió el nivel de expresión relativo para cada F1SBP usando qPCR. Se encontró que algunos de los genes asociados a las F1SBP se expresaban en mayor cantidad dependiendo de la fuente de carbono utilizada (Fig. 14), en donde se muestra la expresión de estos genes cuando se utilizó inulina como fuente de carbono, en este caso en particular, la expresión de 7 de los genes se indujo a más del doble.

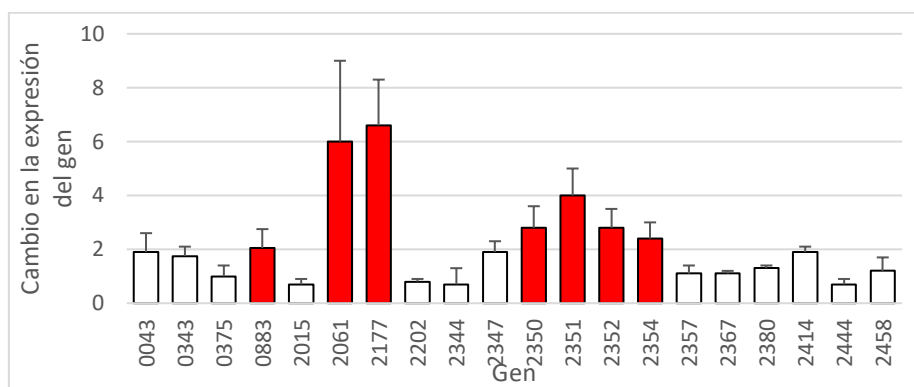


Figura 14 Expresión génica de F1SBP de *B. longum* subsp. *infantis* cultivada con inulina como única fuente de carbono (Garrido, Kim, German, Raybould, & Mills, 2011)

2.4.5 Hidrólisis de oligosacáridos

Aproximadamente el 10% de las GH totales en la bifidobacterias están presentes en la superficie extracelular, lo que les permiten digerir los glicanos complejos como almidón, glucógeno, arabino-xilo-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, así como los derivados del

huésped y de la leche extracelularmente (Singh, 2019), la presencia de estas glicosilhidrolasas asociadas a la membrana le permitiría a las bifidobacterias hidrolizar oligosacáridos más grandes, como los de la LH que pueden ser de un grado de polimerización de hasta 25 unidades, para poder ser importados mediante los diferentes sistemas de transporte y metabolizados o ser compartidos con otros microorganismos contribuyendo al mutualismo (Singh, 2019).

LoCasio *et al.* (2009) realizaron un perfil de consumo de OLH de doce cepas de bifidobacterias cultivadas en un medio que contenía 1.6% p/v de OLH. El consumo de OLH se representó como la diferencia porcentual en la abundancia de OLH entre el inicio y el final de la fermentación, que se definió como el inicio de la fase estacionaria, encontrando que *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 prefería consumir oligosacáridos con un grado de polimerización de hasta 8 unidades, mientras que *B. longum* ATC15707 mostró una mayor preferencia por oligosacáridos con un grado de polimerización de 4 y 8, y *B. bifidum* mostró una preferencia más homogénea sobre el grado de polimerización (Fig. 15).

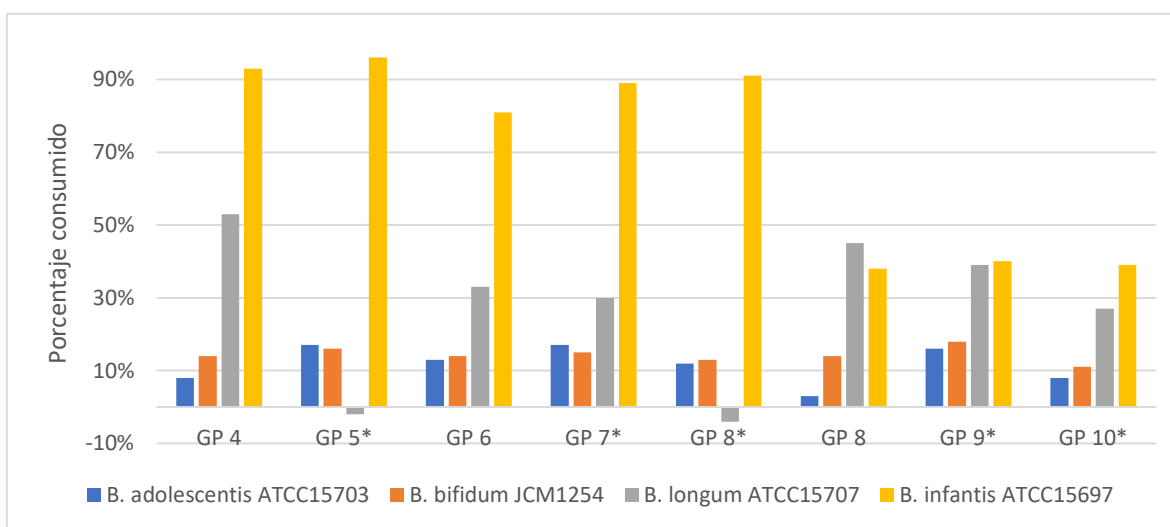


Figura 15 Perfiles de consumo de OLH en bifidobacterias, los identificados con un asterisco son oligosacáridos fucosilados. (GP: grado de polimerización). (LoCasio *et al.*, 2009)

En general, las bacterias intestinales degradan los carbohidratos poliméricos en oligosacáridos de bajo peso molecular (como pudo verse en el perfil de consumo de oligosacáridos), que posteriormente pueden degradarse en monosacáridos mediante el uso de una amplia gama de enzimas que degradan los carbohidratos. En el caso de las bifidobacterias, estos monosacáridos se convierten en intermedios de la vía de fermentación de hexosa, también llamada derivación de fructosa-6-fosfato o derivación 'bívida', y finalmente se convierten en ácidos grasos de cadena corta y otros compuestos orgánicos, algunos de los cuales pueden

ser beneficiosos para el huésped. La enzima fructosa-6-fosfocetolasa (EC 4.1.2.2) juega un papel clave. Esta enzima se considera un marcador taxonómico para la familia de las *Bifidobacteriaceae* (Pokusaeva et al., 2011).

La glucosa puede ingresar directamente a la vía de la derivación bífida en la parte inicial de la glucólisis, mientras que la fucosa también ingresa directamente, pero en una etapa intermedia de la glucólisis, como puede verse en el segmento delimitado para el metabolismo de OLH de la Figura 16. Otros carbohidratos se degradan mediante la intervención de glicosil-hidrolasas adicionales, según la estrategia de adaptación y la disponibilidad de la fuente de carbono.

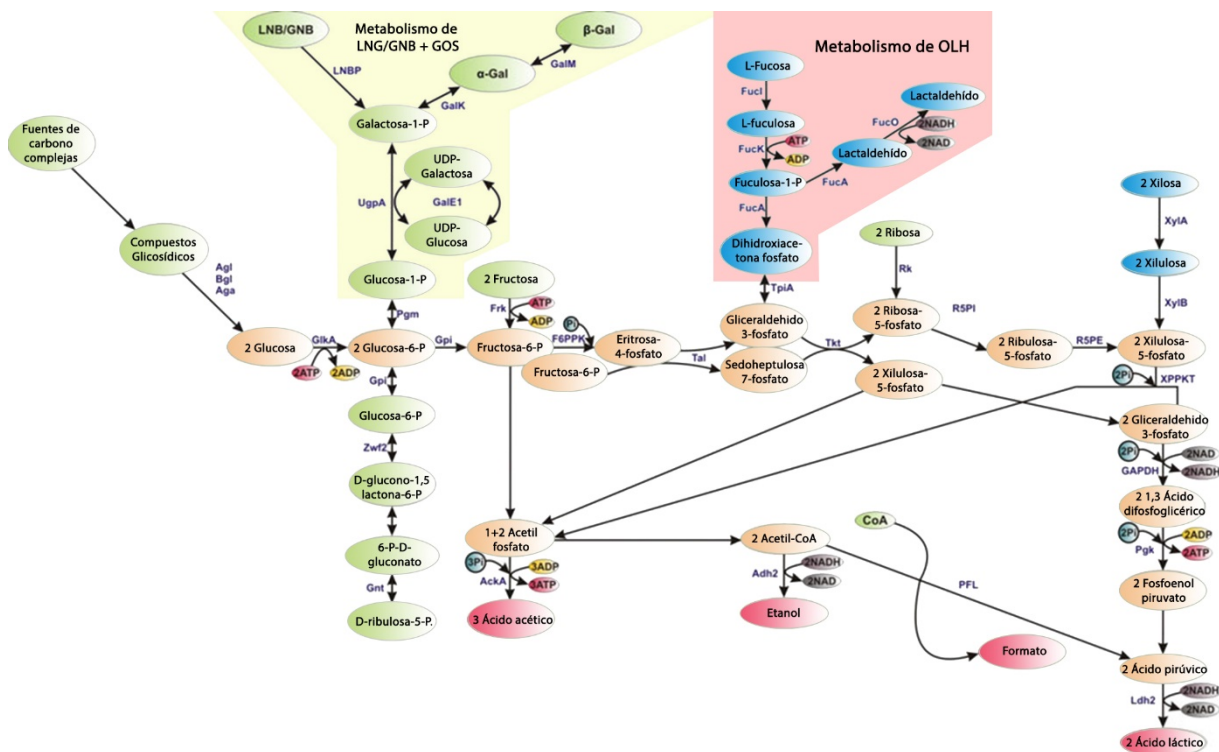


Figura 16 Vía de la derivación bífida (Pokusaeva et al., 2011)

Para el metabolismo de OLH, el genoma de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 codifica cuatro glicosil-hidrolasas: fucosidasa, sialidasa, galactosidasa y hexosaminidasa, así como transportes específicos para la utilización de OLH. Por su parte, *B. bifidum* PRL2010 cuenta con las siguientes enzimas en la parte externa de la célula: fucosidasa, la sialidasa y una lacto-*N*-biosidasa, para la degradación extracelular de OLH (Singh, 2019). Es probable que estas cepas de bifidobacterias que son las primeras en establecerse en el tracto gastrointestinal proporcionen una plataforma para el establecimiento exitoso de las próximas bacterias, incluidas otras cepas de bifidobacterias, cuyos instrumentos para el uso de glicanos no les

permiten alimentarse de OLH fucosilados o sialilados, pero tienen el potencial de prosperar en una dieta que contiene otros glicanos, como arabinoxilano (Pokusaeva *et al.*, 2011).

2.4.5.1 Familias de Glicosil-hidrolasas en bifidobacterias

Las glicosil-hidrolasas comprenden un amplio grupo de enzimas que catalizan la escisión glicolítica de enlaces O-glicosídicos y están involucradas en el metabolismo de carbohidratos; estas enzimas han sido objeto de diversas investigaciones durante décadas. Los genes que codifican para glicosil-hidrolasas se encuentran en casi todos los organismos vivos, con la única excepción de algunas arqueas y algunos parásitos unicelulares eucariontes.

Para sobrevivir, las bifidobacterias han desarrollado la capacidad de producir una variedad de diferentes glicosil-hidrolasas que facilitan el metabolismo de los diversos carbohidratos que se encuentran en el tracto gastrointestinal, las que se encuentran con mayor frecuencia en las diferentes especies de bifidobacterias pertenecen a la familia GH13 (α -glucosidasa y sacarosa fosforilasa), GH36 (α -galactosidasa) y GH2/42 (β -galactosidasa), pero también pueden encontrarse GH de otras familias.

Como un ejemplo de la variedad de familias de glicosil-hidrolasas que se pueden encontrar en las bifidobacterias, se tiene el trabajo de Arboleya *et al.* (2018), en el cual se comparó el genoma de 20 cepas de *B. longum* obtenidas del Instituto de Microbiomas APC, de Irlanda, encontrando que estas cepas contaban con 22 familias de GH, como puede verse en la Figura 17.

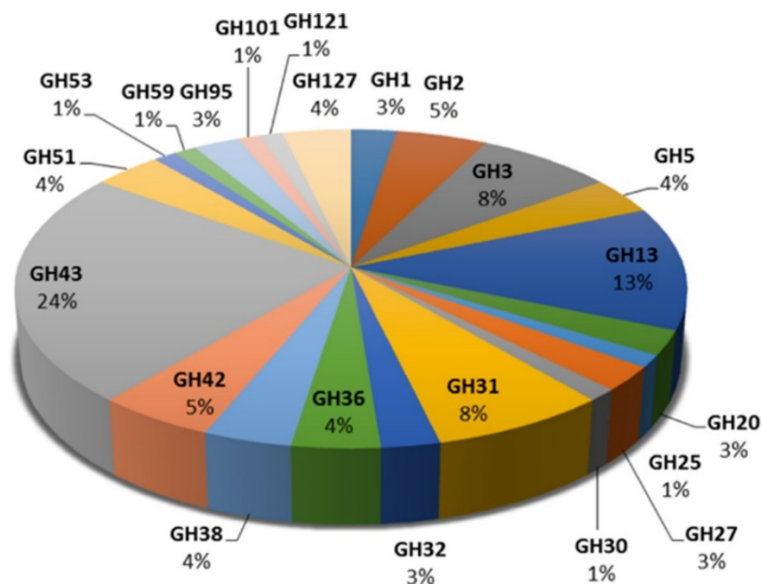


Figura 17 Familias de GH identificadas solo en genomas de *B. longum* (Arboleya *et al.*, 2018)

2.4.5.2 Glicosil-hidrolasas presentes en bifidobacterias

4.5.2.1 Galactosidasas

Las β -galactosidasas catalizan la liberación de residuos terminales de β -galactosilo, lo que resulta en hidrólisis o trans-galactosilación. Sin embargo, algunas β -galactosidasas utilizadas para la trans-galactosilación también pueden actuar como β -glucosidasas catalizando la transglucosilación.

Además, la síntesis catalizada por β -galactosidasa de oligosacáridos *N*-sustituidos tales como *N*-acetil-D-lactosamina (LacNAc) o lacto-*N*-biosa puede ayudar en la síntesis de estructuras similares a OLH, también se han utilizado β -galactosidasas para la síntesis de GOS prebióticos durante décadas (Zeuner *et al.*, 2014).

2.4.5.2.2 Fructofuranosidasas

Las fructofuranosidasas bifidobacterianas son glicosil-hidrolasas intracelulares involucradas en la hidrólisis del enlace glicosídico β -2,1 entre glucosa-fructosa y/o restos de fructosa-fructosa presentes en fructooligosacáridos, generalmente provenientes de fuentes vegetales. El análisis comparativo del genoma bifidobacteriano sugiere que la mayoría de las secuencias de *Bifidobacterium* codifican una o a veces dos β -fructofuranosidasas que exhiben actividad hidrolítica hacia diversos fructooligosacáridos, sacarosa e inulina. (Pokusaeva *et al.*, 2011)

2.4.5.2.3 Sialidasas

Las sialidasas catalizan específicamente la liberación de residuos terminales de ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico) unidos a las glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos, lo que resulta en hidrólisis o trans-sialilación. Por lo general, los sustratos donantes como el ácido pNP- α -siálico (Sia- α -pNP), ácido 2'--(4-metilumbeliferil)- α -D-*N*-acetilneuramínico (Sia- α -MU), 3'-sialil-lactosa, y dímeros y polímeros de α -(2,8)-ácido siálico, así como la glicoproteína de suero de ternera fetal, se han utilizado en la transialilación (Zeuner *et al.*, 2014).

2.4.5.2.4 Fucosidasas

Las α -L-fucosidasas son glicosidasas que pueden escindir el resto terminal del α -L-fucosilo de diferentes tipos de oligosacáridos y glicoconjugados. Pertenecen a las familias 29 y 95, que difieren entre sí en el mecanismo utilizado para la catálisis de reacción hidrolítica.

Las enzimas de la familia 29 utilizan un mecanismo de retención de doble desplazamiento de dos pasos para catálisis, mientras que las glicosidasas de la familia 95 se encuentran entre las llamadas enzimas inversoras que catalizan el proceso hidrolítico por mecanismo de

desplazamiento directo. El mecanismo básico de reacción de enzimas de inversión y de retención puede verse en la Figura 18 (Benešová *et al.*, 2015).

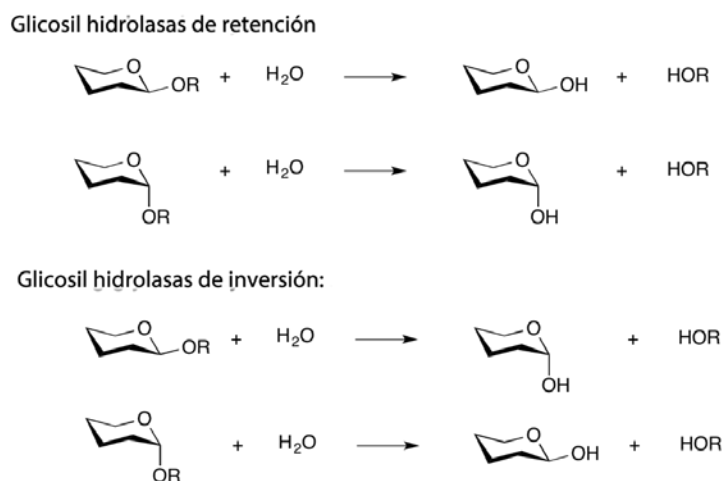


Figura 18 Mecanismo básico de retención e inversión de las glicosil-hidrolasas

El diagrama de reacción simplificado de una enzima α -L-fucosidasa puede verse en la Figura 19, donde se forma un intermediario α -L-fucosilo enzima, el cual puede sufrir un ataque nucleofílico por parte del agua, produciendo la hidrólisis del residuo de fucosa del donador de α -L-fucosilo. Si otro nucleófilo ataca al intermediario, se produce transglicosilación. Para algunas α -L-fucosidasas, el sustrato donador también puede funcionar como aceptor, dando como resultado la autocondensación del donante (Zeuner *et al.*, 2014).

