

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en
Lactobacillus plantarum WCFS1**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Plaza Vinuesa

Directores

Rosario Muñoz Moreno
Blanca de las Rivas González del Rey
José Mancheño Gómez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología



Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

Memoria presentada por:

LAURA PLAZA VINUESA

para optar al grado de **doctor**

DIRECTORES:

Dra. Rosario Muñoz Moreno
Dra. Blanca de las Rivas González del Rey
Dr. José Miguel Mancheño Gómez

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Madrid, 2020



Visto Bueno: TUTORA

Dra. María Molina Martín
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

Los estudios realizados en esta memoria han sido financiados por los proyectos de investigación AGI2014-52911-R (2015-2018) titulado “*Lactobacillus plantarum* como modelo para el estudio de la interacción con compuestos fenólicos en la fermentación de alimentos y en la adaptación al tracto gastrointestinal” y AGL2017-84614-C2-2R (2018-2021) titulado “Enzimas modificadoras de carbohidratos de *Lactobacillus plantarum* WCFS1: caracterización genética, funcional y estructural” concedido por el Fondo Europeo de desarrollo Regional de la Agencia Estatal de Investigación de Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

A todos mis seres queridos

“El éxito en la vida no se mide por lo que logras, sino por los obstáculos que superas” (Laureano Gallardo, 2019)

Agradecimientos

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al soporte técnico y a todas las personas del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), del Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR-CSIC) y del Instituto de Química Orgánica General Manuel Lora Tamayo que me han ayudado y facilitado mi estancia predoctoral.

En primer lugar, quisiera agradecer de manera muy especial a mis directores de Tesis, las Dras. Rosario Muñoz Moreno y Blanca de las Rivas González del Rey, y el Dr. José Miguel Mancheño Gómez por su enorme contribución a mi formación y desarrollo profesional y por la paciencia, apoyo y confianza depositadas para poder llevar a cabo este trabajo, puesto que sin su ayuda no habría sido posible. Muchísimas gracias por acogerme todo este tiempo, guiarme y aconsejarme, haciéndome crecer tanto profesional como personalmente.

Gracias también al Dr. Félix López de Felipe, sin tu ayuda para la interpretación del metabolismo mi trabajo estaría huérfano de uno de sus capítulos.

Seguidamente, mis agradecimientos van dirigidos a la Facultad de Farmacia de la UCM y en particular a la Doctora María Molina Martín por ser mi tutora académica y ofrecerme siempre su ayuda y disponibilidad.

Gracias a los Dres. Francisco Javier Moreno Andújar, Agustín Olano Villén, Oswaldo Hernández Hernández y las Dras. Nieves Corzo Sánchez, Antonia Montilla Corredera y Mar Villamiel Guerra, del grupo de Química y Funcionalidad de Carbohidratos y Derivados del CIAL (CSIC-UAM) por acogerme en mi corta estancia y darme la oportunidad de trabajar y aprender sus técnicas de análisis.

Como no mencionar también al Dr. Jose Cumella del Centro de Química Orgánica "Lora-Tamayo" (CENQUIOR - CSIC) por su colaboración cada vez que teníamos que sintetizar nuevos compuestos, tan necesarios para mis ensayos.

Agradecer también a todo el personal del grupo de Producción de Ingredientes Bioactivos a partir de Legumbres y otros granos de interés

(PROINLEG) del ICTAN (Juana Frías, Cristina Martínez, Elena Peñas, Sara Bautista y Natalia) por dejarme invadir el laboratorio cada vez que tenía que usar vuestro maravilloso lector de microplacas, ayudarme siempre que me ha hecho falta y amenizarme los días con vuestras conversaciones y pausas para el café.

También tengo que agradecer a los compañeros de laboratorio por hacer tan ameno el día a día. A Laura Santamaría, mi tocaya y sufridora de batallas, chismes, buenos ratos y desahogos. En especial a Marta Sanchidrián, esa cercana paisana de Ávila, por acompañarme en esa corta estancia en el CIAL, con nuestros eternos viajes en Renfe y autobús, y a la que tengo un gran aprecio personal. Como no acordarme de mi argentina Claudia Abeijón Mukdsi, que tantos buenos momentos hemos pasado y que tanto cariño me dejó durante su estancia en nuestro laboratorio. A mis compañeros del CIAL, Paloma Delgado Fernández, Nerea Muñoz Almagro y Gorka Carcelén Gallego, que tan bien me acogieron y cuidaron durante mi estancia. A mi última compañera de aventura, Ana Sánchez Arroyo, que con esa beca FPI me acompañó y aguantó en los últimos y más estresantes momentos sufriendo juntas los azotes de la pandemia del Covid19. A todos los alumnos de prácticas, TFG y TFM que han pasado en estos años por aquí, que, aunque han dado momentos de estrés y colapso, han dejado momentos de risas y grata compañía en esas jornadas tan intensas.

Así mismo agradecer, y en especial mención, al Dr. José M^a Barcenilla Moraleda y M^a Victoria Santamaría Barceló, que han sido como mis padres adoptivos en este mundo de la investigación, siempre tendiéndome su mano para ayudarme en cuanto hizo falta, tanto profesional como personalmente. A la Dra. Laura Lagartera, mi otra tocaya por escucharme y aconsejarme.

También me gustaría mencionar a mi profesora de Biología, Lourdes Corral del Instituto Juan de Mairena de Leganés, de la que guardo un cariñoso recuerdo y que fue la persona que despertó en mí el interés por la Biología.

Llegados a este punto tengo que agradecer a todos mis amigos tanto de la carrera como de fuera de ella su apoyo constante e interés en mi trabajo. Mil gracias a todos, especialmente a María Molina (también sufridora tesista), por nuestras conversaciones eternas y mutua comprensión. A todos mis amigos del

pueblo “El Arenal” (Nuria, Vanesa, Marta, Laura), mis amigos de Leganés y todos aquellos que han contribuido a que no pierda la cabeza, aportándome siempre otras perspectivas.

No pueden faltar aquí mis mayores agradecimientos a los que realmente han estado más cerca y han sufrido mis nervios y estrés continuo, mis padres que me han transmitido la paciencia, perseverancia y la lucha por lo que realmente uno quiere, le gusta y hace feliz. A mi hermano (que, aunque no es persona de mostrar sentimientos, siempre he notado su apoyo y sentimiento de orgullo). A Javi que me ha enseñado que “sin esfuerzo no hay recompensa (*“NO PAIN NO GAIN”*)”, que me ha apoyado siempre y me ha aguantado junto con mi perrita Janna los repetitivos ensayos de exposición oral que les hacía continuamente, siempre prestando atención e incluso haciendo correcciones y preguntas. Gracias por estar siempre ahí escuchándome, aconsejándome, dándome ánimos y fuerzas para seguir, así como a toda mi familia, tanto carnal como política, por su apoyo incondicional. Sin todos ellos no habría llegado donde estoy hoy. Gracias por hacerme la persona que soy, por estar ahí en los buenos momentos, pero sobretodo en los malos. De todo corazón, gracias.

ÍNDICE

Resumen	i
Summary	iii
Lista de abreviaturas	v
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Carbohidratos en alimentos	1
1.1. Monosacáridos	3
1.2. Oligosacáridos	4
1.3. Polisacáridos	6
2. Glicosil hidrolasas	8
2.1. Clasificación	8
2.1.1. Clasificación según su estructura	8
2.1.2. Clasificación según su especificidad de sustrato	9
2.1.3. Clasificación según su mecanismo catalítico	10
2.2 Aplicaciones de las glicosil hidrolasas en la industria alimentaria	11
3. Metabolismo de carbohidratos en bacterias lácticas	13
3.1. Metabolismo de carbohidratos en <i>L. plantarum</i>	19
II. OBJETIVOS	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	29
2. Medios y condiciones de cultivos	32
3. Técnicas de ADN	32
3.1. Extracción de ADN cromosómico	32
3.2. Extracción de ADN plasmídico	33
3.2.1. Extracción rápida	33
3.2.2. Extracción de alta pureza	34
3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR	34
3.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	35
3.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	36
3.6. Método de clonaje	36
3.6.1. Método de clonaje independiente de ligación (LIC)	36