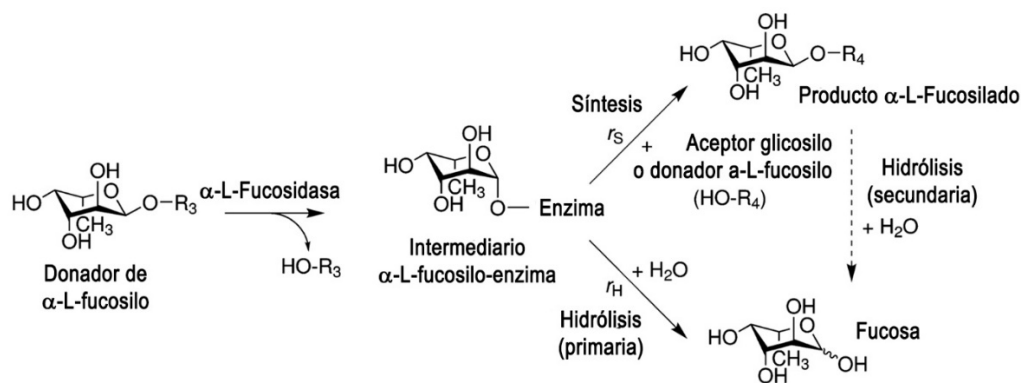


Figura 19 Diagrama de reacción de la α -L-fucosidasa

2.4.5.2.4.1 Origen y actividad de α -L-fucosidasas

Como se pudo ver en el perfil de consumo de OLH en la Sección 4.5, entre los OLH específicos consumidos por *B. longum* subsp. *infantis* se encuentran varios oligosacáridos fucosilados de bajo grado de polimerización. La base fisiológica para el metabolismo de los OLH fucosilados se evidencia por varias α -L-fucosidasas que residen dentro de un conjunto de genes dedicados al metabolismo de OLH, genes que codifican para α -L-fucosidasas de la familia GH29 y GH95 y que difieren en la especificidad del sustrato (1,2- α -L-fucosidasa y 1,3/1,4- α -L-fucosidasa), esto sugiere que la presencia simultánea de ambas isoenzimas es esencial para la degradación completa de los OLH. (Benešová *et al.*, 2015).

B. longum subsp. *infantis* se caracteriza por tener una actividad fucolítica α -1-2 relativamente fuerte, un rasgo que ahora se sabe está codificado por el gen *Blon_2335*, el cual se identificó primero como α -1,2- α -L-fucosidasa (*afcA*) en *B. bifidum*. Además de *B. bifidum* y *B. longum* subs. *infantis*, los genomas de *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* incluyen homólogos de *afcA*, que son altamente similares. Es notable que estas cuatro bifidobacterias de tipo infantil posean homólogos de *afcA* y que no se han encontrado en otras bifidobacterias que usualmente colonizan adultos (Sela *et al.*, 2012).

En un experimento realizado por Sela *et al.* (2012) se estudió la inducción de la expresión de la enzima α -L-fucosidasa con diferentes oligosacáridos y se examinaron los perfiles de expresión de cinco fucosidasas de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. Con la excepción de una de ellas, la correspondiente al gen *Blon_0248*, todas las fucosidasas se indujeron al menos al doble, en relación con la expresión cuando se utilizó lactosa como fuente de carbono (Fig. 20). Un patrón similar se ha observado en las proteínas de unión a solutos que interactúan con OLH, que han sido inducidas en bifidobacterias que subsisten con inulina, como puede verse en la Sección 4.4.

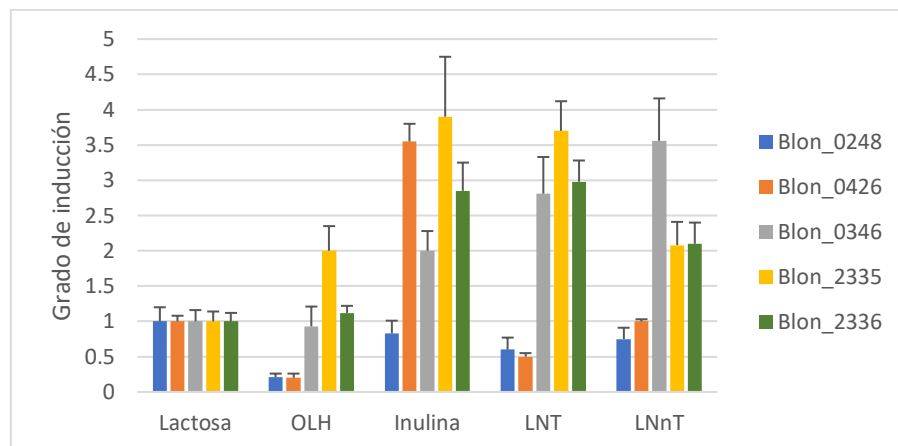


Figura 20 Expresión de gen fucosidasa ATCC 15697 durante la fermentación de carbohidratos. La expresión génica se calculó en relación con los niveles cuando se cultivó en lactosa como única fuente de carbono (Sela *et al.*, 2012)

2.5 SÍNTESIS DE OLH

Un desafío importante en la investigación de las propiedades de los OLH y de su uso industrial es el suministro limitado de leche humana y la dificultad para aislarse de otras fuentes de leche, porque la mayoría de los OLH se encuentran solo en la leche humana. Las concentraciones de oligosacáridos en la leche de la mayoría de los otros mamíferos son mucho más bajas, y las estructuras son menos complejas y menos diversas (Bode *et al.*, 2016). Por lo tanto, la síntesis química y biotecnológica de los OLH se ha convertido en un campo de gran interés (Enam & Mansell, 2019).

Entre 2005 y 2012, la empresa Glycom A/S produjo 2'-FL y lacto-*N*-neotetraosa (LNnT) a gran escala mediante síntesis química para programas preclínicos y clínicos. Sin embargo, la complejidad, la disponibilidad limitada y el costo de las materias primas hacen que la síntesis química de OLH sea costosa para las aplicaciones lácteas y nutricionales. Otros laboratorios como Abbott Laboratories y Kyowa Hakko Kogyo Co., explotaron la capacidad biosintética de las células microbianas mediante el acoplamiento de dos o más extractos celulares (una mezcla obtenida de la ruptura de las células que contiene los organelos celulares, restos de membranas, núcleos, etc.) obtenidos al sobreexpresar enzimas en microorganismos recombinantes, produciendo con éxito LNnT y oligosacáridos fucosilados. (Bych *et al.*, 2019). Otra metodología para producir OLH es la síntesis quimioenzimática, donde glicosiltransferasas se expresan de forma recombinante y se usan junto con sustratos y aceptores donadores activados por nucleótidos. Se ha aplicado para generar bibliotecas de OLH estructuralmente diversos para fines de investigación, sin embargo, la síntesis

quimioenzimática no ha logrado entregar volúmenes comerciales de OLH complejos (Bych *et al.*, 2019).

Aún no se han establecido métodos de síntesis efectivos para la producción en gran escala de FUCOS. Se han ideado métodos de síntesis química para sintetizar FUCOS, incluidos 2-fucosil lactosa (2'-FL) y 2-fucosil galactosa (2'-FG), sin embargo, estos métodos requieren el uso de productos químicos tóxicos, como metanol, piridina o tolueno, a altas temperaturas y generan subproductos estructuralmente similares que son difíciles de separar, por lo tanto, para producir FUCOS estructuralmente correctos, la síntesis enzimática podría ser más favorable que la síntesis química. (Yun *et al.*, 2019)

2.5.1 Síntesis química

Una de las vías de síntesis de OLH es la síntesis química, con la cual se han sintetizado más de 15 estructuras diferentes que van desde tetrasacáridos a octasacáridos, en los cuales la cadena principal de OLH ha sido ensamblada por métodos en fase sólida, se tienen algunos ejemplos de los oligosacáridos sintetizados mediante síntesis química en la Figura 21 (Sprenger *et al.*, 2017).

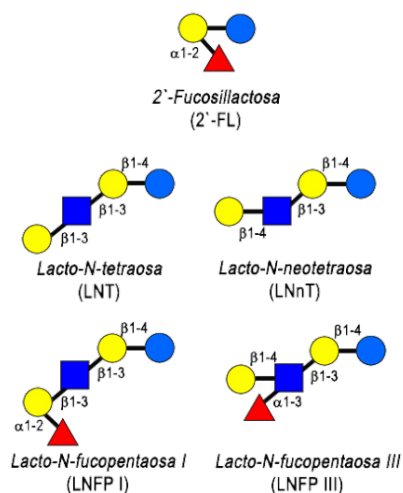


Figura 21 Ejemplos de algunos oligosacáridos sintetizados mediante síntesis química

El ensamblaje de carbohidratos complejos es un desafío debido a las demandas combinadas de procedimientos elaborados para la preparación de donadores y aceptores de glicosilo y los requisitos de regio y estereoselectividad en la glicosilación. Esta labor implica la preparación de unidades de monosacárido selectivamente protegidos, una con un grupo hidroxilo libre estratégicamente posicionado (un aceptor nucleofílico) y otro que tiene un grupo lábil saliente

en el carbono anomérico que actúa como un donante en la reacción de glicosilación. Los grupos hidroxilo restantes deben protegerse de modo que el par donante-aceptor pueda combinarse y conseguir una mayor desprotección y glicosilación o modificaciones del grupo funcional. Las estrategias de glicosilación quimioselectiva, ortogonal e iterativa, que explotan las reactividades diferenciales de los grupos salientes anoméricos, permiten que varios donantes de glicosilo seleccionados reaccionen en un orden específico, dando como resultado un único producto de oligosacárido (Enam & Mansell, 2019) (Fig. 22).

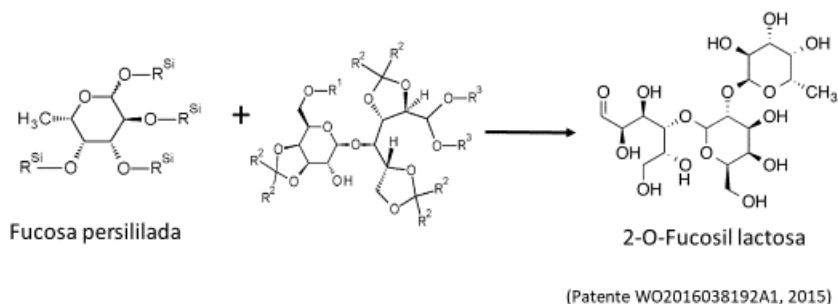


Figura 22 Ejemplo de síntesis química

Sin embargo, la naturaleza compleja y dinámica de los glicanos hace que su síntesis a través de métodos químicos tradicionales sea desafiante, además la formación de una mezcla de anómeros implica pasos de separación adicional (Enam & Mansell, 2019).

En el caso de OLH fucosilados, ha sido posible producir fucosilactosa y difucosilactosa, LNnT y LNT, LNFP I, y lacto-*N*-fucoPentaosa III. La sialilación química, que conduce a la producción de OLH ácidos, se considera una acción de glucosilación muy desafiante debido al centro anomérico terciario impedido en el ácido siálico (Sprenger *et al.*, 2017).

2.5.2 Síntesis enzimática

El enfoque biocatalítico evita algunos de los desafíos que enfrenta la síntesis química. El uso de enzimas como catalizadores implica que la regioselectividad y la estereoespecificidad están mejor controladas y hay menos pasos involucrados, lo que podría hacer el proceso más rápido y más rentable (Enam & Mansell, 2019).

Para la síntesis enzimática de OLH, se han utilizado enzimas de varios grupos, como glicosiltransferasas, glicosintasas, transglicosidasas y glicosidasas. Las glicosiltransferasas catalizan la síntesis de di, oligo o polisacáridos mediante la transferencia de grupos de carbohidratos de sustratos de donantes activados a sustratos aceptores. En las bacterias, las glicosiltransferasas están implicadas en la biosíntesis de los sacáridos de la superficie celular,

como de otros polisacáridos extracelulares. Las glicosiltransferasas de esas bacterias han demostrado ser una herramienta adecuada para la síntesis de OLH debido a su promiscuidad con los sustratos (Sprenger *et al.*, 2017).

Estas enzimas tienen la desventaja de producirse en algunos casos, en géneros patógenos como *Helicobacter*, *Neisseria* o *Pasteurella*, lo que limita su disponibilidad y por lo tanto, se puede optar por su uso como enzimas recombinantes por expresión de los genes correspondientes en cepas de *E. coli* (Sprenger *et al.*, 2017), lo que implica el aislamiento o producción recombinante de enzimas (Enam & Mansell, 2019).

Una alternativa para la síntesis enzimática es el diseño de enzimas mediante biología molecular, con la finalidad de modificar sus características, como lo realizaron Zeuner *et al.* (2018), diseñando una α -1,3 / 4-L-fucosidasa que reducía su actividad hidrolítica y mejoró la actividad de transfucosilación para lograr rendimientos tres veces mayores en su producto fucosilado (Enam & Mansell, 2019).

En la Tabla 1 se muestran α -L-fucosidasas microbianas y se indica la proporción de aceptor/donador (A:D), productos y rendimiento total de transfucosilación.

Tabla 1 α -L-fucosidasas microbianas empleadas en la reacción de transfucosilación

α -L-Fucosidasa	Donador	Aceptor	Productos	A/D	Rendimiento (%)
<i>Alcaligenes sp.</i>	pNP-Fucosa	Lac	Fuc- α (1,3')-Lac	19	34
<i>Ampullaria</i>	pNP-Fucosa	Gal- β -O-Me	Fuc- α (1,6)-Gal- β -O-Me	10	14
<i>Aspergillus niger</i>	pNP-Fucosa	GlcNAc	Fuc- α (1,3)-GlcNAc	5	24
<i>Coryne-bacterium sp.</i>	pNP-Fucosa	Gal	Fuc- α (1,2)-Gal	10	18
<i>Lactobacillus casei</i> <i>AlfB</i>	pNP-Fucosa	GlcNAc	Fuc- α (1,3)-GlcNAc	4	23
<i>Lactobacillus casei</i> <i>AlfC</i>	pNP-Fucosa	GlcNAc	Fuc- α (1,6)-GlcNAc	4	56

<i>Penicillium multicolor</i>	pNP-Fucosa		Glc	Fuc- α (1,3)-Glc	6	28
				Fuc- α (1,3)-Fuc- α -pNP		
<i>Thermotoga maritima</i>	pNP-Fucosa	-	Gal- β -pNP	Fuc- α (1,2)-Gal- β -pNP	5	17
				Fuc- α (1,6)-Gal- β -pNP		
<i>Thermotoga maritima</i> <i>mutante P25</i>	pNP-Fucosa		Gal- β -pNP	Fuc- α (1,2)-Gal- β -pNP	1	67
				Fuc- α (1,3)-Fuc- α -pNP		

Recuperado de (Yu et al., 2013)

2.5.3 Síntesis mediante ingeniería metabólica de microorganismos

La mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas tienen una escala relativamente pequeña, debido a que estos sistemas enzimáticos están limitados en su operación por la necesidad de sustratos de donantes específicamente sintetizados o compuestos de alta energía que son costosos.

Para construir estructuras OLH más complejas de diferentes longitudes, enlaces o ramificaciones, es deseable una estrategia quimioenzimática, en la que un aceptor sintetizado químicamente se modifica mediante pasos enzimáticos. Este método se utilizó para sintetizar lacto-N-neotetraosa en dos pasos a través de azido alquil-lactósido usando glicosiltransferasas (Enam & Mansell, 2019).

Recientemente, los investigadores han utilizado la maquinaria metabólica de los microorganismos para producir 2'-fucosil-lactosa (Ahern et al., 2019), un ejemplo del uso de las vías metabólicas de microorganismos puede verse en la Figura 23, donde se muestran vías metabólicas diseñadas para la síntesis de fucosil-lactosa, sialil-lactosa y lacto-N-triosa. La lactosa, L-fucosa y ácido siálico son transportados a la célula por permeasas específicas LacY, FucP y NanT respectivamente. El glicerol sirve como fuente de carbono/energía. La lactosa sirve como aceptor de sustrato y, en muchos casos, se elimina el gen lacZ para evitar que se metabolice la lactosa.

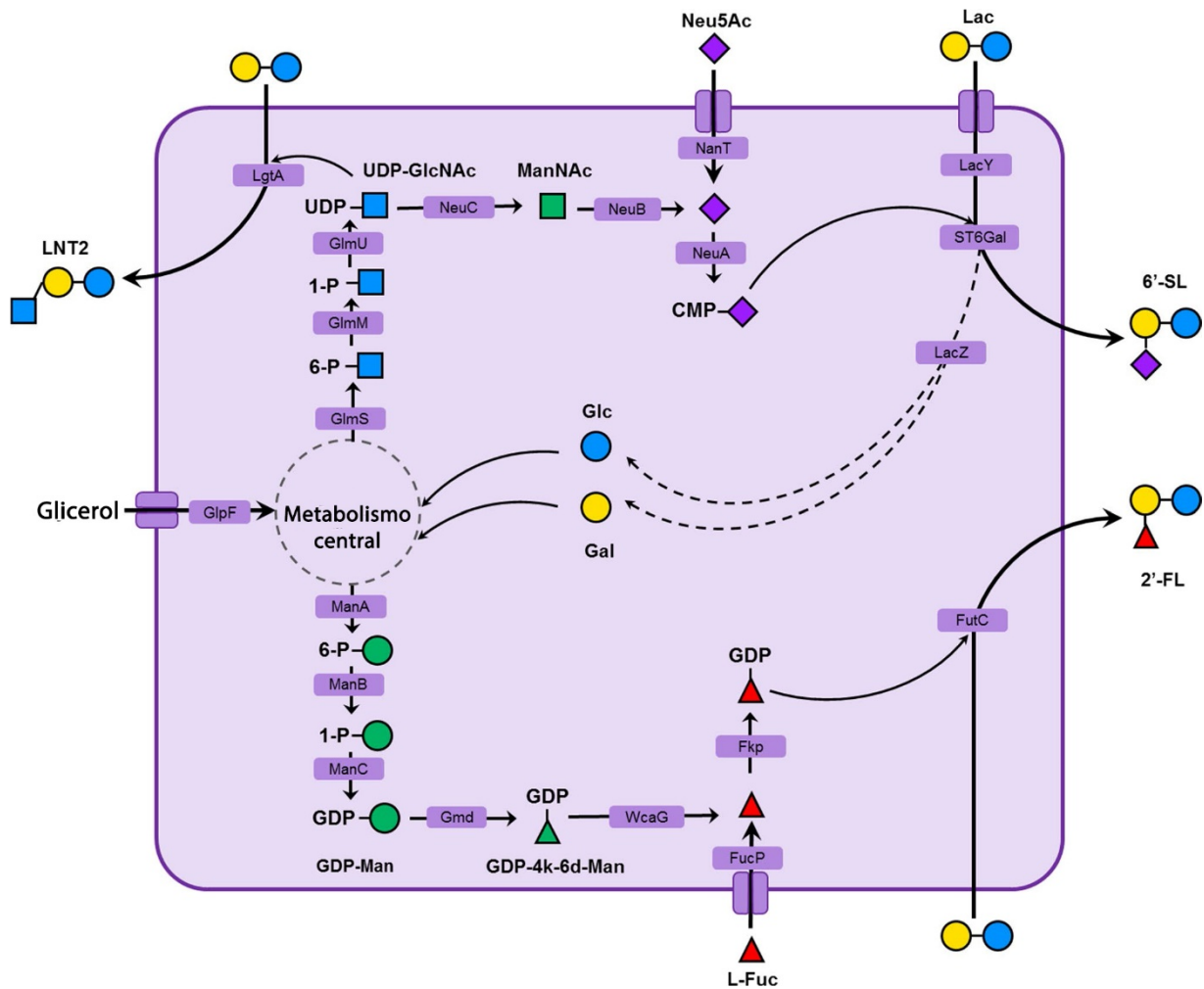


Figura 23 Ruta metabólica en una síntesis de oligosacáridos mediante ingeniería metabólica de microorganismos (Enam & Mansell, 2019)

Sin embargo, este sistema cuenta con inconvenientes, como la posibilidad de degradación del producto y/o el sustrato. Además, las regulaciones metabólicas no pueden ignorarse cuando la producción de energía y la síntesis de oligosacáridos están acopladas. La degradación del sustrato/producto podría eliminarse mediante la eliminación de genes, y la regulación metabólica no deseada puede eliminarse de manera similar siempre que los genes asociados con los mecanismos se entiendan claramente, lo cual no siempre es posible al tratarse de “cajas negras” algunas veces. Aunque se cuenta con técnicas de manipulación genética, el resultado de una modificación genética tan precisa sigue siendo impredecible debido a la complejidad de los mecanismos de regulación y de las redes metabólicas (Chen, 2018).

Las enzimas y los catalizadores de células completas tienen distintas ventajas y desventajas en la síntesis de oligosacáridos. Estas ventajas vienen con un conjunto único de desafíos. Los sistemas de enzimas son más flexibles y se pueden unir de manera relativamente fácil para la síntesis a pequeña escala, y conducen a la diversificación de oligosacáridos naturales. La ingeniería de catalizadores de células enteras requiere un conocimiento más profundo del metabolismo y la regulación celular, mucho más allá de la cinética enzimática, y significativamente más modificación y optimización genética tanto a nivel genético como bioquímico; por lo tanto, requieren un desarrollo más largo. Sin embargo, una vez desarrollado, su uso es relativamente simple y puede utilizar sustratos más sencillos y económicos para la síntesis.

Su ventaja única en escalabilidad los hace insustituibles para la síntesis a gran escala. Por lo tanto, el uso de enzimas de células completas son biocatalizadores útiles (Chen, 2018).

2.6 PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE ENZIMAS

El uso de enzimas o células enteras para la síntesis de oligosacáridos cuenta con diferencias importantes que deben considerarse al seleccionar uno de los dos métodos. El uso de enzimas tiene ventajas sobre los biocatalizadores de células enteras, porque las condiciones de reacción y el entorno están bajo más control, parámetros como la cantidad de enzima, las concentraciones de sustrato y otros factores importantes como el pH, la temperatura y otros se pueden ajustar con precisión, mientras que utilizando células enteras esto no pudiera ser del todo posible (Chen, 2018).

Otra ventaja distintiva de las enzimas sobre el uso de células enteras es la capacidad de un sistema enzimático para generar análogos de oligosacáridos. Adicionalmente, si estas reacciones se llevaran a cabo en un sistema *in vivo*, entran en juego varios factores adicionales. El primero es el sistema de transporte para absorber sustratos no naturales, el segundo es si hay enzimas que destruyan los sustratos modificados y el tercero es si la toxicidad para las células sería un problema. En comparación, los sistemas enzimáticos son más flexibles que los catalizadores de células enteras para la síntesis de oligosacáridos no naturales.

2.6.1 Extracción de enzimas

En algunos casos, la secreción de proteínas por parte de los microorganismos hacia el medio de cultivo elimina la necesidad de lisar las células, pero en la mayoría de los casos se requiere la lisis de la membrana celular bacteriana para extraer la enzima. Existen varios métodos basados en métodos enzimáticos y medios mecánicos. Los métodos enzimáticos incluyen la

hidrólisis con lisozima, que escinde los enlaces glicosídicos en el polisacárido bacteriano de la membrana celular. La membrana citoplasmática interna también se puede romper con detergentes, presión osmótica o métodos mecánicos (Cutler, 2004)

Antes de seleccionar cualquier técnica de ruptura celular, se deben tener en cuenta varios factores: las características del producto de interés, la composición de la membrana celular y la ubicación del producto dentro de la célula (Momin, Chakraborty, & Annapure, 2018).

El tratamiento de las membranas biológicas con soluciones salinas o el cambio en el pH generalmente disocia las proteínas periféricas porque estas proteínas extrínsecas de la membrana interactúan con la superficie de la membrana principalmente a través de enlaces electrostáticos y de hidrógeno. Las proteínas integrales de membrana que poseen superficies hidrofóbicas están más fuertemente asociadas con la bicapa y estas proteínas intrínsecas se extienden a través o se insertan parcialmente en la bicapa lipídica. La extracción de proteínas integrales de membrana se logra comúnmente solubilizando la fracción de membrana que contiene proteínas usando una variedad de detergentes (Cutler, 2004)

Debido a que las proteínas de membrana periférica se extraen mediante tratamientos relativamente suaves, se debe tener cuidado de no liberar parcialmente estas proteínas de membrana accidentalmente durante los procedimientos de fraccionamiento subcelular antes de la purificación. El aislamiento de una forma soluble de una proteína de membrana extrínseca generalmente se logra mediante una técnica única o combinaciones de procedimientos de extracción suaves que dependen de las propiedades particulares de la proteína bajo investigación y del material de partida (Cutler, 2004).

La siguiente lista resume los procedimientos comúnmente utilizados para la extracción de proteínas de membrana periférica (Cutler, 2004):

- Tratamiento con tampones alcalinos (pH 8.0–12.0).
- Tratamiento con tampones ácidos (pH 3.0–5.0).
- Uso de quelantes metálicos (10 mM EGTA o EDTA).
- Tratamiento con alta fuerza iónica (1 M NaCl o KCl).
- Tratamiento con agentes desnaturizantes (urea).
- Tratamiento con disolventes orgánicos (butanol).
- Sonicación de fracciones de membrana.

Los métodos de ruptura celular comúnmente utilizados son molino de cuentas, sonicación, prensa francesa, homogeneizadores de alta presión (HPH), lisis osmótica y química. Otros métodos potenciales son la extracción asistida por enzimas que facilita la posibilidad de completar en poco tiempo, con una temperatura más baja, una menor utilización de la energía

y un alto rendimiento de extracción. Por otro lado, la enzima agregada puede implicar un costo adicional asociado y complicar el proceso de purificación de los metabolitos deseados. Sin embargo, los métodos mecánicos han recibido mayor atención hacia el procesamiento a gran escala.

2.6.2 Uso de detergentes

La extracción de proteínas integrales de membrana se logra más convenientemente mediante el uso de detergentes. Idealmente, el detergente de elección no solo debería estar disponible en forma pura, sino que también debería solubilizar suficientemente la proteína de membrana bajo investigación sin desnaturalizarla irreversiblemente. Además, la fácil eliminación del exceso de detergente de la fracción de proteína solubilizada es un criterio adicional para la elección del detergente. Debido a que la extracción inicial de proteínas de membrana intrínsecas generalmente involucra altas concentraciones de detergente, el exceso de detergente debe eliminarse o cambiarse por otro tipo de detergente en etapas posteriores de los procedimientos preparativos o analíticos que involucran la fracción de proteína solubilizada. (Cutler, 2004)

Una estimación rápida y útil de la concentración de proteína consiste en leer la densidad óptica a 280 nm usando espectrofotometría ultravioleta con celdas de cuarzo. Las proteínas absorben a 280 nm debido a la presencia de residuos de tirosina y triptófano. Pueden presentarse interferencias por otras moléculas; por ejemplo, ácidos nucleicos que absorben en el mismo rango y algunos detergentes comúnmente utilizados, como el Triton X-100, es por esto que el uso de detergentes no siempre es deseable y hay que considerar el buffer que se utiliza (Rosenberg, 2005).

2.6.3 Métodos mecánicos de lisis celular

2.6.3.1 Molino con perlas de vidrio

La homogeneización empleando un molino con perlas de vidrio es un método de lisis que funciona bien con células que son difíciles de alterar, como las levaduras, las esporas, las bacterias y el tejido vegetal. En este método, una gran cantidad de pequeñas perlas de vidrio se agitan vigorosamente con el material de partida a 3000-6000 oscilaciones/min. La interrupción se produce por una acción de cizallamiento y aplastamiento cuando las perlas chocan con las células. (Rosenberg, 2005).

2.6.3.2 Homogenizadores de alta presión

Se han utilizado homogeneizadores de alta presión para romper las células microbianas. Este tipo de homogeneizador induce la lisis celular al forzar las suspensiones celulares a través de un orificio estrecho a alta presión. Las células se cortan a medida que pasan a través del orificio (Rosenberg, 2005).

2.6.3.3 Congelación y descongelación

Las células que tienen paredes celulares rígidas a veces pueden romperse por varios ciclos de congelación a -20°C a -30°C y descongelación. La formación de grandes cristales de hielo sirve para romper la estructura de la membrana intracelular. Las ventajas de este método son que puede ampliarse o reducirse, es económico y no requiere ningún equipo especial (Rosenberg, 2005).

2.6.3.4 Sonicación

La sonicación, utiliza frecuencias normalmente en el rango de 20–100 kHz (generalmente menos de 1 MHz). El ultrasonido de baja frecuencia y alta potencia tiene suficiente energía para romper los enlaces intermoleculares; además, las intensidades de energía superiores a 10 Wcm^2 generarán efectos de cavitación, que se sabe alteran algunas propiedades físicas, además de mejorar o modificar muchas reacciones químicas (Brennan, 2006).

La cavitación se produce cuando el ultrasonido pasa a través de un medio líquido, lo que causa expansión y compresión de burbujas. Si las ondas de ultrasonido son de amplitud suficientemente alta, se producen burbujas. Estas burbujas colapsan con diferentes intensidades y pueden incluir fuerzas de corte generadas durante el movimiento de las burbujas o cambios repentinos de temperatura y presión localizados causados por el colapso de la burbuja (Fig. 24), si las burbujas producidas son del tamaño correcto pueden producir lisis celular (Brennan, 2006).

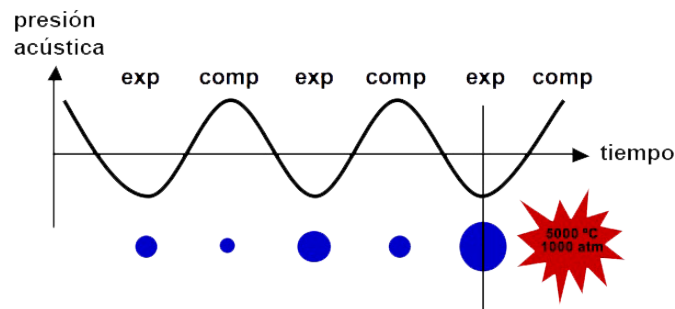


Figura 24 Cavitación producida por ondas de ultrasonido

El uso del ultrasonido resulta conveniente por su capacidad para regular la intensidad del tratamiento, permite aplicar un tratamiento suave para liberar enzimas periféricas de la membrana reduciendo la lisis celular, evitando la liberación de contenido intracelular que puede resultar inconveniente en etapas posteriores de purificación. Además se puede emplear en volúmenes diferentes e incluso en sistemas continuos, permitiendo el escalamiento del proceso.

2.6.3.4.1 Factores involucrados en la sonicación

Una de las variables que se puede controlar para aplicar el tratamiento de ultrasonido deseado, es la frecuencia de la onda sonora, ya que influye en el tamaño de la burbuja. A frecuencias más bajas, como 20 kHz, las burbujas producidas son de mayor tamaño y cuando colapsan se producen energías más altas. A frecuencias más altas, la formación de burbujas se vuelve más difícil y, en frecuencias superiores a 2,5 MHz, no se produce cavitación. La amplitud de la onda también influye en la intensidad de la cavitación. Si se requiere una alta intensidad, entonces es necesaria una alta amplitud (Brennan, 2006).

La intensidad del colapso de la burbuja también depende de factores como la temperatura del medio de tratamiento, la viscosidad y la frecuencia del ultrasonido. A medida que aumenta la temperatura, las burbujas de cavitación se desarrollan más rápidamente, pero la intensidad del colapso se reduce. Se cree que esto se debe a un aumento en la presión de vapor, que se compensa con una disminución en la resistencia a la tracción. Esto hace que la cavitación sea menos intensa y, por lo tanto, menos efectiva a medida que aumenta la temperatura (G. Brennan J., 2006). La energía aplicada debe ser lo suficientemente grande como para romper las membranas o paredes celulares, pero lo suficientemente suave como para evitar dañar física o químicamente el contenido celular (Sonics & Materials, Inc., 2004).

Los microorganismos difieren mucho en su sensibilidad a la desintegración ultrasónica. Por ejemplo, los que se desintegran más fácilmente son los bacilos, mientras que los cocos son mucho más resistentes. Las levaduras, las bacterias *Gram* positivas y, en menor medida, las bacterias *Gram* negativas tienen membranas celulares considerablemente más duras en comparación con las células animales, y requieren un poder relativamente alto para la disrupción celular. Las bacterias son extremadamente diversas; por lo tanto, es difícil hacer una recomendación para todas las bacterias, el nivel de intensidad que debe usarse depende de la aplicación; una alta intensidad para la lisis celular pudiera no ser lo más recomendable cuando la liberación de algunos componentes intracelulares debe ser evitada, como en el caso de la extracción de organelos celulares (Sonics & Materials, Inc.).

Cada aplicación requiere su propio conjunto de parámetros de procesamiento, debido a la variación en el volumen y la composición, la amplitud óptima solo puede determinarse

empíricamente. Al procesar una nueva muestra, se recomienda establecer primero la amplitud al 50% y luego aumentar o disminuir según sea necesario (Sonics & Materials, Inc.).

Antes de la sonicación, las células pueden tratarse con varios agentes para ayudar al proceso de interrupción. La lisis se puede promover suspendiendo las células en un buffer hipotónico, lo que hace que se hinchen y exploten más fácilmente por cizallamiento físico. Alternativamente, el procesamiento se puede acelerar tratando células duras con perlas de vidrio para facilitar el aplastamiento de las membranas celulares (Sonics & Materials, Inc.).

La sonicación es adecuada para purificaciones a menor escala, pero la generación de calor durante la sonicación puede ser difícil de controlar y puede causar la desnaturalización de las proteínas (Cutler, 2004).

2.6.3.4.2 Efecto de la sonicación sobre la actividad enzimática

A nivel molecular, el ultrasonido puede proporcionar efectos promotores o dañinos sobre enzimas, sustratos, reacciones entre enzimas y sustratos y sus alrededores. Bajo condiciones de baja intensidad y frecuencia adecuada, el ultrasonido genera cavitación y efecto de oscilación mecánica. Cambia la conformación de la enzima para acelerar el contacto entre la enzima y el sustrato. Así se promueve la actividad biológica de las enzimas. Además, el ultrasonido puede alterar las características de los sustratos, reacciones entre enzimas y sustratos. Incluso ayuda a proporcionar un entorno óptimo para las reacciones (Huang *et al.*, 2017). Ma *et al.* (2011) exploraron los efectos del ultrasonido sobre la actividad de alcalasa. Descubrieron que el ultrasonido tenía efectos sobre la actividad de esta enzima, la mayor actividad se logró cuando se trató con ultrasonido a 80 W durante 4 min, incrementando la actividad enzimática 5,8% en comparación con el control. Además, el tratamiento ultrasónico aumentó el número de α -hélices en un 5,2%, sugiriendo que estas alteraciones hicieron que la enzima exhibiera más regularidad y flexibilidad, contribuyendo a mejorar la actividad enzimática (Huang *et al.*, 2017). En un estudio en donde se aplicó ultrasonido a una leche fermentada por bifidobacterias se encontró que la sonicación podría acelerar la hidrólisis de lactosa y la transgalactosilación producida por bifidobacterias en la leche, equilibrando la proporción de acetato a lactato y la proporción de acetato y propionato a lactato, para la obtención de productos bajos en lactosa y altos en oligosacáridos (Nguyen, Lee, & Zhou, 2012).

2.6.4 Consideraciones en la extracción de enzimas

2.6.4.1 pH

El control del pH es una consideración central en el manejo de enzimas, y esto requiere el uso de soluciones amortiguadoras. Además, un programa de purificación de enzimas puede contener varios pasos en los que se utilicen buffers de diferentes valores de pH y fuerzas iónicas. Por lo tanto, es necesario tener métodos disponibles para cambiar los buffers.