3.6.2. Método de clonaje con enzimas de restricción	39
3.7. Secuenciación de ADN y análisis de la información	40
4. Transformación genética de cepas bacterianas	40
4.1. Transformación genética de <i>Escherichia coli</i>	40
4.2. Transformación genética de <i>Lactobacillus plantarum</i>	41
4.2.1. Interrupción genética en <i>L. plantarum</i>	42
5. Técnicas de proteínas	43
5.1. Hiperproducción y purificación de enzimas recombinantes	43
5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	46
5.3. Espectrometría de masas	46
5.4. Caracterización bioquímica de las enzimas glicosil hidrolasas	46
5.5. Cristalización	49
5.6. Análisis bioinformático	50
6. Ensayos de actividad enzimática	51
6.1. Análisis de carbohidratos derivados de <i>p</i> -nitrofenol	51
6.1.1. Análisis en células durmientes o quiescentes (<i>resting cell</i>)	52
6.1.2. Análisis en extractos proteicos	52
6.1.3. Análisis en proteínas puras	53
6.2. Análisis de carbohidratos naturales con proteínas puras	54
6.2.1. Análisis mediante HPLC-RID (HILIC)	55
6.2.2. Análisis mediante GC-FID	55
6.3. Análisis del perfil metabólico de carbohidratos mediante micromatrices fenotípicas (<i>Phenotype Microarray, PM</i>)	56
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
1. Estudio de la capacidad metabólica de <i>L. plantarum</i> WCFS1 sobre carbohidratos	
1.1. Identificación de actividades glicosil hidrolasa	61
1.2. Clonaje, producción y caracterización bioquímica de glicosil hidrolasas	69
1.2.1. Familia 1 (GH1)	76
1.2.1.1. Lp_2777	83
1.2.1.2. Lp_3525	90
1.2.2. Familia 13 (GH13)	95
1.2.2.1. Lp_0179 y Lp_2757	96
1.2.2.2. Lp_0263 y Lp_3220	107
1.2.3. Familia 32 (GH32): Lp_0187	116

1.2.4. Familia 36 (GH36): Lp_3485	123
1.2.5. Familia 42 (GH42): Lp_3469	130
1.2.6. Familia 78 (GH78): Lp_3471 y Lp_347.....	140
2. Relevancia funcional de las glicosil hidrolasas analizadas en el fenotipo de <i>L. plantarum</i> WCFS1	150
3. Análisis <i>in silico</i> de la presencia o ausencia de glicosil hidrolasas en distintas cepas de la especie <i>L. plantarum</i> y de otras especies pertenecientes al grupo <i>plantarum</i>	164
V. CONCLUSIONES	173
VI. BIBLIOGRAFÍA	177
VII. ANEXOS	205
Anexo I. Características principales de las glicosidasas de <i>L. plantarum</i> WCFS1 estudiadas en esta tesis doctoral	205
Anexo II. Estructuras de los carbohidratos derivados de <i>p</i> -NF utilizados en esta tesis (<i>ChemDraw® Professional 16.0</i>)	206
Anexo III. Estructuras de los carbohidratos naturales utilizados en esta tesis (<i>ChemDraw® Professional 16.0</i>)	207
Anexo IV. Matriz de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las glicosil hidrolasas caracterizadas en esta tesis (<i>Clustal Omega</i>)	208
Anexo V. Publicaciones derivadas de los resultados presentados en esta tesis...	209

Introducción

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes en los alimentos después del agua, además de ser los más ampliamente distribuidos que se pueden presentar bajo las formas de monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Son compuestos frecuentes en alimentos de origen vegetal debido a que se originan en procesos derivados de la fotosíntesis y tienen gran importancia en alimentación debido a su carácter energético y a su influencia sobre algunas propiedades sensoriales de los alimentos.

Lactobacillus plantarum es una especie de bacteria láctica que se encuentra en una amplia variedad de nichos con alto contenido en carbohidratos. El análisis de la secuencia del genoma de la cepa *L. plantarum* WCFS1 permitió identificar 55 proteínas anotadas en la base de datos CAZy como “glicosil hidrolasas” (GH) y que posiblemente estaban implicadas en el metabolismo de carbohidratos. Sin embargo, la mayoría de las proteínas presentes en las bases de datos no se han caracterizado experimentalmente.

Objetivos

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

1. Estudio de la capacidad metabólica de *L. plantarum* WCFS1 sobre carbohidratos.
2. Identificación y caracterización bioquímica de glicosil hidrolasas en *L. plantarum* WCFS1.
3. Relevancia de estas glicosil hidrolasas en el fenotipo de *L. plantarum* WCFS1.
4. Análisis *in silico* de la presencia/ausencia de glicosil hidrolasas en distintas cepas de la especie *L. plantarum* y de otras especies pertenecientes al grupo *plantarum*.