Para el uso de buffers en la extracción de enzimas hay que tomar en cuenta lo siguiente:

- El pH deseado: el pKa del buffer debe estar lo más cerca posible y no fuera del rango de pH.
- El pH del buffer debe cambiar lo menos posible con la temperatura, con la dilución y con la sal neutra añadida.
- El buffer debe ser químicamente no reactivo.
- El buffer no debe absorber la luz a 280 nm, particularmente si se va a utilizar para procedimientos cromatográficos donde el monitoreo de la columna generalmente se llevará a cabo mediante mediciones de absorbancia.
- Para la cromatografía de intercambio iónico catiónico, se debe usar un tampón aniónico y viceversa.
- Buffers que podrían interactuar con los componentes de la mezcla de proteínas (por ejemplo, borato con glicoproteínas) deben evitarse.

2.6.4.2 Estabilidad de enzimas extraídas

La estabilidad de enzimas y proteínas contra la inactivación irreversible es una preocupación importante. Minimizar la inactivación de proteínas es una parte crucial de la purificación y almacenamiento de la proteína objetivo. La inactivación irreversible no es solo una función de agentes externos como el calor, los detergentes o el pH, sino que también depende de la naturaleza de la enzima. En general, el material biológico debe procesarse para la extracción rápidamente, utilizando procedimientos que minimicen la degradación endógena. La biomasa fresca debe procesarse rápidamente (Rosenberg, 2005).

Las células intactas contienen los elementos para su propia destrucción, que son compartimentadas y liberadas en respuesta a señales fisiológicas específicas. Cuando se prepara un extracto, este equilibrio se destruye y las enzimas proteolíticas ahora pueden mezclarse con el contenido celular. En la purificación de proteínas, las proteasas, enzimas que lisan los enlaces peptídicos (también conocidas como proteinasas), son contaminantes no deseados y potencialmente destructivos que necesitan ser inactivados y eliminados. (Rosenberg, 2005).

2.7 ANTECEDENTES EN EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

En el departamento de Biotecnología Alimentaria de la UAM-I se han realizado trabajos sobre la producción de FUCOS empleando la α -L-fucosidasa de diferentes orígenes, a continuación se enlistan algunos:

- Estudio de la producción de α -L-fucosidasas en seis bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus casei* IMAU60214, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS, *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB-2772) inoculadas en medios de cultivo con cuatro diferentes fuentes de carbono, obteniendo producción de la α -L-fucosidasa en las seis cepas estudiadas, y siendo mayor la producción con *Lactobacillus rhamnosus* GG con 0.16 U/mg (Escamilla-Lozano *et al.*, 2015).
- La síntesis de fucosil-oligosacáridos utilizando α -L-fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG, purificando la enzima y recuperando el 78 % de la actividad residual, para su uso en la síntesis de un trisacárido fucosilado con un rendimiento de 25%, utilizando pNP-fucosa como donador y D-Lactulosa como aceptor (Escamilla-Lozano *et al.*, 2019).
- Síntesis de un trisacárido fucosilado mediante transglicosilación empleando α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*, usando pNP-fucosa como donador y lactosa como aceptor, obteniendo la síntesis de un trisacárido fucosilado con un rendimiento de 32.5% al utilizar una proporción de donador/aceptor de 0.001 (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018b).
- Mejora en la actividad de transfucosilación de la α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*, produciendo variaciones en la actividad de agua al añadir calcio y sodio, favoreciendo la actividad de transfucosilación en presencia de CaCl_2 0.1 M, obteniendo el doble de actividad hidrolítica a una actividad de agua de 0.9581 y triplicando el rendimiento al utilizar una proporción de aceptor/donador de 42 (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018a).
- También se ha realizado la evaluación de producción de α -L-fucosidasa con *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* 14431 y *Bifidobacterium breve*, encontrándose actividad de la enzima en ambas cepas.
- Se experimentó con la síntesis de FUCOS empleando *B. longum*, lográndose la síntesis de un trisacárido que no fue caracterizado.
- Actualmente se realizan trabajos sobre síntesis y actividad biológica de FUCOS obtenidos utilizando α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*.

3 Hipótesis

La selección de la α -L-fucosidasa de bifidobacteria con mejor actividad, y el aumento de la actividad enzimática debido a una fuente de carbono específica como la inulina permitirá incrementar la producción de la enzima para realizar su extracción mediante sonicación.

4 Objetivos

4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar las mejores condiciones para la producción y extracción de α -L-fucosidasa de bifidobacterias a través de un diseño de experimentos para elevar su rendimiento durante la extracción.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad de α -L-fucosidasa de diferentes especies de bifidobacterias (*B. longum*, *B. bifidum* y *B. longum* subsp. *infantis*) para seleccionar la que presente mayor actividad enzimática, mediante la hidrólisis de un donador de fucosilo.
- Evaluar el efecto de la inulina como única fuente de carbono para la producción de α -L-fucosidasa de bifidobacterias empleando un medio de cultivo modificado.
- Realizar la extracción de α -L-fucosidasa de bifidobacteria utilizando ultrasonido, optimizando el proceso mediante un diseño experimental.

5 Metodología

Las siguientes metodologías fueron utilizadas, de haberse realizado algún cambio se indica en la metodología por etapa.

5.1 PROPAGACIÓN DE BIFIDOBACTERIAS

En la literatura se menciona con frecuencia que el medio MRS es adecuado para el crecimiento de bifidobacterias (Zeuner *et al.*, 2018), (H. Wang *et al.*, 2013), por eso se eligió este medio de cultivo en esta investigación, por lo que a partir de cultivos de las tres bifidobacterias (*B. longum*, *B. longum* subsp. *infantis* y *B. bifidum*) preservadas en medio MRS más glicerol, se inocularon 500 μ L en una botella serológica con 10 mL de medio de cultivo MRS (Difco™) burbujeadado con CO₂, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37 °C (Sección 2.4.1) con agitación rotatoria a 140 rpm.

5.2 PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE BIOMASA

Después de la incubación, se centrifugaron a 5500 xg por 12 min a 4 °C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de biomasa en 10 mL *buffer* de fosfatos 0.1 M a pH 6.5, con la finalidad de hacer un lavado. Después de resuspender la biomasa, se centrifugó a 5500 xg por 12 min a 4 °C, desechando el sobrenadante. La biomasa obtenida fue resuspendida en *buffer* de fosfatos 0.1 M a pH 6.5, pH dentro del rango considerado como óptimo para estos microorganismos (Sección 2.4.1), en una proporción de 150 mg de biomasa/mL, considerando el peso de la biomasa como la diferencia entre el peso del tubo con el pellet de biomasa menos el peso del tubo vacío.

5.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (HIDRÓLISIS)

La metodología se basó en la empleada por Escamilla-Lozano (2015), realizando algunas modificaciones. Se preparó una solución del sustrato 4-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (*p*NP-F) a 343 μ M en *buffer* de fosfatos 0.1 M a pH 6.5. Las mezclas de reacción enzimática se prepararon de la siguiente manera:

Actividad asociada a la célula

Actividad extracelular

$$\frac{50 \mu\text{L de suspensión de biomasa}}{450 \mu\text{L de solución de pNP} - F}$$

$$\frac{250 \mu\text{L de suspensión de biomasa}}{250 \mu\text{L de solución de pNP} - F}$$

Cada mezcla de reacción se incubó a 37 °C, se monitoreó la liberación de *p*-nitrofenol tomando muestras cada 0, 1, 3, 6, 9 y 11 horas, adicionando 50 μL de NaOH 0.5 M para finalizar la reacción. En el caso de la actividad asociada a la célula, las muestras se centrifugaron a 3900 xg durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. En el caso de la actividad extracelular, las muestras de la reacción no se centrifugaron.

5.4 CUANTIFICACIÓN DEL *P*-NITROFENOL LIBERADO

La metodología se basó en la empleada por Escamilla-Lozano (2015), realizando algunas modificaciones. El *p*-nitrofenol liberado en la reacción de hidrólisis se cuantificó mediante espectrofotometría a 410 nm (UV-1800, Shimadzu), empleando *buffer* de fosfatos 0.1 M a pH 6.5 como blanco, diluyendo con agua cuando los valores de absorbancia eran superiores a 1. Para el caso de las reacciones para determinar actividad extracelular, el blanco se preparó con un 50% de medio de cultivo sin inocular y 50% de *buffer* de fosfatos 0.1 M a pH 6.5. Los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón de *p*-nitrofenol de 0 a 382 μM

5.5 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE BIOMASA

Se cuantificó la concentración de la suspensión de biomasa realizando una dilución 1:100 con agua, se utilizó un blanco de agua y se midió absorbancia a 600 nm, para obtener la concentración en mg/mL empleando la siguiente curva patrón elaborada previamente por el grupo de investigación:

$$\text{mg de biomasa/mL} = \frac{\text{ABS}_{600\text{nm}} - 0.019}{0.2424}$$

5.6 CUANTIFICACIÓN DE CRECIMIENTO DE BIOMASA

Se cuantificó la concentración de biomasa al inicio y al final de la fermentación (0 y 24 h). Se tomaron 500 μL de medio de cultivo, se hizo una dilución 1:10 con agua, se utilizó un blanco

de agua y se midió absorbancia a 600 nm para emplear la curva patrón mencionada en la metodología 5.4.

5.7 AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE BIOMASA

Para los experimentos de sonicación, se preparó una suspensión de biomasa según la metodología 5.1, la cual fue cuantificada con la metodología 5.4, posteriormente se midió el volumen de suspensión para adicionar la cantidad de buffer necesaria para obtener una concentración de 40 mg/mL, la cual fue verificada utilizando la metodología 5.4.

5.8 SONICACIÓN

La metodología se elaboró tomando como base la utilizada por Momin (2018) y las instrucciones y recomendaciones proporcionadas por el fabricante en el manual del usuario del sonicador. Se colocaron 10 mL de suspensión de biomasa a 40 mg/mL en un vaso de precipitados de 25 mL, el vaso fue colocado en un recipiente con hielo, se introdujo la sonda del sonicador con una distancia entre el fondo del vaso y la base de la sonda de 3 mm.

Se aplicó ultrasonido con un sonicador de 130 W (Sonics & materials), con una sonda de 6 mm. Se aplicaron tratamientos de 3 min de sonicación en ciclos de 20 s de sonicación y 20 s de reposo con una potencia de 39 W (amplitud de 30 %). Para lo sucesivo, se considerará una equivalencia de 130 W = 100% de amplitud, dado que en la literatura suele indicarse la potencia del tratamiento como amplitud y como potencia en Watt.

Después de sonicar se centrifugó la suspensión de biomasa sonicada durante 22 min a 5500 xg a 4 °C, posteriormente se recuperó el sobrenadante (extracto enzimático) y se resuspendió la biomasa en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5 al volumen previo a la centrifugación.

5.8 PLAN DE TRABAJO

Se utilizó el siguiente plan de trabajo (Fig. 25), donde en una primera etapa se determinó la actividad de α -L-fucosidasa asociada a la célula y extracelular de las tres bifidobacterias, posteriormente en la segunda etapa se incrementó la producción de enzima utilizando un medio de cultivo modificado con inulina como única fuente de carbono. En la tercera etapa se realizó la purificación parcial de α -L-fucosidasa utilizando un tratamiento de sonicación para realizar la extracción y además una optimización de la misma, incorporando los datos obtenidos de las primeras dos etapas.

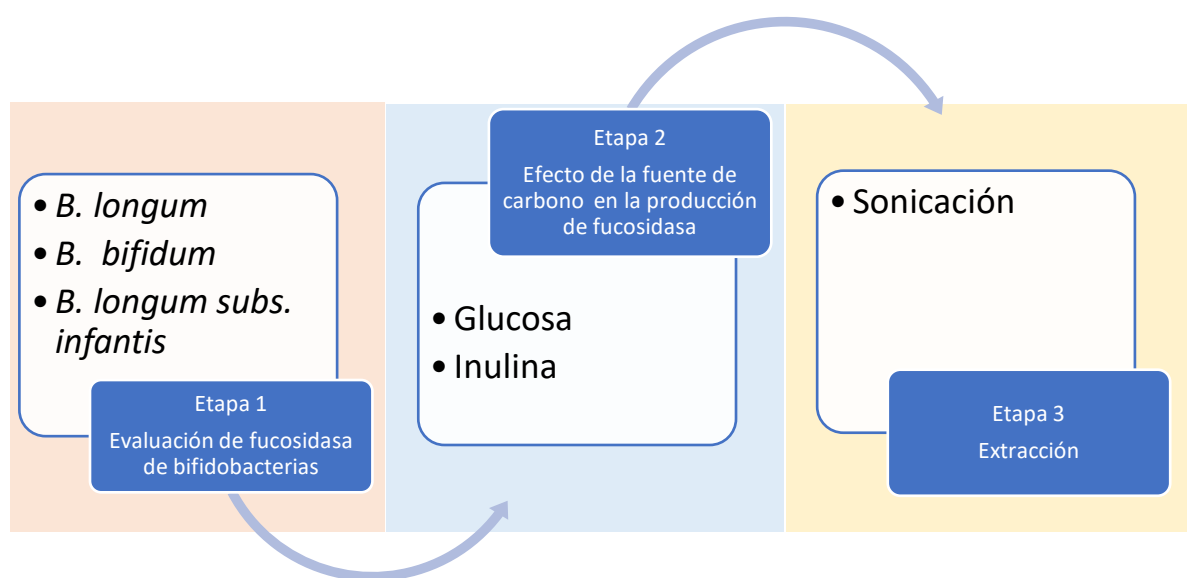


Figura 25 Plan de trabajo

5.9 METODOLOGÍA POR ETAPA

5.9.1 Etapa 1

Tabla 2 Metodologías de la Etapa 1

Metodología
5.1 Propagación de bifidobacterias
5.2 Preparación de suspensión de biomasa
5.3 Actividad enzimática (hidrólisis)
5.4 Cuantificación del <i>p</i> -nitrofenol liberado
5.5 Cuantificación de la concentración de la suspensión de biomasa

5.9.2 Etapa 2

Tabla 3 Metodologías de la Etapa 2

Metodología	Modificaciones
5.1 Propagación de bifidobacterias	Se utilizó un medio MRS modificado con inulina como única fuente de carbono, con la formulación del Anexo 9.2.
5.2 Preparación de suspensión de biomasa	
5.3 Actividad enzimática (hidrólisis)	6 horas
5.4 Cuantificación del <i>p</i> -nitrofenol liberado	
5.5 Cuantificación de la concentración de la suspensión de biomasa	
5.6 Cuantificación de crecimiento de biomasa	

5.9.2 Etapa 3

Tabla 4 Metodologías de la Etapa 3

Metodología	Modificaciones Tratamiento 1	Modificaciones Tratamiento 2	Modificaciones Tratamiento 3
5.1 Propagación de bifidobacterias			Resiembra en medio MRS modificado, con la formulación del Anexo 9.2.
5.1 Preparación de suspensión de biomasa			pH 7
5.4 Cuantificación de la concentración de la suspensión de biomasa			
5.7 Ajuste de la concentración de la suspensión de biomasa		60 mg/mL	60 mg/mL
5.8 Sonicación		5, 7.5 y 10 min Ciclos de 50% 65 W de potencia	2, 5, 8 y 11 min 10, 15 y 20 mL 50, 65 y 80 W Ciclos de 30%
5.3 Actividad enzimática (hidrólisis)	Reacciones con 100 μ L de extracto enzimático y 400 μ L de pNP-F	Reacciones con 100 μ L de extracto enzimático y 400 μ L de pNP-F	Reacciones con 200 μ L de extracto enzimático y 300 μ L de pNP-F a 514 μ M
5.3 Cuantificación del <i>p</i> -nitrofenol liberado			

6 Resultados y discusión

6.1 Cuantificación de la actividad de α -L-fucosidasa en bifidobacterias

Las bifidobacterias cuentan con glicosil-hidrolasas tanto al interior como en el exterior de la célula (Singh, 2019), y en el caso de *B. bifidum* hay evidencia de la presencia de estas enzimas al exterior de la célula para el metabolismo de carbohidratos. Es por ello que se determinó la actividad enzimática usando el sobrenadante de la fermentación para comprobar la existencia de α -L-fucosidasa extracelular y también se utilizó la biomasa para cuantificar la actividad enzimática que estaba asociada a la membrana celular de las bifidobacterias estudiadas.

Como se puede observar en la Figura 26, las bifidobacterias estudiadas no cuentan con α -L-fucosidasas extracelulares secretadas al medio debido a que los sobrenadantes del medio de cultivo no mostraron actividad enzimática. Mientras que como se puede observar, las tres bifidobacterias mostraron actividad de α -L-fucosidasa cuando se utilizó la biomasa, por lo que las tres bifidobacterias cuentan con α -L-fucosidasas asociadas a la célula.

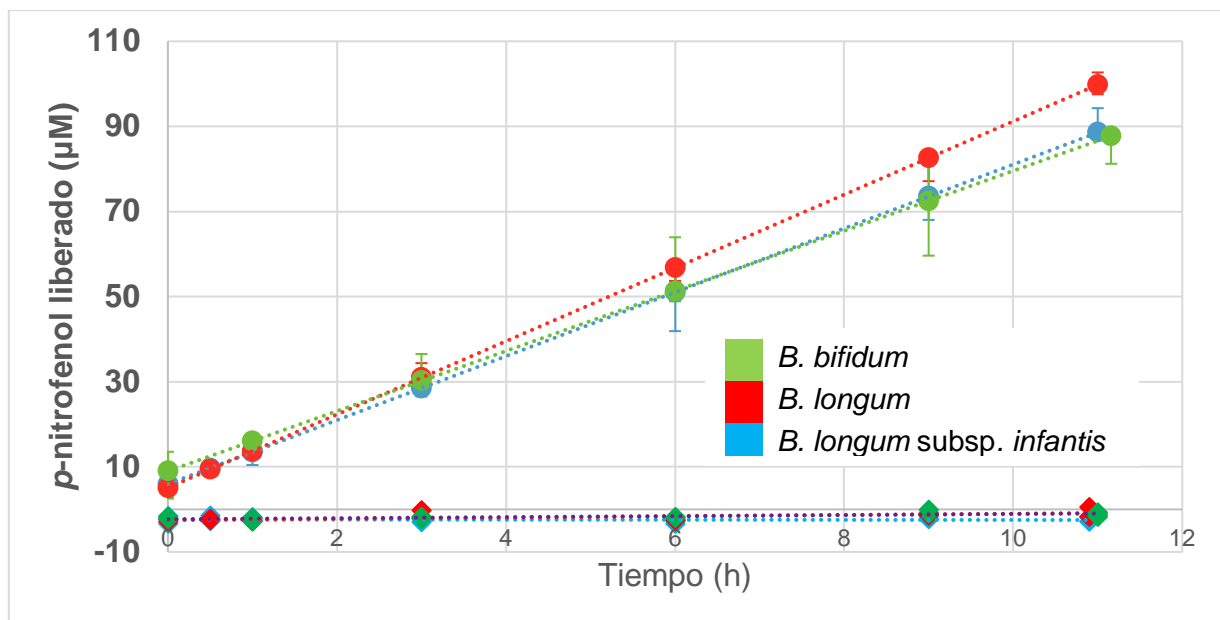


Figura 26 Actividad de α -L-fucosidasa de las tres bifidobacterias. ● Actividad asociada a la célula, ♦ Actividad extracelular

Por otro lado, la V_0 de *B. longum subsp. infantis* y *B. bifidum* fue significativamente menor ($p > 0.05$) con respecto a la mayor encontrada ($0.144 \pm 0.009 \mu\text{M}/\text{min}$), que fue la de *B. longum* (Tabla 5). Al mismo tiempo, las tres bifidobacterias presentaron actividad de α -L-fucosidasa, aunque en la bibliografía se ha sugerido que no todas las cepas de *B. longum* cuentan con la

enzima (Arboleya *et al.* 2018) o presentara una baja actividad (Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre la actividad específica de *B. longum* y *B. longum* subsp. *infantis* ($p > 0.05$), mientras que la de *B. bifidum* si fue significativamente diferente ($p < 0.05$) siendo esta última la que produjo menos α -L-fucosidasa.

Tabla 5 Velocidad inicial (V_0) y actividad específica de la α -L-fucosidasa de las tres bifidobacterias

Microorganismo	V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Actividad específica ($\mu\text{M}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de biomasa)
<i>B. longum</i> subsp. <i>Infantis</i>	0.126 ± 0.006	0.0094 ± 0.00005
<i>B. longum</i>	0.144 ± 0.003	0.0096 ± 0.00023
<i>B. bifidum</i>	0.120 ± 0.005	0.0072 ± 0.00036

Se sabe que la presencia y la actividad de la α -L-fucosidasa dependen de la especie y la cepa. Sela *et al.* (2012) caracterizaron cinco α -L-fucosidasas de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, encontrando su mayor actividad a 37 °C y pH óptimo entre 6 y 7.5, utilizando como sustrato 2-cloro-4-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (CpNP-fucosa). El gen Blon_2335, correspondiente a una de las α -L-fucosidasas caracterizadas, mostró la mayor actividad reportando una V_{max} de 0.1130 nmol/min. Por su parte Ashida *et al.* (2009) investigaron la actividad de hidrólisis de 3'-FL en bifidobacterias, encontrando que en tres cepas de *B. bifidum* se hidrolizaba por completo la 3'-FL, además encontraron que *B. bifidum* JCM1254 contaba con dos α -L-fucosidasas con diferente especificidad. Otras cepas de bifidobacterias que estudiaron no hidrolizaron la 3-FL.

En un estudio realizado por Yu *et al.* (2013) se realizaron perfiles de consumo de OLH fucosilados con varios microorganismos entre los que se encontraban bifidobacterias. Las siete cepas estudiadas de *B. longum* subsp. *infantis* fueron capaces de crecer en presencia de 2-FL; mientras que las tres cepas de *B. longum* que estudiaron pudieron crecer, aunque una de ellas tuvo un crecimiento bajo comparada con las demás. Además ellos mismos reportaron la actividad específica (U/L) de α -L-fucosidasa de las bifidobacterias, encontrando que las mayores actividades se obtuvieron con una cepa de *B. longum* subsp. *infantis* y con una cepa de *B. longum*.

Arboleya *et al.* (2018) realizaron un estudio comparativo de 20 genomas de *B. longum* para predecir la presencia de α -L-fucosidasas en bifidobacterias, encontrando que sólo en 4 cepas de *B. longum* estaba presente un gen que codifica para α -L-fucosidasa.

Con la finalidad de obtener más información para establecer una diferencia y seleccionar a la especie de bifidobacteria con mayor actividad, se realizó la evaluación del efecto de la fuente de carbono a las tres especies de bifidobacterias, porque no se conocía el efecto que se tendría utilizando otra fuente de carbono sobre la producción de enzima, pudiendo encontrar una diferencia con los resultados obtenidos en esta etapa.

6.2 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE α -L-FUCOSIDASA

Al desarrollar las bifidobacterias en medio con diferente fuente de carbono (glucosa e inulina), se observó que la mayor actividad de α -L-fucosidasa asociada a la célula se registró en las bifidobacterias que crecieron en un medio de cultivo con inulina, y la mayor V_0 se consiguió con *B. longum*, mientras que las velocidades obtenidas con *B. bifidum* y con *B. longum subsp. infantis* fueron similares entre ellas (Fig. 27 y Tabla 6).

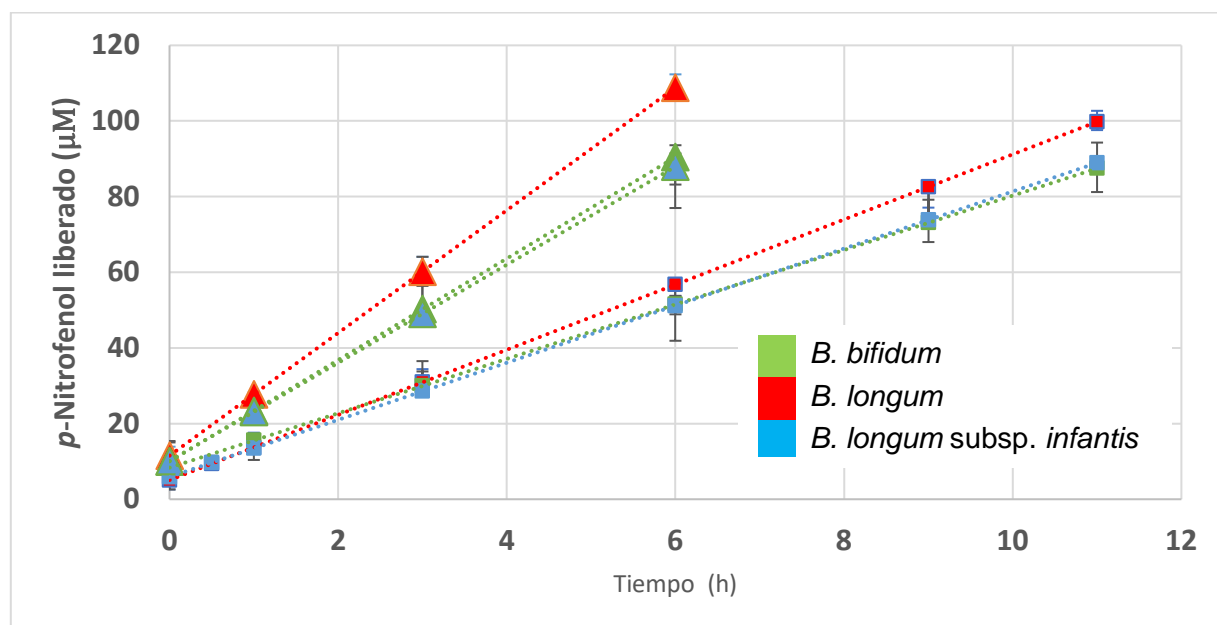


Figura 27 Actividad enzimática de las tres bifidobacterias. ■ Glucosa, ▲ Inulina

Tabla 6 Velocidad inicial (V_0) para las tres bifidobacterias crecidas con diferente fuente de carbono

Microorganismo	Fuente de carbono	V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Glucosa	0.126 ± 0.006
	Inulina	0.216 ± 0.015
<i>B. longum</i>	Glucosa	0.144 ± 0.003
	Inulina	0.270 ± 0.024
<i>B. bifidum</i>	Glucosa	0.120 ± 0.005
	Inulina	0.224 ± 0.011

Al obtener las actividades específicas se observó que, estas tenían la misma tendencia que en el análisis de V_0 , es decir, las bifidobacterias que crecieron en el medio de cultivo con inulina tuvieron mayor actividad específica que las que crecieron con glucosa (Fig. 28). Coincidentemente con lo observado en con V_0 , la actividad específica de *B. longum* crecida en medio con inulina fue la más alta y significativamente diferente a la de *B. bifidum* y *B. longum* subsp. *infantis*, pero entre las dos últimas no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$).

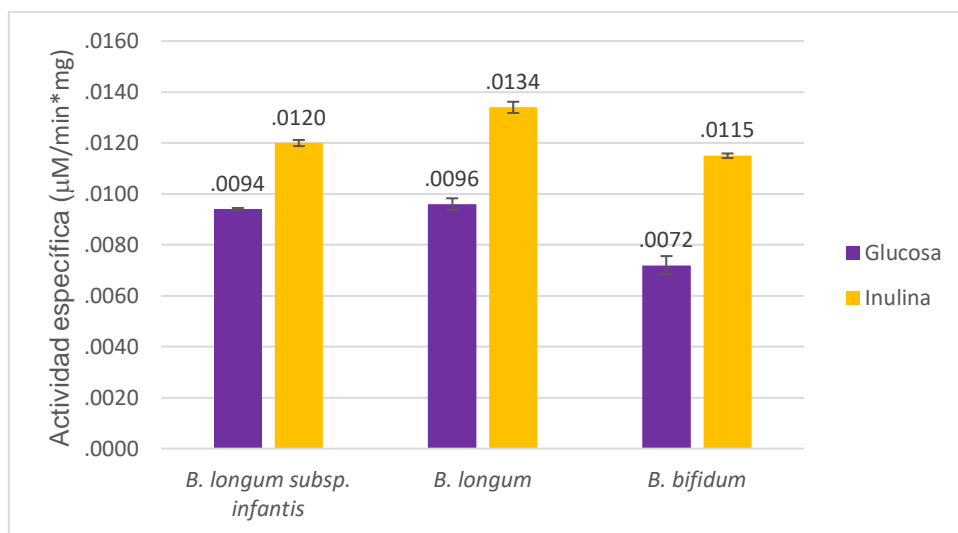


Figura 28 Actividades específicas para las tres bifidobacterias crecidas en dos fuentes de carbono

El incremento en la actividad específica al desarrollar los microorganismos en medio con inulina (60.3% en *B. bifidum*, 40.4% en *B. longum* y 28.6% en *B. longum subsp. Infantis*) está relacionado con la capacidad de incrementar la expresión de los genes que codifican las α -L-fucosidasas. Sela *et al.* (2012) reportaron que al cuantificar la expresión de 5 genes de α -L-fucosidasa en *B. longum subsp. infantis*, 4 genes se expresaron al doble cuando se utilizó la inulina como única fuente de carbono. Adicionalmente, Garrido *et al.* (2011) reportaron la capacidad de la inulina para inducir la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo y transporte de carbohidratos, y encontró que 7 de los 20 genes estudiados se indujeron al doble o más respecto a su expresión cuando se utiliza lactosa.

Por otra parte, Cuevas-Juárez *et al.* (2017) estudiaron la actividad de β -fructofuranosidasa de *B. longum subsp. infantis* ATCC 15697 intracelular, asociada a la membrana y extracelular, utilizando inulina como sustrato. Registraron actividad en las tres fracciones, pero la mayor parte de la actividad se encontró en la enzima asociada a la membrana. Además lograron identificar la presencia de una glucosidasa. Adicionalmente realizaron perfiles de consumo de los carbohidratos contenidos en la inulina, obteniendo que los primeros en ser consumidos fueron los de bajo grado de polimerización, y posteriormente los de mayor tamaño.

En este sentido, se sabe que las bifidobacterias cuentan con transportadores específicos para la importación de carbohidratos sencillos como glucosa y fucosa, que pueden entrar directamente a la vía de la derivación bífida (Pokusaeva *et al.*, 2011). Mientras que para poder metabolizar otras fuentes de carbono más complejas como la inulina requieren de una mayor cantidad de enzimas involucradas en la hidrólisis y el transporte de carbohidratos, aunque no todas las enzimas expresadas son utilizadas para metabolizar fucosa, porque en el caso de la inulina, se potencia la expresión de la α -L-fucosidasa a pesar de que la estructura de este oligosacárido no cuenta con unidades de fucosa.

6.2.1 Efecto de la fuente de carbono en el crecimiento de las bifidobacterias

Se midió el crecimiento de las bifidobacterias empleando como única fuente de carbono la glucosa o la inulina. Como se puede observar en la Figura 29 las tres bifidobacterias se desarrollaron correctamente tanto en el medio con glucosa como en el de inulina. Inclusive en el caso de la *B. longum subsp. infantis*, hay una mayor concentración de biomasa al final, en el medio con inulina que con el de glucosa. Se sabe que la inulina actúa, por su carácter prebiótico, positivamente en el desarrollo de bifidobacterias (Fox & McSweeney, 2003).

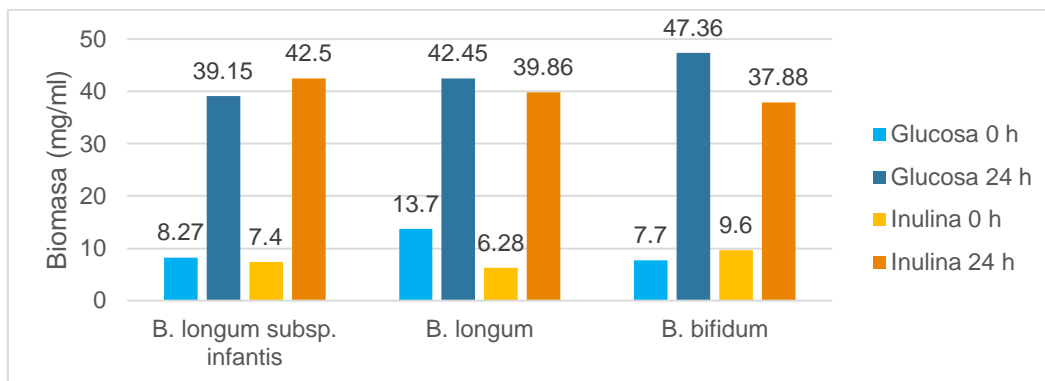


Figura 29 Crecimiento de bifidobacterias utilizando como fuente de carbono glucosa e inulina

Selak *et al.* (2016) inocularon cepas de bifidobacterias en un medio de cultivo con inulina como única fuente de carbono, con la finalidad de medir su crecimiento y el consumo de inulina a través del tiempo. Algunas cepas de *B. longum* y *B. bifidum* que estudiaron, lograron crecer en este medio, sin embargo, se comprobó que sólo una cepa de *B. longum* fue capaz de degradar la inulina, mientras que ninguna de las cepas de *B. bifidum* estuvo relacionada con la degradación de inulina. Estos microorganismos fueron capaces de crecer por que utilizaron fructooligosacáridos presentes en la inulina.

Aunque la prioridad es encontrar la bifidobacteria con mayor actividad enzimática, la producción de la biomasa también es un factor de importancia, porque al escalar el proceso, una baja producción de biomasa podría no compensar el incremento en la actividad.

6.3 PURIFICACIÓN PARCIAL DE A-L-FUCOSIDASA

6.3.1 Primer tratamiento de sonicación

Con el primer tratamiento de sonicación se buscó dar un tratamiento suave para liberar las enzimas asociadas a la membrana celular de las bifidobacterias (Singh, 2019), y minimizar la lisis celular, la liberación de proteasas y otras enzimas que pudieran causar alguna interferencia durante la investigación.

Los resultados de este primer tratamiento se muestran resumidos en las figuras 30A para la actividad relacionada a la biomasa y 30B para aquella relacionada al sobrenadante. Como se puede observar, es notoria la actividad de α -L-fucosidasa asociada a la célula, siendo similar para las tres bifidobacterias. Sin embargo, debido a la dispersión de los datos obtenidos para la actividad enzimática obtenida en los extractos enzimáticos después de la sonicación para *B. longum subsp. infantis* y *B. bifidum*, estos no son confiables. Por el contrario, los resultados

obtenidos para el caso de *B. longum* muestran una menor dispersión en los datos, siendo más confiables.

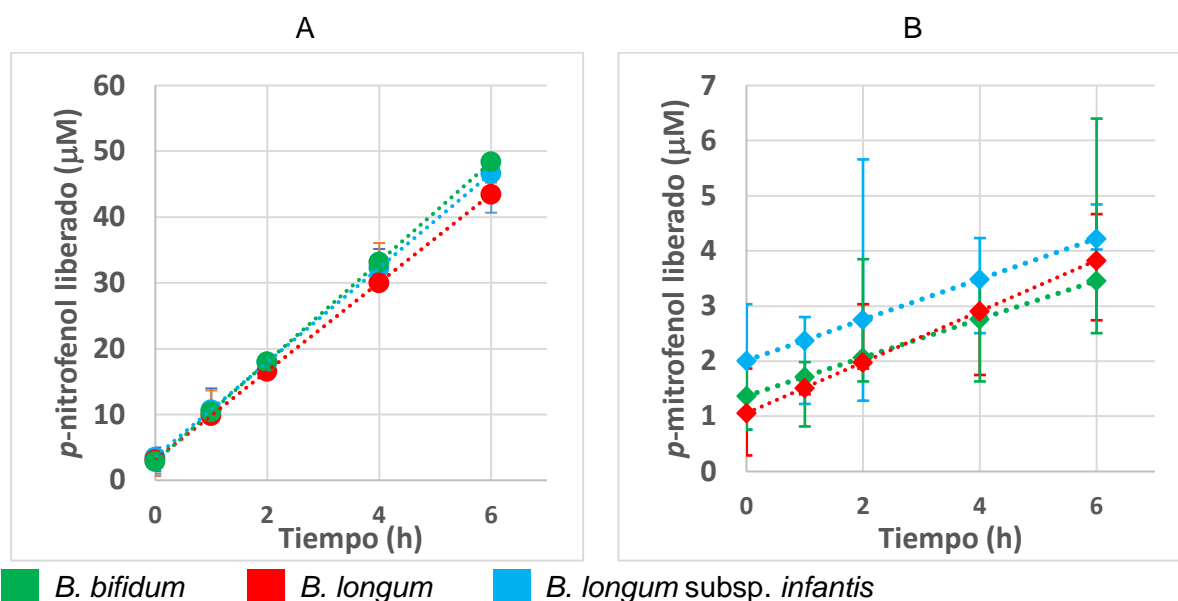


Figura 30 Actividad enzimática de las tres bifidobacterias sometidas a ultrasonido.