Resultados

En este trabajo se ha realizado la identificación y caracterización de un elevado número de las proteínas anotadas como glicosil hidrolasas en *L. plantarum* WCFS1. Estas proteínas pertenecen a seis familias distintas de glicosil hidrolasas (GH1, GH13, GH32, GH36, GH42 y GH78). Las proteínas caracterizadas presentan once diferentes actividades hidrolíticas sobre carbohidratos derivados de *p*-nitrofenilo entre las que se incluyen actividad α -D-maltosidasa, α -D-glucosidasa, 6-P- β -D-glucosidasa, α -D-maltopentaosidasa, β -D-galactosidasa, β -D-fucosidasa, α -L-arabinosidasa, α -L-ramnosidasa, α -D-galactosidasa, 6-P- β -D-galactosidasa y 6-P- β -D-tioglucohidrolasa. La identificación de la actividad bioquímica de estas glicosil hidrolasas se ha intentado relacionar con el metabolismo de carbohidratos y con el crecimiento en diversas fuentes de carbono mostrado por esta cepa. Para ello se han construido cepas mutantes carentes de una determinada glicosil hidrolasa específica. Se ha comprobado que estas mutaciones afectan al perfil de utilización de algunos carbohidratos originando múltiples perfiles fenotípicos en las cepas mutantes. Los resultados obtenidos reflejan la importancia de las glicosil hidrolasas en la adaptación de *L. plantarum* WCFS1 mediante la ausencia y/o presencia en su genoma de determinados genes que codifican estas glicosil hidrolasas y que le confieren la capacidad para crecer y utilizar determinados carbohidratos.

Conclusiones

La realización de esta tesis ha contribuido a demostrar la compleja y variada batería de glicosil hidrolasas implicadas en el metabolismo de carbohidratos que posee *L. plantarum* WCFS1. Además, este trabajo ha permitido identificar un amplio abanico de actividades enzimáticas en *L. plantarum* WCFS1 potencialmente útiles para su uso en la industria alimentaria.

Introduction

Carbohydrates are the most abundant organic compounds in food after water, as well as being the most widely distributed in the form of monosaccharides, oligosaccharides or polysaccharides. They are frequent compounds in foods of vegetable origin due to they originates in processes derived from photosynthesis and they have great importance in food due to their energetic character and their influence on some sensory properties of foods.

Lactobacillus plantarum is a species of lactic acid bacteria found in a wide variety of niches with a high carbohydrate content. Genome sequence analysis of the *L. plantarum* WCFS1 strain identified 55 proteins noted in the CAZY database as "glycosyl hydrolases" (GH) and possibly involved in carbohydrate metabolism. However, most of the proteins present in the databases have not been characterized experimentally.

Objectives

The specific objectives of this doctoral thesis are:

1. Study of the metabolic capacity of *L. plantarum* WCFS1 on carbohydrates.
2. Identification and biochemical characterization of glycosyl hydrolases in *L. plantarum* WCFS1.
3. Relevance of these glycosyl hydrolases in the phenotype of *L. plantarum* WCFS1.
4. In silico analysis of the presence/absence of glycosyl hydrolases in different strains of *L. plantarum* species and other species belonging to the *plantarum* group.

Results

In this work, a high number of proteins noted as glycosyl hydrolases in *L. plantarum* WCFS1 have been identified and characterized. These proteins belong to six different families of glycosyl hydrolases (GH1, GH13, GH32, GH36, GH42 and GH78). The characterized proteins exhibit eleven different hydrolytic activities on p-nitrophenyl-derived carbohydrates including activity α -D-maltosidase, α -D-glucosidase, 6-P- β -D-glucosidase, α -D-maltopentaosidase, β -D-galactosidase, β -D-fucosidase, α -L-arabinosidase, α -L-rhamnosidase, α -D-galactosidase, 6-P- β -D-galactosidase and 6-P- β -D-thioglucosidase. The identification of the biochemical activity of these glycosyl hydrolases has been attempted to relate to carbohydrate metabolism and growth in various carbon sources shown by this strain. For this purpose, mutant strains lacking a specific glycosyl hydrolase have been constructed. It has been proven that these mutations affect the utilization profile of some carbohydrates, originating multiple phenotypic profiles in the mutant strains. The results obtained reflect the importance of glycosyl hydrolases in the adaptation of *L. plantarum* WCFS1 by the absence and/or presence in its genome of certain genes encoding these glycosyl hydrolases and conferring it the ability to grow and use certain carbohydrates.

Conclusions

This thesis has contributed to demonstrate the complex and varied battery of glycosyl hydrolases involved in carbohydrate metabolism that *L. plantarum* WCFS1 possesses. Furthermore, this work has allowed the identification of a wide range of enzymatic activities in *L. plantarum* WCFS1 potentially useful for the food industry.