A) Biomasa sonicada B) Extracto enzimático.

Para corroborar estos resultados, se calculó la velocidad inicial de los extractos enzimáticos para cada bifidobacteria. Como se puede observar en la Tabla 7, solo para *B. longum* es confiable la determinación de la V_0 ($r= 0.924$), mientras que para las otras dos bifidobacterias los resultados no lo fueron. Por esta razón, el segundo tratamiento solo fue aplicado a *B. longum*, por ser la bifidobacteria que respondió mejor a este primer tratamiento y porque tuvo la mayor actividad de α -L-fucosidasa en las etapas anteriores.

Tabla 7 Velocidad inicial (V_0) del extracto enzimático obtenido de la sonicación de las bifidobacterias

Microorganismo	r	V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	0.527	0.006 ± 0.003
<i>B. longum</i>	0.924	0.009 ± 0.001
<i>B. bifidum</i>	0.670	0.009 ± 0.003

6.3.2 Segundo tratamiento de sonicación

En el segundo tratamiento de sonicación se cambiaron algunos parámetros buscando tener un tratamiento que fuera un poco más intenso y como consecuencia se liberara una mayor cantidad de α -L-fucosidasa. Las condiciones en las que se realizó esta etapa fueron: 20 kHz y 65 W de potencia. Se utilizó una concentración de biomasa de 60 mg de biomasa/mL, la cual fue reportada como óptima por Momin *et al.* (2018) para una cepa de *Bacillus licheniformis*. El criterio que se utilizó para utilizar esta concentración es que tanto *Bacillus licheniformis* como *B. longum* son microorganismos *Gram+* y de forma alargada. Ambas características tienen influencia sobre la resistencia de los microorganismos a las ondas de ultrasonido. El tratamiento se aplicó durante 5, 7.5 y 10 min, en intervalos de 30 s de sonicación y 30 s de reposo.

Como se puede observar en la Figura 31 la actividad de α -L-fucosidasa se conserva en los extractos enzimáticos, obteniendo la mejor V_0 con el tratamiento de sonicación de 7.5 min. Además se observó que la biomasa sonicada conserva la actividad de α -L-fucosidasa.

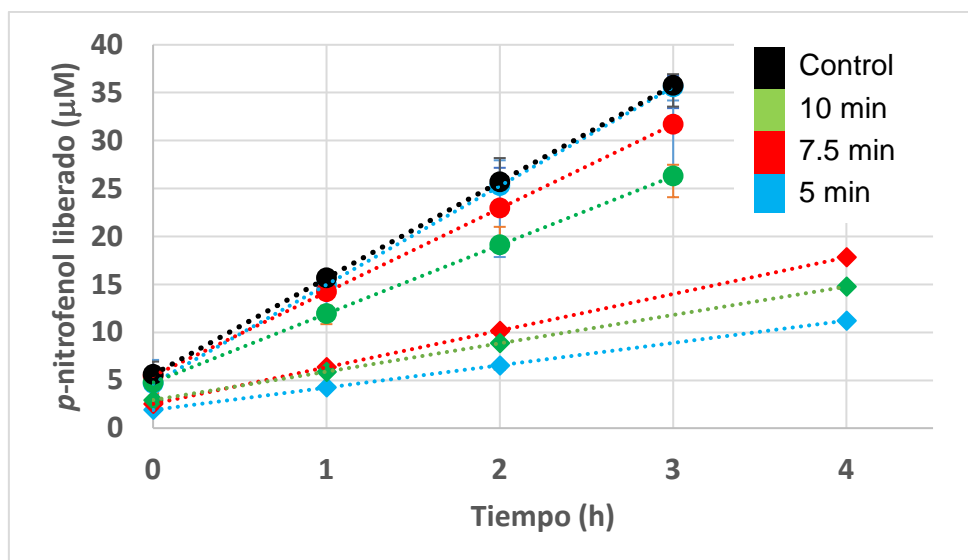


Figura 31 Actividad enzimática *B. longum* sometida a ultrasonido. ● Biomasa sonicada, ◆ Extracto enzimático

Al comparar las actividades específicas de los extractos enzimáticos (Tabla 8) se encontró que no hay diferencia significativa entre la actividad específica de los extractos enzimáticos de 5 y 10 min, mientras que el extracto enzimático de 7.5 min sí fue significativamente diferente ($p < 0.1$). Respecto a la actividad específica de la biomasa sonicada, la del tratamiento de 5 min no tuvo una diferencia significativa con la actividad específica de la biomasa de control que no fue sonicada ($p < 0.1$).

Tabla 8 V_0 y actividad específica de biomasa sonicada y extracto enzimático

Tratamiento	Tiempo de sonicación (min)	V_0 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Actividad específica ($\mu\text{M}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de biomasa)
Control	0	0.168 ± 0.007	0.0272 ± 0.0015
	5	0.172 ± 0.007	0.0278 ± 0.0015
Biomasa sonicada	7.5	0.146 ± 0.016	0.0236 ± 0.0013
	10	0.119 ± 0.006	0.0193 ± 0.0011
Extracto enzimático	5	0.039 ± 0.001	0.0032 ± 0.0002
	7.5	0.064 ± 0.002	0.0052 ± 0.0003
	10	0.049 ± 0.001	0.0040 ± 0.0002

Como se puede observar en la Figura 31, en los tres tratamientos de sonicación se liberó α -L-fucosidasa al extracto enzimático, siendo mayor en el tratamiento de 7.5 min (19%). Al comparar la actividad residual total se observa mayor actividad residual en los tratamientos de 5 y 7.5 min (114 y 106% respectivamente). Mientras que en el tratamiento de 10 min la actividad residual fue de 86%, teniendo una pérdida de 14%, esto podría deberse a que la cavitación producida durante la sonicación pudo tener un efecto sobre la estructura de la α -L-fucosidasa al romper interacciones débiles, por lo que se inactivó. Algo similar pudo suceder con la α -L-fucosidasa asociada a la célula.

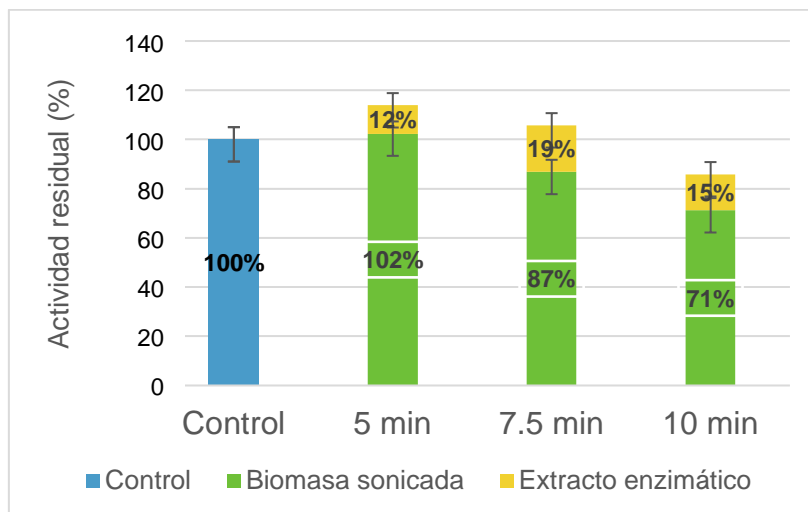


Figura 32 Actividad residual de α -L-fucosidasa en la biomasa sonicada y el extracto enzimático a diferente tiempo de sonicación

Nguyen *et al.* (2012) estudio el efecto de la sonicación al inicio de la fermentación de la leche con bifidobacterias para investigar el efecto del ultrasonido sobre el metabolismo de carbohidratos. Las bifidobacterias sometidas a este tratamiento aceleraron la hidrólisis de lactosa y la transgalactosilación en la leche, por la liberación de la lactasa debido a la lisis celular que provoco el ultrasonido.

Por otra parte, Ma *et al.* (2011) investigaron los efectos del ultrasonido sobre la actividad de alcalasa. Descubrieron que el ultrasonido tenía efectos sobre la actividad enzimática. La mayor actividad se logró cuando se aplicó con un tratamiento de sonicación de 80 W durante 4 min, bajo el cual la actividad enzimática se incrementó en un 5,8% en comparación con el control. Además, el tratamiento de ultrasonido aumentó el número de α -hélices en un 5,2% y redujo el número de bobinas aleatorias en un 13,6%. Se sugirió que estas alteraciones hicieron que la alcalasa exhibiera más regularidad y flexibilidad, lo que tuvo efecto en el incremento de la actividad de la enzima (Huang *et al.*, 2017).

En esta investigación se observó un aumento en la actividad residual de la biomasa sonicada lo cual podría explicarse por el cambio en la permeabilidad de la membrana celular facilitando el ingreso del pNP-F a la célula, aunque también es posible que la enzima sufriera algunas modificaciones que afectaran positivamente su estructura permitiéndole incrementar su actividad.

6.3.3 Tercer tratamiento de sonicación

Después de revisar los resultados obtenidos en el segundo tratamiento de sonicación se consideró al tratamiento de 7.5 min como el mejor para la extracción de la α -L-fucosidasa, y adjuntando los resultados de las etapas anteriores se decidió utilizar *B. longum* crecida en medio MRS con inulina para optimizar la extracción de la enzima α -L-fucosidasa mediante sonicación utilizando un método de superficie de respuesta. Como en el segundo tratamiento se registró la mayor actividad residual del extracto enzimático a los 7.5 min y una caída a los 10 min, se consideró un rango de tiempo de 2 a 8 min, esperando encontrar un óptimo.

6.3.3.1 Primer diseño experimental

Se utilizó un modelo de superficie de respuesta considerando 3 variables: tiempo (2, 5 y 8 min), potencia (50, 65 y 80 W) y volumen (10, 15 y 20 mL). Se realizó el diseño del experimento con Statgraphics obteniéndose un diseño de Box-Benkhen con 12 tratamientos y un punto central:

Los experimentos se realizaron en bloques, por lo que para cada bloque se realizó un control y se obtuvieron las actividades residuales tanto de los extractos enzimáticos como de la biomasa sonicada expresados como porcentaje (Fig. 33) para los tratamientos con 2 min de sonicación se logró liberar la menor cantidad de enzima, con un mínimo de 4.17% y un máximo de 8.7% por el contrario en tratamientos de 5 min se logró una mayor liberación de enzima, obteniéndose un mínimo de 6.7% y un máximo de 14 %. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con tratamientos de 8 min, registrando un mínimo de 7.6% y un máximo de 35.5%.

Se empleó el software Minitab para realizar el análisis estadístico de los datos, obteniendo que de todas las variables individuales e interacciones eran significativas ($p < 0.05$), además la variable tiempo contó con el mayor valor F de las tres (Anexo 9.3.1).

Obteniéndose el siguiente modelo:

$$\begin{aligned} \text{Actividad residual} = & -71.9 + 7.089 * \text{Tiempo} - 0.94 * \text{Volumen} + 2.036 * \text{Potencia} - \\ & 0.0326 * \text{Tiempo} * \text{Tiempo} - 0.0074 * \text{Volumen} * \text{Volumen} - \\ & 0.01496 * \text{Potencia} * \text{Potencia} - 0.1834 * \text{Tiempo} * \text{Volumen} - \\ & 0.0322 * \text{Tiempo} * \text{Potencia} + 0.02249 * \text{Volumen} * \text{Potencia} \end{aligned}$$

6.3.3.2 Segundo diseño experimental

Dado que la mayor extracción de la α -L-fucosidasa se obtuvo en los tratamientos de 8 min, observándose una proporcionalidad entre la cantidad de enzima liberada y el tiempo de

sonicación, se expandió el diseño experimental, añadiendo un tiempo de 11 min, se realizó la expansión del diseño con el software Statgraphics, obteniendo un diseño central compuesto 2^3 , manteniendo el volumen en 10, 15 y 20 mL y la potencia en 50, 65 y 80 W (Anexo 9.3).

Como se puede observar en la Figura 33, con los tratamientos de 11 min se consiguió liberar entre el 9.2 y el 24.3% de actividad residual en el extracto enzimático.

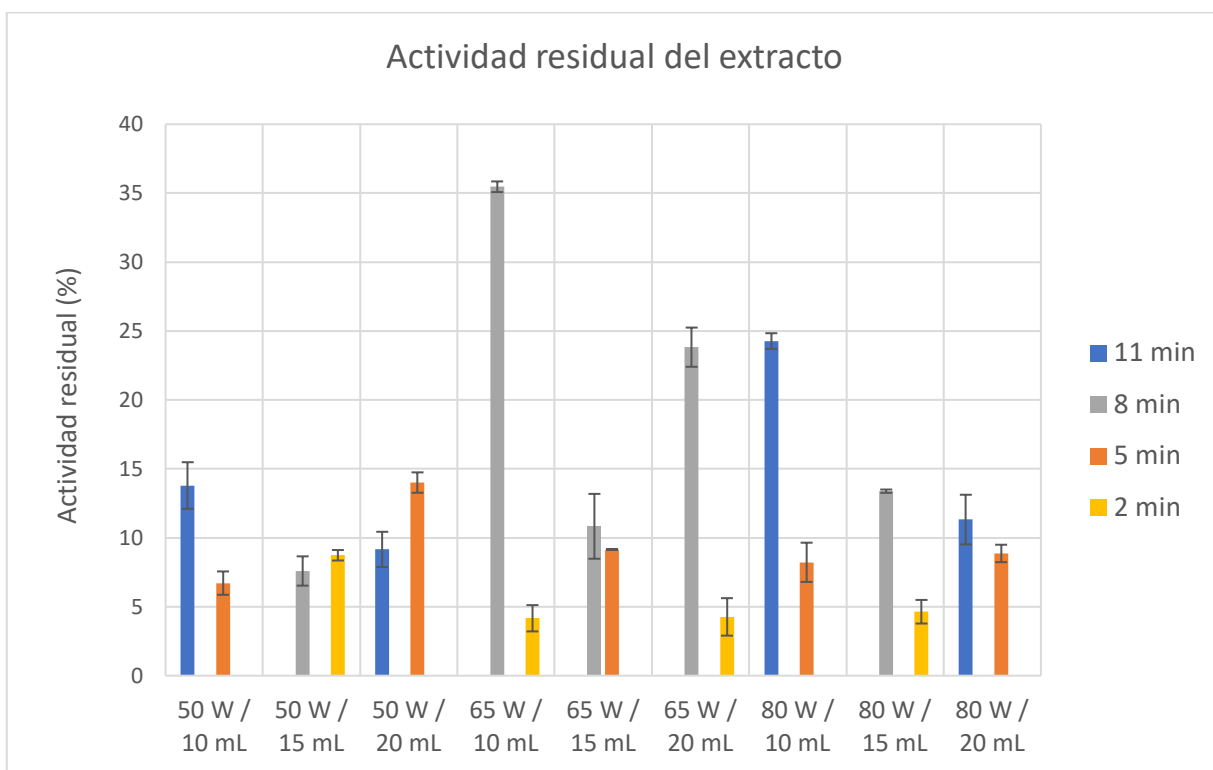


Figura 33 Actividad residual de la α -L-fucosidasa obtenida en el extracto de sonicación

Se realizaron las gráficas de superficie con el software Sigma plot y los gráficos de área con el software NCSS (Fig. 34). En la Figura 34A se puede observar que cuando se comparan volumen y potencia, la mayor actividad de α -L-fucosidasa en el extracto enzimático se obtuvo con un volumen de 10 mL y una potencia entre 65 y 70 W. En la Figura 34B se puede observar que cuando se comparan el volumen y el tiempo, la mayor actividad de α -L-fucosidasa en el extracto enzimático se obtuvo nuevamente con un volumen de 10 mL y un tiempo de entre 8 y 10 min. Finalmente, en la Figura 34C se puede observar que cuando se comparan la potencia y el tiempo, la actividad de α -L-fucosidasa en el extracto enzimático se obtuvo con una potencia entre 62 y 72 W y un tiempo entre 7.5 y 9.5 min.