LISTA DE ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) (<http://old.iupac.org/publications/epub/index.html>), en esta tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
Amp	Ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
BAL	Bacteria láctica
BSA	Seroalbúmina bovina
CAZy	Enzimas activas sobre carbohidratos (<i>Carbohydrate-Active enZYmes</i>)
Cm	Cloranfenicol
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
dNTPs	Desoxinucleótidos-5'-trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
E_{cat}	Eficiencia catalítica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EK	Enteroquinasa
Em	Eritromicina
ϵ	Coeficiente de extinción molar
μF	Microfaradio
GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (<i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i>)
GH	Glicosil hidrolasa
GOS	Galactooligosacárido
GRAS	Generalmente reconocido como seguro para la salud (<i>Generally Recognized As Safe</i>)
h	Hora

HPLC-RID (HILIC)	Cromatografía líquida de alta resolución- Detector de índice de refracción (Interacción hidrofílica) (<i>High Performance Liquid Chromatography-Refractive Index Detector (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)</i>)
Hz	Hercio
IQFR	Instituto de Química-Física Rocasolano
IMG	Sistema integrado de genomas microbianos (<i>Integrated Microbial Genomes</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
k_{cat}	Constante catalítica
kDa	Kilodalton
K_M	Constante de Michaelis-Menten
kV	Kilovoltio
LC-RID (HILIC)	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica con detector de índice de refracción (<i>Liquid Chromatography-Refractive Index Detector-Hydrophilic Interaction Chromatography</i>)
LIC	Clonaje independiente de ligación (<i>Ligation Independent Cloning</i>)
LB	Medio de cultivo de Luria y Bertani
M	Molar
mA	Miliamperio
MES	Ácido 2-etanosulfónico
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
μ mol	Micromol
min	Minuto
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
μ g	Microgramo
MCS	Sitio de clonaje múltiple
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MRS	Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe
MRS*	Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe modificado
m/z	Relación de iones masa/carga
NCBIInr	Centro Nacional para la Información Biotecnológica-secuencias no redundantes (<i>National Center for Biotechnology Information-non redundant</i>)

NCIMB	Colección Nacional de Bacterias Industriales Marinas y Alimentarias (<i>National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria</i>)
NC-IUBMB	Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
ng	Nanogramo
nL	Nanolitro
nm	Nanometro
ns	Nanosegundo
<i>p</i>	P-valor
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
pI	Punto isoeléctrico
PM	Micromatriz fenotípica (<i>Phenotype Microarray</i>)
<i>p</i> -NF	<i>p</i> -Nitrofenilo
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEP-PTS	Sistema de translocación de fosfoenolpiruvato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
psi	Libra por pulgada cuadrada (<i>pounds-force per square inch</i>) equivalente a kg/cm ²
R	Resistente
RBS	Sitio de unión al ribosoma
rpm	Revolución por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
sp.	Especie
subsp.	Subespecie
SIB	Instituto de Bioinformática Suizo (<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>)
T	Cepa tipo
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TE	Tris-EDTA
TES	Tris-EDTA-NaCl
TFA	Ácido trifluoroacético

TGI	Tracto gastrointestinal
t_R	Tiempo de retención
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad
UE	Actividad enzimática específica
5'-UMP	Ácido 5'-uridílico o monofosfato de uridina
UV	Ultravioleta
V	Voltio
V_{max}	Velocidad máxima
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
Ω	Resistencia

Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

VII. ANEXOS

1. Carbohidratos en alimentos

Después del agua, los carbohidratos son los componentes más abundantes en los alimentos, además de ser los más ampliamente distribuidos. Se trata de compuestos orgánicos de gran importancia en alimentación debido a su función como nutrientes energéticos y a que influyen en algunas de las propiedades sensoriales de los alimentos, como en su consistencia, sabor, color, aroma, textura y palatabilidad (Bello Gutiérrez, 2000).

Los carbohidratos son compuestos frecuentes en alimentos de origen vegetal como cereales, leguminosas, tubérculos, verduras y frutas debido a que se originan en procesos derivados de la fotosíntesis. No obstante, también se encuentran en productos de origen animal, como la leche (**Figura 1**) (Bello Gutiérrez, 2000).

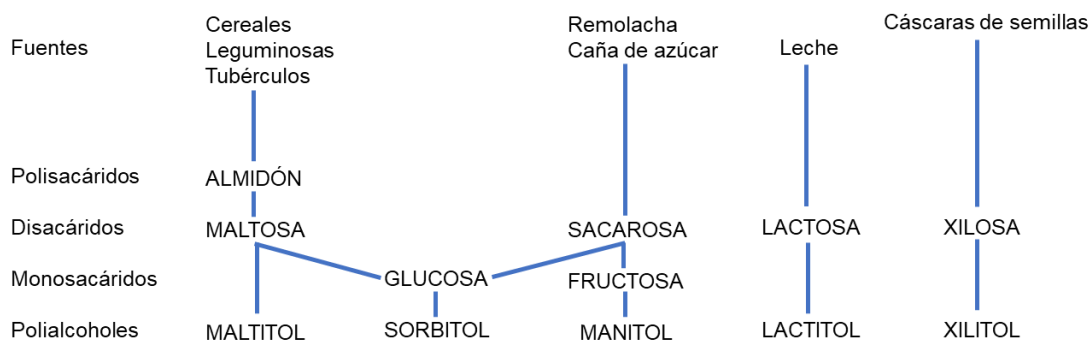


Figura 1. Origen de algunos carbohidratos alimentarios (adaptado de Bello Gutiérrez, 2000).

Desde el punto de vista químico se denominan carbohidratos a los compuestos orgánicos que en su estructura química sólo contienen carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O), estos últimos en una proporción semejante a la del agua (Bello Gutiérrez, 2000). Responden a la siguiente fórmula básica $C_x(H_2O)_y$. Se clasifican en dos grupos: -osas y -ósidos. Las primeras incluyen aquellos carbohidratos que no se escinden en estructuras más sencillas mediante hidrólisis ácida. En cambio, los segundos resultan de la asociación de varias moléculas de -osas, que mediante hidrólisis ácida dan lugar a -osas más simples.

En ocasiones también incluyen moléculas no glucídicas, por lo que se distinguen entre -holósidos, que son oligosacáridos y polisacáridos en los que sólo intervienen -osas, y -heterósidos, que además de -osas simples, poseen una fracción no glucídica denominada aglicona (Bello Gutiérrez, 2000).

En los alimentos, los carbohidratos se pueden presentar bajo las formas de monosacáridos, oligosacáridos o polisacáridos. Los monosacáridos son aldehídos o cetonas polihidroxilados, que pueden contener cinco átomos de carbono como las pentosas o seis átomos como las hexosas. Los oligosacáridos están formados por cadenas de dos a diez moléculas de monosacáridos y pertenecen a dos grupos diferentes en función del tipo de enlace: reductores, si en el enlace sólo interviene un grupo lactol (lactosa y manosa) y no reductores, en los que el enlace tiene lugar por una condensación entre dos grupos lactoles (sacarosa). Y, por último, los polisacáridos, que son polímeros formados por cadenas desde diez monosacáridos hasta varios miles de ellos, unas veces como bloques de azúcares simples y otras con algunos de sus derivados (Bello Gutiérrez, 2000).

Los carbohidratos se pueden extraer de fuentes muy diversas, como materias vegetales, algas marinas o cultivos bacterianos. Sus funciones biológicas también son muy variadas, pueden tener función estructural, nutricional, defensiva y como material de desecho. En la **Figura 2** se muestran aquellos carbohidratos que, por su presencia en alimentos, tienen interés para la industria alimentaria (Bello Gutiérrez, 2000).

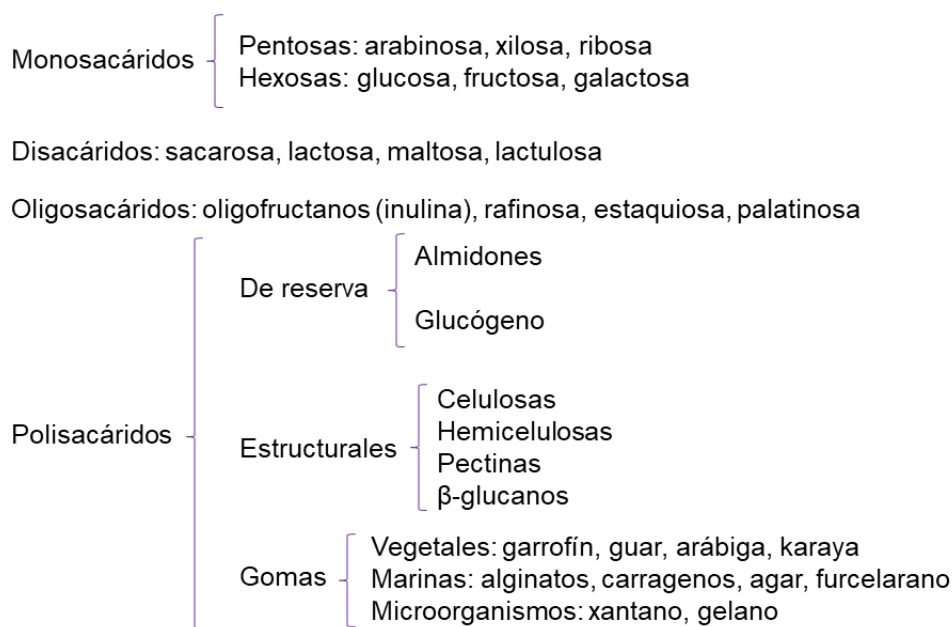


Figura 2. Principales carbohidratos en alimentos con interés bromatológico (adaptado de Bello Gutiérrez, 2000).