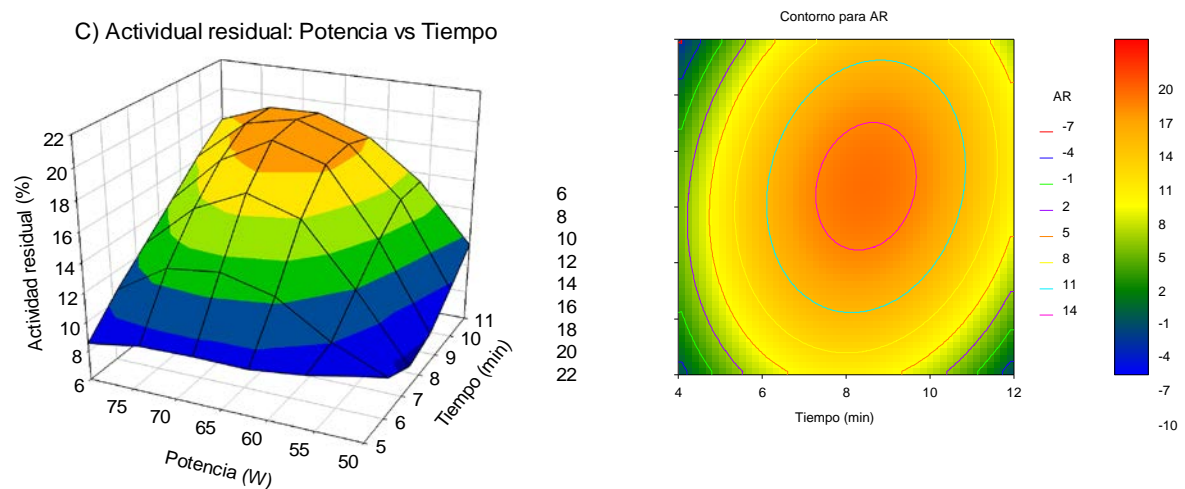
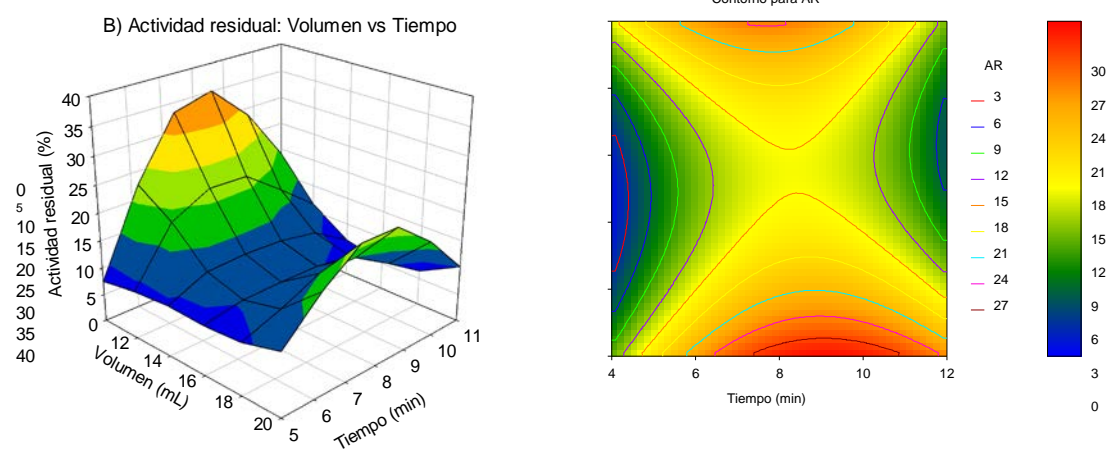
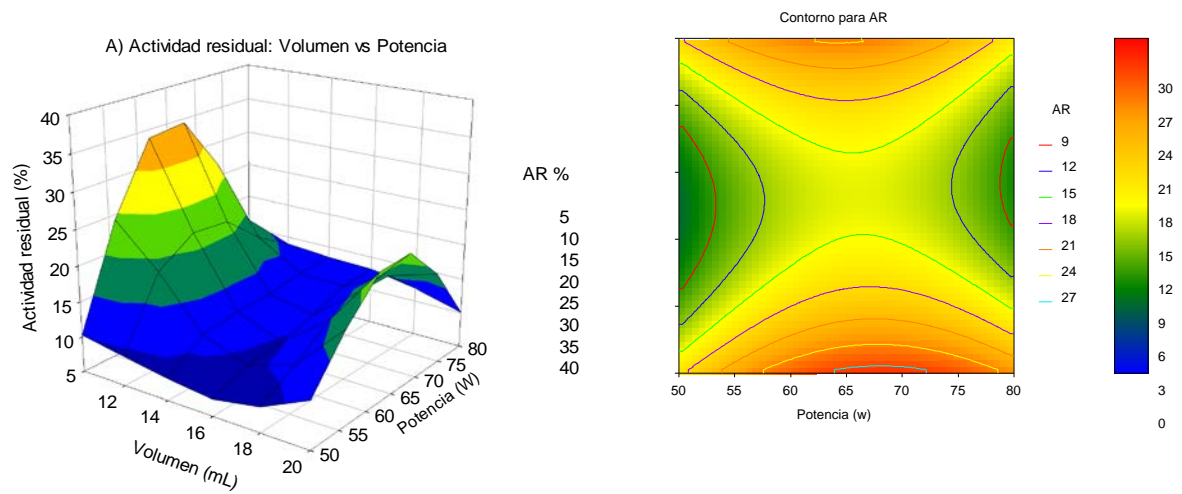


Figura 34 Gráficos de superficie y contorno de la extracción de la α -L-fucosidasa de *B. longum*.

El efecto del ultrasonido puede verse influenciado por el volumen de la suspensión de biomasa y por la viscosidad debida a la concentración de partículas (biomasa) (Brennan, 2006), provocando que el tamaño de las burbujas y los remolinos producidos por las ondas de ultrasonido sean de diferente tamaño según las condiciones utilizadas. En los volúmenes de 10 y 20 mL se obtuvo mayor liberación de enzima que cuando se utilizó un volumen de 15 mL, quizá con los 10 mL las ondas de ultrasonido se disipan menos en el líquido y son más intensas, mientras que en los de 20 mL aunque hay disipación también hay mayor cantidad de biomasa de la que se puede extraer enzima. En el caso de los volúmenes de 15 mL pudiera ser que la cantidad de biomasa presente no compense la disipación de la energía producida por el volumen utilizado. En lo correspondiente a la potencia, se tuvo un mejor efecto al utilizar 65 W, por lo que 50 W podría ser insuficiente para favorecer la liberación de enzima y 80 W demasiada potencia, con los efectos adversos que implica (Huang *et al.*, 2017). Es notorio el efecto del tiempo entre 2 y 8 min, pero al llegar hasta 11 min, el tiempo deja de ser la variable principal.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de superficie de respuesta con el software estadístico NCSS, tomando los datos del segundo diseño experimental y excluyendo los de los tratamientos de 2 min, para respetar la estructura del diseño central compuesto 2^3 , con un modelo cuadrático completo, obteniendo significancia para el modelo lineal, cuadrático y las interacciones, contando con mayor significancia el modelo cuadrático. Con este segundo diseño, el volumen aportó mayor explicación sobre el modelo, seguido de la potencia y el tiempo ($p < 0.05$) (Anexo 9.3.3).

Con la superficie de respuesta de este segundo diseño experimental se obtuvo el siguiente modelo:

$$\begin{aligned} \text{Actividad} &= -93.26733 - 11.3559 \cdot \text{Volumen} + 4.317379 \cdot \text{Potencia} + 12.6105 \cdot \text{Tiempo} \\ \text{residual} &= +0.4751095 \cdot \text{Volumen}^2 - 0.0323545 \cdot \text{Potencia}^2 - 0.7338898 \cdot \text{Tiempo}^2 - \\ &+ 0.02495 \cdot \text{Volumen} \cdot \text{Potencia} - 0.2126667 \cdot \text{Volumen} \cdot \text{Tiempo} \\ &+ 0.04519444 \cdot \text{Potencia} \cdot \text{Tiempo} \end{aligned}$$

En base a este modelo se realizó la optimización con el complemento Solver de Excel 365, utilizando el método de resolución evolutivo, obteniendo los siguientes valores optimizados:

Volumen: 10 mL

Potencia: 69.3 W

Tiempo: 9.3 min

Con un valor de actividad de α -L-fucosidasa en el extracto enzimático estimado de 30.36 %.

Este valor estimado es 5.1% inferior al mayor valor obtenido experimentalmente, el cual fue de 35.46% con un volumen de 10 mL, una potencia de 65 W y un tiempo de 8 min, esto puede

deberse a que aún pueden hacerse ajustes al modelo solicitado al software y mejorar la optimización. Momin *et al.* (2018) utilizaron un método de superficie de respuesta para extraer arginasa intracelular de *Bacillus licheniformis*, obteniendo como condiciones óptimas un tiempo de sonicación de 3.2 min, un volumen de 14.6 mL y una potencia de 36 W, con una liberación de 0.3511 IU/mL, mientras que utilizando triton X-100 al 1% para realizar la extracción de arginasa consiguieron una actividad máxima de 0.746 IU/mL, lo que indica que aún quedaba más enzima que podía ser liberada.

Por su parte, Bansal *et al.* (2008) emplearon cuatro métodos de extracción para extraer β -Galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus*, obteniendo 71% más actividad de β -Galactosidasa (U/mg) empleando SDS-Cloroformo respecto al método de sonicación. Ganesh & Lin (2011) compararon 4 métodos de extracción de proteínas de *Paenibacillus*, encontrando que con un kit comercial de extracción de proteínas (ReadyPrep™ Total Protein Extraction Kit, BIO-RAD) se lograba una mayor extracción de proteínas respecto al método de sonicación

Respecto a la actividad total, los resultados se muestran en la Figura 34, donde se puede ver que los tratamientos de 5 min fueron los más propensos a la pérdida de actividad, mientras que en los de 2 min la actividad enzimática total se mantuvo alrededor del 100%. En los tratamientos de 8 y 11 min se registró un incremento en la actividad promedio, producido por la mayor liberación de enzima y por la variación en la actividad enzimática de la biomasa sonicada. También es posible que la actividad residual se viera influenciada por el tratamiento de sonicación, como fue reportado por Ma *et al.* (2011).

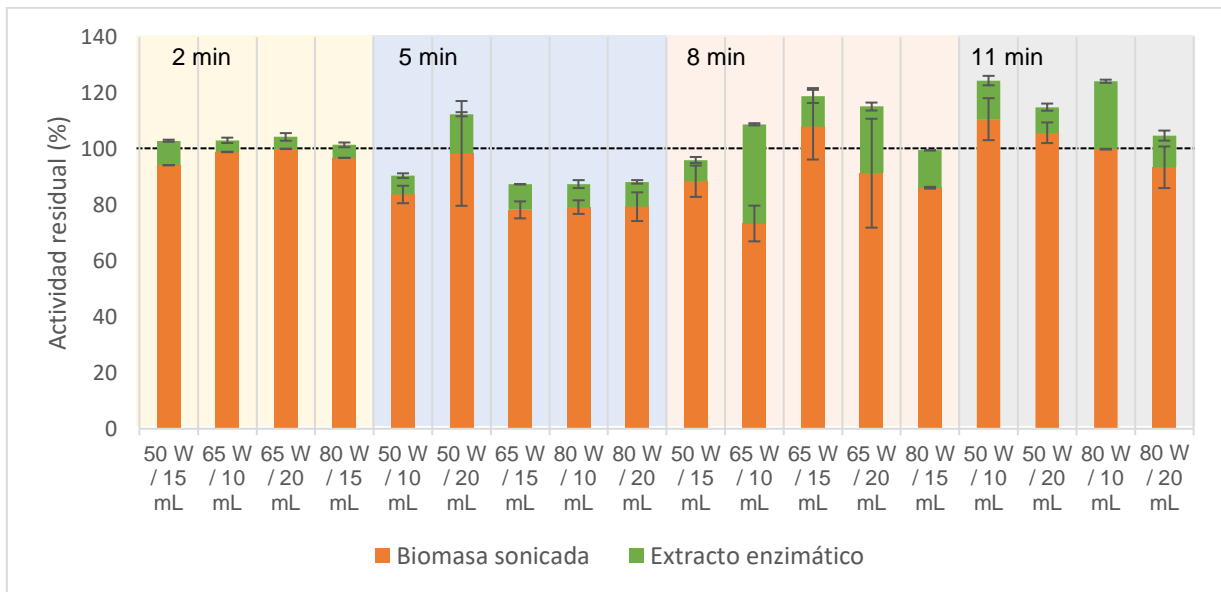


Figura 35 Actividad residual de α -L-fucosidasa en la biomasa sonicada y el extracto enzimático a diferente tiempo de sonicación, volumen y potencia. ■ Biomasa sonicada, ■ Extracto enzimático.

7 Conclusiones

- Las bifidobacterias estudiadas no excretaron α -L-fucosidasa al medio.
- La α -L-fucosidasa está asociada a la célula, con mayor actividad específica en *B. longum* y *B. longum* subsp. *infantis*
- La inulina como única fuente de carbono en un medio de cultivo MRS modificado, potencia la producción de α -L-fucosidasa en las tres bifidobacterias estudiadas. Observando que *B. bifidum* incrementó su actividad específica hasta 60%, *B. longum* hasta 40% y *B. longum* subsp. *infantis* 28%.
- La inulina como fuente de carbono produce un buen crecimiento en las bifidobacterias estudiadas.
- Con el uso de ultrasonido es posible liberar hasta un 35% de la actividad de α -L-fucosidasa asociada a la célula de *B. longum* crecida en medio de cultivo con inulina.
- El método de ultrasonido es adecuado para la liberación de hasta un 35% de la actividad de α -L-fucosidasa asociada a la célula de *B. longum* crecida en medio de cultivo con inulina.
- Es posible optimizar el proceso de extracción de α -L-fucosidasa de *B. longum* por sonicación a través de un diseño de experimentos fijando variables como tiempo, potencia y volumen de la suspensión de biomasa
- La cantidad de α -L-fucosidasa de *B. longum* liberada es proporcional al tiempo entre 2 y 8 min de sonicación.

8 Bibliografía

- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), 473-493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Ahern, G. J., Hennessy, A. A., Ryan, C. A., Ross, R. P., & Stanton, C. (2019). Advances in Infant Formula Science. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 75-102. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081318-104308>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Arboleya, S., Bottacini, F., O'Connell-Motherway, M., Ryan, C. A., Ross, R. P., van Sinderen, D., & Stanton, C. (2018). Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains. *BMC Genomics*, 19(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4388-9>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Benešová, E., Lipovová, P., Krejzová, J., Kovařová, T., Buchtová, P., Spiwok, V., & Králová, B. (2015). Alpha-L-Fucosidase Isoenzyme iso2 from *Paenibacillus thiaminolyticus*. *BMC Biotechnology*, 15(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0160-x>
- Biavati, B., & Mattarelli, P. (2006). The Family Bifidobacteriaceae. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 322-382). https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_17

- Bode, L. (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*, 91(11), 619-622. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
- Bode, L., Contractor, N., Barile, D., Pohl, N., Prudden, A. R., Boons, G.-J., & Jennewein, S. (2016). Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: Challenges and opportunities for research and application. *Nutrition Reviews*, 74(10), 635-644. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw025>
- Bottacini, F., Ventura, M., Sinderen, D. van, & Motherway, M. O. (2014). Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(S1), S4. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S4>
- Brennan, J. G. (2006). *Food processing handbook*. Weinheim: Wiley-VCH. (pp. 214, 223-225.)
- Bych, K., Mikš, M. H., Johanson, T., Hederos, M. J., Vignæs, L. K., & Becker, P. (2019). Production of HMOs using microbial hosts—From cell engineering to large scale production. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.003>
- Charalampopoulos, D., & Rastall, R. (Eds.). (2009). *Prebiotics and probiotics science and technology*. New York: Springer Verlag.
- Chen, R. (2018). Enzyme and microbial technology for synthesis of bioactive oligosaccharides: An update. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3017-3026. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8839-2>
- Cuevas-Juárez, E., Ávila-Fernández, Á., & López-Munguía, A. (2017). Identification of enzymatic activities involved in agave fructan consumption by *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* ATCC 15697. *Journal of Functional Foods*, 35, 267-278. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.048>
- Cutler, P. (Ed.). (2004). *Protein purification protocols* (2. ed). Totowa, NJ: Humana Press.(pp. 29, 283-287)

- Di Gioia, D., Aloisio, I., Mazzola, G., & Biavati, B. (2014). Bifidobacteria: Their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 563-577. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5405-9>
- Enam, F., & Mansell, T. J. (2019). Prebiotics: Tools to manipulate the gut microbiome and metabolome. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 46 (1445). <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02203-4>
- Escamilla-Lozano Y., García-Garibay M., López-Munguía-Canales A., Gómez-Ruiz L., Rodríguez-Serrano G., Cruz-Guerrero A. Synthesis of α -l-fucosidase in different strains of lactic acid bacteria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2015;14(3):623–629.
- Escamilla-Lozano, Y., Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Synthesis of Fucosyl-Oligosaccharides Using α -l-Fucosidase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Molecules*, 24(13), 2402. <https://doi.org/10.3390/molecules24132402>
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (Eds.). (2003). *Advanced dairy chemistry* (3rd ed). New York, N.Y: Springer.
- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018a). Improvement of the transfucosylation activity of α -l-fucosidase from *Thermotoga maritima* for the synthesis of fucosylated oligosaccharides in the presence of calcium and sodium. *Extremophiles*, 22(6), 889-894. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1045-4>
- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018b). Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by α -l-Fucosidase from *Thermotoga maritima*.

- Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(3), 681-691.
<https://doi.org/10.1007/s12010-018-2771-x>
- Huang, G., Chen, S., Dai, C., Sun, L., Sun, W., Tang, Y., & Ma, H. (2017). Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 144-149.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.12.018>
- Kalia, V. C., Shouche, Y., Purohit, H. J., & Rahi, P. (Eds.). (2017). *Mining of microbial wealth and metagenomics* (1st edition). New York, NY: Springer Singapore.
- Liong, M.-T. (Ed.). (2015). *Beneficial Microorganisms in Medical and Health Applications*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-23213-3>
- LoCascio, R. G., Ninonuevo, M. R., Freeman, S. L., Sela, D. A., Grimm, R., Lebrilla, C. B., & German, J. B. (2007). Glycoprofiling of Bifidobacterial Consumption of Human Milk Oligosaccharides Demonstrates Strain Specific, Preferential Consumption of Small Chain Glycans Secreted in Early Human Lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8914-8919. <https://doi.org/10.1021/jf0710480>
- LoCascio, R. G., Niñonuevo, M. R., Kronewitter, S. R., Freeman, S. L., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2009). A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microbial Biotechnology*, 2(3), 333-342. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00072.x>
- Million, M., Angelakis, E., Maraninchi, M., Henry, M., Giorgi, R., Valero, R., & Raoult, D. (2013). Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *International Journal of Obesity*, 37(11), 1460-1466. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.20>
- Momin, B., Chakraborty, S., & Annapure, U. (2018). Investigation of the cell disruption methods for maximizing the extraction of arginase from mutant *Bacillus licheniformis* (M09) using

- statistical approach. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 35(10), 2024-2035.
<https://doi.org/10.1007/s11814-018-0107-8>
- Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K., & Zhou, W. (2012). Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. *Food Chemistry*, 130(4), 866-874. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.108>
- Owen, C. G., Martin, R. M., Whincup, P. H., Smith, G. D., & Cook, D. G. (2005). Effect of Infant Feeding on the Risk of Obesity Across the Life Course: A Quantitative Review of Published Evidence. *Pediatrics*, 115(5), 1367-1377. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1176>
- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 6(3), 285-306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Rosenberg, I. M. (2005). *Protein analysis and purification: Benchtop techniques* (2nd ed). Boston: Birkhäuser.(pp 121-125, 128-129)
- Sela, D. A., Garrido, D., Lerno, L., Wu, S., Tan, K., Eom, H.-J., & Mills, D. A. (2012). Bifidobacterium longum subsp. Infantis ATCC 15697 α -Fucosidases Are Active on Fucosylated Human Milk Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 795-803. <https://doi.org/10.1128/AEM.06762-11>
- Singh, R. P. (2019). Glycan utilisation system in Bacteroides and Bifidobacteria and their roles in gut stability and health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7287-7315. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10012-z>
- Sonics& Materials, Inc. (2004, abril). *VCX130PB - VCX134PB User's guide*. Recuperado de https://www.sonics.com/site/assets/files/2959/vcx130pb_100-130_watt_micro_with_pulser_2004.pdf

- Sprenger, G. A., Baumgärtner, F., & Albermann, C. (2017). Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations. *Journal of Biotechnology*, 258, 79-91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.030>
- Thomson, P., Medina, D. A., & Garrido, D. (2017). Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular strategies for their utilization. *Food Microbiology* 75 (37-46). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.001>
- Wang, H., Yang, R., Hua, X., Zhao, W., & Zhang, W. (2013). Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6167-6180. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4998-3>
- Wang, J., Chen, C., Yu, Z., He, Y., Yong, Q., & Newburg, D. S. (2017). Relative fermentation of oligosaccharides from human milk and plants by gut microbes. *European Food Research and Technology*, 243(1), 133-146. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2730-0>
- Yu, Z.-T., Chen, C., & Newburg, D. S. (2013). Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*, 23(11), 1281-1292. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt065>
- Yun, E. J., Liu, J.-J., Lee, J. W., Kwak, S., Yu, S., Kim, K. H., & Jin, Y.-S. (2019). Biosynthetic Routes for Producing Various Fucosyl-Oligosaccharides. *ACS Synthetic Biology*, 8(2), 415-424. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00436>
- Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2014). Methods for Improving Enzymatic Trans-glycosylation for Synthesis of Human Milk Oligosaccharide Biomimetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9615-9631. <https://doi.org/10.1021/jf502619p>
- Zeuner, B., Muschiol, J., Holck, J., Lezyk, M., Gedde, M. R., Jers, C., & Meyer, A. S. (2018). Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29 α -L-fucosidases for

enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 41, 34-45.

<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.002>

9 Anexos

9.1 CURVA PATRÓN DE *p*-NITROFENOL

Se realizó una curva patrón con *p*-nitrofenol a una concentración entre 0 y 383 μM utilizando buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7, añadiendo 100 μL de NaOH 0.5 M por cada mL de solución de *p*-nitrofenol. Se realizaron diluciones con agua cuando fue necesario.

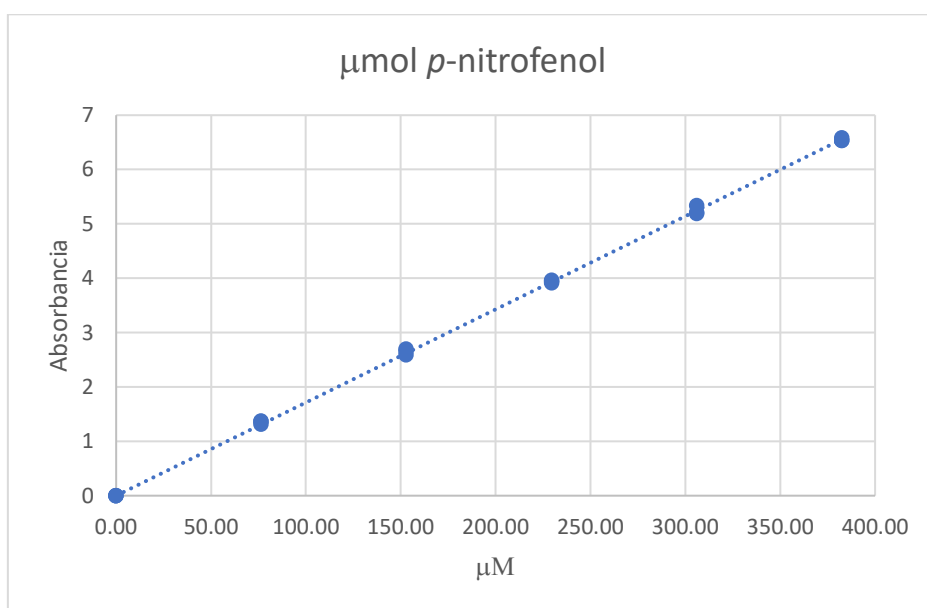


Figura 36 Absorbancia vs μM de *p*-nitrofenol

La ordenada fue ajustada a 0, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\mu\text{M de } p - \text{nitrofenol} = \frac{ABS_{410nm}}{0.017}$$

9.2 COMPOSICIÓN DEL MEDIO MRS MODIFICADO

La composición del medio de cultivo fue realizada en base a la del medio MRS comercial (Difco™), se le ajustó el pH a 6.8 y fue burbujeado con CO₂.

Tabla 9 Composición del medio MRS modificado

Componente	Concentración (%)
Proteosa peptona (Difco)	1.00
Extracto de carne (Bioxon)	1.00
Extracto de levadura (BBL™)	0.50
Inulina (Imperial Suiker Unie)	2.00
Polisorbato 80 (tween 80)	0.10
Citrato de amonio (J.T. Baker)	0.20
Acetato de sodio (J.T. Baker)	0.50
Sulfato de magnesio (Caledon)	0.01
Sulfato de manganeso (J.T. Baker)	0.01
Fosfato dipotásico (J.T. Baker)	0.20

9.3 TRATAMIENTOS DE SONICACIÓN TERCERA ETAPA

Tabla 10 Tratamientos de sonicación tercera etapa

Experimento	Tratamiento	Bloque	Volumen (mL)	Potencia (w)	Tiempo (min)	AE control ($\mu\text{M}/\text{min} \cdot \text{mg}$ biomasa)	Biomasa (mg/ml)	AR biomasa	AR Extracto	AR total
1	11A	8	20	65	8	4.58E-02	57.68	72%	22%	94%
2	3A	8	10	65	8	4.58E-02	57.68	67%	35%	102%
3	5A	8	15	50	2	4.58E-02	57.68	88%	8%	97%
4	C1	9	15	65	5	4.41E-02	60.81	81%	9%	90%
5	4A	2	10	80	5	2.44E-02	58.17	81%	10%	91%
6	C2	4	15	65	5	2.44E-02	53.55	81%	5%	86%
7	1A	2	10	50	5	2.44E-02	58.17	81%	6%	86%
8	12A	9	20	80	5	4.41E-02	60.81	74%	9%	84%
9	10A	11	20	65	2	2.44E-02	60.32	107%	6%	113%
10	2A	2	10	65	2	2.44E-02	58.17	106%	3%	110%
11	9A	10	20	50	5	3.18E-02	62.38	117%	15%	132%
12	C3	3	15	65	5	2.83E-02	61.97	97%	7%	104%
13	7A	3	15	80	2	2.83E-02	61.97	93%	4%	97%

Experimento	Tratamiento	Bloque	Volumen (mL)	Potencia (w)	Tiempo (min)	AE control ($\mu\text{M}/\text{min} \cdot \text{mg}$ biomasa)	Biomasa (mg/ml)	AR biomasa	AR Extracto	AR total
14	6A	3	15	50	8	2.83E-02	61.97	83%	7%	90%
15	8A	3	15	80	8	2.83E-02	61.97	86%	13%	99%
16	11B	10	20	65	8	3.18E-02	62.38	111%	25%	136%
17	3B	7	10	65	8	4.90E-02	60.57	80%	36%	116%
18	5B	7	15	50	2	4.90E-02	60.57	100%	9%	109%
19	C4	9	15	65	5	4.41E-02	60.81	75%	9%	84%
20	4B	4	10	80	5	3.07E-02	53.55	77%	7%	84%
21	C5	2	15	65	5	3.18E-02	58.17	87%	11%	98%
22	1B	5	10	50	5	6.00E-02	60.98	87%	8%	94%
23	12B	5	20	80	5	6.00E-02	60.98	85%	8%	93%
24	10B	5	20	65	2	6.00E-02	60.98	93%	3%	96%
25	2B	5	10	65	2	6.00E-02	60.98	92%	5%	97%
26	9B	7	20	50	5	4.90E-02	60.57	80%	13%	93%
27	C6	6	15	65	5	4.76E-02	59.66	81%	9%	90%
28	7B	6	15	80	2	4.76E-02	59.66	100%	5%	106%
29	6B	6	15	50	8	4.76E-02	59.66	96%	9%	104%

Experimento	Tratamiento	Bloque	Volumen (mL)	Potencia (w)	Tiempo (min)	AE control ($\mu\text{M}/\text{min} \cdot \text{mg}$ biomasa)	Biomasa (mg/ml)	AR biomasa	AR Extracto	AR total
30	8B	6	15	80	8	4.76E-02	59.66	88%	14%	102%
31	13A	18	10	80	11	2.64E-02	61.89	100%	25%	125%
32	14A	16	20	80	11	4.05E-02	62.88	86%	10%	96%
34	CE1	17	15	65	8	3.55E-02	63.12	122%	9%	131%
35	CE3	17	15	65	8	3.55E-02	63.12	111%	8%	119%
36	16A	17	10	50	11	3.55E-02	63.12	103%	12%	115%
37	17A	17	20	50	11	3.55E-02	63.12	110%	8%	117%
38	13B	18	10	80	11	2.64E-02	61.89	100%	24%	124%
39	14B	17	20	80	11	3.55E-02	63.12	101%	13%	114%
41	CE5	17	15	65	8	3.55E-02	63.12	102%	9%	111%
42	CE6	19	15	65	8	5.50E-02	58.42	120%	13%	133%
43	16B	19	10	50	11	5.50E-02	58.42	118%	15%	134%
44	17A	19	20	50	11	5.50E-02	58.42	102%	10%	113%
45	CE2	19	15	65	8	5.50E-02	58.42	96%	13%	109%
46	CE4	19	15	65	8	5.50E-02	58.42	97%	13%	110%

9.3.1 ANOVA del primer diseño de superficie de respuesta

Resumen del modelo:

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.08009	99.36%	98.31%	*

Tabla 11 ANOVA del primer diseño de superficie de respuesta

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	18	1985.10	110.283	94.53	0.000
Blocks	9	593.41	65.935	56.52	0.000
Linear	3	455.76	151.920	130.23	0.000
Tiempo	1	314.16	314.163	269.30	0.000
Volumen	1	83.27	83.271	71.38	0.000
Potencia	1	139.53	139.531	119.61	0.000
Square	3	71.46	23.821	20.42	0.000
Tiempo*Tiempo	1	0.32	0.318	0.27	0.612
Volumen*Volumen	1	0.06	0.065	0.06	0.818
Potencia*Potencia	1	64.59	64.588	55.36	0.000
2-Way Interaction	3	68.78	22.927	19.65	0.000
Tiempo*Volumen	1	40.62	40.622	34.82	0.000
Tiempo*Potencia	1	11.07	11.071	9.49	0.010
Volumen*Potencia	1	14.01	14.007	12.01	0.005
Error	11	12.83	1.167		
Lack-of-Fit	10	12.83	1.283	417.26	0.038
Pure Error	1	0.00	0.003		
Total	29	1997.93			

9.3.2 Gráficos de superficie del primer diseño experimental

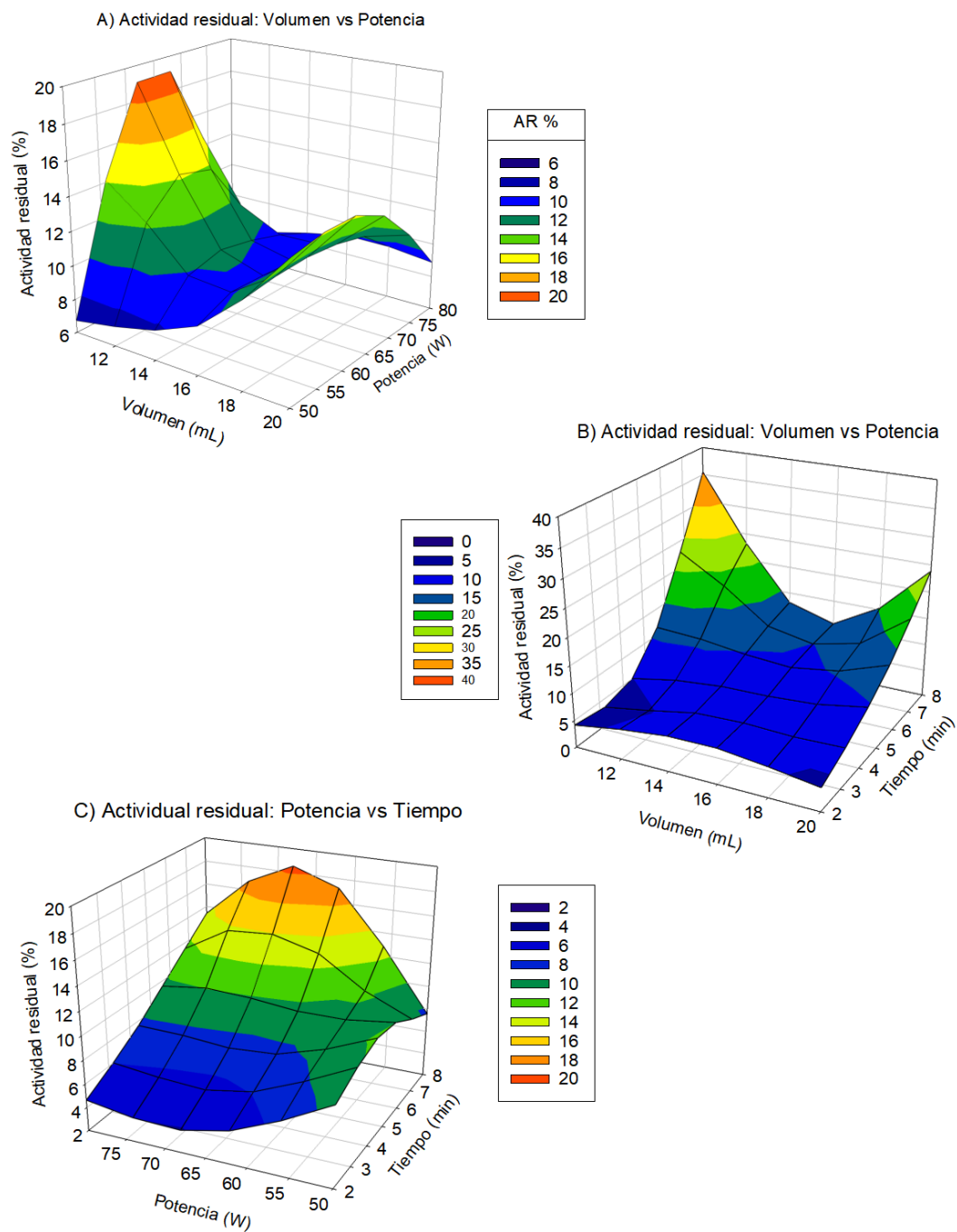


Figura 37 Gráficos de superficie de la extracción de la α -L-fucosidasa de *B. longum*, primer diseño experimental

9.3.3 ANOVA del segundo diseño de superficie de respuesta

Resumen del modelo

Number of Terms Removed	0
Number of Terms Remaining	9
R-Squared Cutoff Value	0.010000
R-Squared of Final Model	0.818757

Tabla 12 ANOVA del segundo diseño de superficie de respuesta

Source Squared	df	Sequential Incremental Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	R-
Regression	9	1628.111	180.9012	52.89	0.000000	0.818757
Linear	3	364.6362	121.5454	35.54	0.000000	0.183371
Quadratic	3	978.4539	326.1513	95.36	0.000000	0.492053
Lin x Lin	3	285.0211	95.00702	27.78	0.000000	0.143334
Total Error	26	360.4041	13.8617			0.181243
Lack of Fit	4	285.1591	71.28976	20.84	0.000000	0.143403
Pure Error	22	75.24505	3.420229			0.037840

Tabla 13 ANOVA paa variables del segundo diseño de superficie de respuesta

Source Squared	df	Sequential Incremental Sum-Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	R-
Volumen	4	1078.984	269.746	78.87	0.000000	0.542608
Potencia	4	455.0156	113.7539	33.26	0.000000	0.228822
Tiempo	4	679.6194	169.9049	49.68	0.000000	0.341772
Total Error	26	360.4041	13.8617			0.181243
Lack of Fit	4	285.1591	71.28976	20.84	0.000000	0.143403
Pure Error	22	75.24505	3.420229			0.037840

Tabla 14 ANOVA para estimadores del segundo diseño de superficie de respuesta

Parameter	df	Regression coefficient	Standard error	T-Ratio	Prob Level	Last R-squared
Intercept	1	-93.26733				
Volumen	1	-11.3559	2.141114	-5.30	0.000015	0.196088
Potencia	1	4.317379	0.9557585	4.52	0.000120	0.142243
Tiempo	1	12.6105	3.157776	3.99	0.000476	0.111170
Volumen^2	1	0.4751095	0.06376596	7.45	0.000000	0.386988
Potencia^2	1	-0.0323545	0.007085107	-4.57	0.000106	0.145366
Tiempo^2	1	-0.7338898	0.1749578	-4.19	0.000281	0.122654
Volumen*Potencia	1	-0.02495	0.01241043	-2.01	0.054868	0.028174
Volumen*Tiempo	1	-0.2126667	0.06205216	-3.43	0.002040	0.081879
Potencia*Tiempo	1	0.04519444	0.02068405	2.18	0.038095	0.033280