1.1. Monosacáridos

Los monosacáridos o azúcares simples, se encuentran en muy pocos alimentos bajo su forma libre, ya que lo normal es que se encuentren formando parte de estructuras más complejas o en combinación con otras moléculas orgánicas (Bello Gutiérrez, 2000).

Entre las pentosas destacan por su interés L-arabinosa, D-ribosa y D-xilosa. La L-arabinosa es uno de los componentes de gomas, mucílagos y pectinas, y se suele obtener mediante hidrólisis de la pulpa de remolacha. La D-ribosa es un componente de la riboflavina y de los ácidos ribonucleicos. La D-xilosa forma macromoléculas de pentosas en las mazorcas de maíz, paja de cereales y cáscaras de algunas semillas (Adams y Moss, 1997).

De las tres hexosas de interés alimentario, sólo glucosa y fructosa se suelen encontrar bajo sus formas libres (Alais y Linden, 1989). La D-glucosa se encuentra localizada en raíces, hojas, flores y savia, abunda en frutas y verduras, así como en la miel de las abejas. Su principal fuente comercial es el almidón hidrolizado. La D-fructosa es la única cetohehexosa que se encuentra en alimentos

en cantidades elevadas. Se suele encontrar en zumos de frutas y plantas, además de en la miel, posiblemente por la hidrólisis de sacarosa. La D-galactosa, que forma parte de la lactosa, el azúcar de la leche, también está presente en algunas gomas y mucílagos (Bello Gutiérrez, 2000).

Los monosacáridos también pueden experimentar modificaciones posteriores, como por ejemplo la fosforilación mediante la adición de grupos fosforilo. La fosforilación de los carbohidratos ocasiona que se conviertan en compuestos aniónicos lo que conduce a que no puedan abandonar libremente la célula a través de la bicapa lipídica de la membrana, manteniendo así su función en el metabolismo de la célula. La fosforilación también origina intermediarios reactivos, importantes en la formación de nucleótidos de purina y pirimidina (Stryer et al., 2013).

1.2. Oligosacáridos

Los oligosacáridos se originan por la unión de dos a 10 monosacáridos mediante enlaces O-glicosídicos. Los carbohidratos complejos son moléculas muy variadas debido a que existe una amplia variedad de monosacáridos, cada uno de ellos con varias formas isoméricas, y a que cada monosacárido posee numerosos grupos hidroxilo capaces de enlazarse a otros monosacáridos (Stryer et al., 2013).

De los numerosos disacáridos y oligosacáridos que existen, los que presentan mayor interés alimentario son la sacarosa y la lactosa. La sacarosa (α D-Glu-(1,2)- β D-Fruc) es un disacárido no reductor que se encuentra de forma libre en muchas plantas y en la miel de abeja (Anzaldúa-Morales, 1994). Sus fuentes comerciales son la caña de azúcar y la remolacha azucarera. Se suele utilizar como aditivo debido a sus propiedades de dulzor, resistencia hidrolítica, formación de geles, control de la actividad del agua, y conservación de alimentos, entre otras. La lactosa (β D-Gal-(1,4)- β D-Glu) es el azúcar de la leche y se encuentra en numerosos productos lácteos, siendo utilizada como edulcorante natural o como agente conservante (Belitz y Grosch, 1997). A veces presenta el

inconveniente de formar cristales, dotando a los alimentos de una textura arenosa (Bello Gutiérrez, 2000).

Un derivado artificial de la lactosa es la lactulosa (β -galactosil-fructosa) que es un disacárido reductor con un poder edulcorante superior a la lactosa (Belitz y Grosch, 1997). La lactulosa se ha empleado en clínica como laxante ya que ésta no se absorbe en el intestino delgado y su digestión a nivel de colon tiene lugar con un bajo rendimiento energético. Actualmente se está incluyendo en leches infantiles ya que se caracteriza por ser un nutriente para bacterias del género *Bifidobacterium*.

La maltosa (α D-Glu-(1,4)- α D-Glu) se encuentra en aquellos alimentos donde se ha producido una hidrólisis parcial de almidón. Normalmente no aparece en su forma libre excepto en germinados de cebada. La maltosa se utiliza fundamentalmente en leches infantiles, así como en las industrias cervecera y panadera (Bourgeois et al., 1994).

Los fructooligosacáridos (FOS) son β -D-fructanos no digeribles que se componen de unidades de fructosa unidas por enlaces β (2-1) que, junto a la inulina, formada por la condensación de varias unidades de D-fructosa.

Otros oligosacáridos derivados de la galactosa que se encuentran en pequeñas cantidades en alimentos son rafinosa, estaquiosa y palatinosa (isomaltulosa) (Bello Gutiérrez, 2000).

En la actualidad algunos de estos oligosacáridos tienen mucho interés debido a su función como prebióticos (Cheftel J. C y Cheftel H.,1999). Los prebióticos son ingredientes no digeribles utilizados por la microbiota intestinal estimulando el crecimiento de bacterias beneficiosas para la salud (Roberfroid, 2010). El empleo de glicosidasas y glicansacarasas de origen microbiano para la síntesis de prebióticos ofrece múltiples ventajas en cuanto a su regio- y estereoselectividad, eficacia, diversidad y sostenibilidad para el diseño de nuevos oligosacáridos y/o derivados con propiedades bioactivas (Diez-Municio et al., 2014; Schmid et al., 2016).

1.3. Polisacáridos

Los polisacáridos ofrecen interesantes propiedades tecnológicas que están determinadas, entre otros, por el tipo y la estructura de los monosacáridos que los componen, por los grupos funcionales que poseen y por la estructura y conformación de la macromolécula. Por lo general, los polisacáridos son moléculas muy hidrofílicas que pueden producir incrementos en la viscosidad, lo que les confiere propiedades espesantes, estabilizantes y/o gelificantes (Bello Gutiérrez, 2000).

Entre los polisacáridos se incluyen los polisacáridos que cumplen una función de reserva, como los almidones vegetales y el glucógeno animal, y los polisacáridos que desempeñan una función estructural, como las celulosas, hemicelulosas, pectinas y β -glucanos. También se incluyen entre los polisacáridos las gomas y los mucílagos (Bello Gutiérrez, 2000).

El almidón es el carbohidrato de reserva de las plantas superiores y se encuentra en los granos de cereal, legumbres, tubérculos, raíces y bulbos. Su presencia en la dieta tiene la consideración de nutriente energético. Se encuentra formado por los polímeros amilosa (glucosas unidas por enlaces α -(1,4) y amilopectina (glucosas unidas por enlaces α -(1,4), con ramificaciones α -(1,6) (Derache, 1990; Dupin et al., 1997). Se utiliza como aditivo para favorecer el espesamiento y la gelificación.

El glucógeno es el carbohidrato de reserva en los mamíferos, está poco presente en alimentos, aunque se puede encontrar en ostras, mejillones e hígados (Bello Gutiérrez, 2000).

Respecto a los polisacáridos estructurales, la celulosa es un homopolisacárido formado por unidades de β -glucosa unidas mediante enlaces β -(1,4) y constituye el biopolímero más abundante en la naturaleza, que está presente en la mayor parte de la biomasa terrestre (Eley, 1994). La celulosa se puede utilizar en tecnología de alimentos como agente dispersante, que confiere volumen al alimento, retiene la humedad y favorece su digestión (Bello Gutiérrez, 2000).

Las hemicelulosas se encuentran en las paredes celulares de los vegetales. Son polímeros formados por unidades de arabinosa, xilosa, manosa, galactosa o glucosa, algunos de ellos unidos a ácidos urónicos en la posición seis. Un tipo de hemicelulosas son los arabinoxilanos que se encuentran en las harinas de los cereales, y pueden originar pentosas hidrosolubles. Estos polisacáridos no son digeribles por las enzimas digestivas humanas por lo que se consideran integrantes de la fibra dietética (Bello Gutiérrez, 2000).

La pectina se localiza frecuentemente en los espacios intercelulares de las paredes de manzanas y cítricos (Fennema, 1993). La pectina es una sustancia polimérica de elevado peso molecular formada por unidades de ácido galacturónico unidas por enlaces β -(1,4) cuyos grupos carboxilos están parcialmente esterificados en forma de metoxilos. En las cadenas laterales de la pectina se pueden encontrar residuos de galactosa, ramnosa y arabinosa. Debido a que presenta enlaces no digeribles por las enzimas digestivas humanas, se clasifica dentro de la llamada fibra dietética soluble. Esta fibra se puede fermentar en el colon por la microbiota presente y producir ácidos grasos de cadena corta, que son absorbidos de modo directo por la mucosa intestinal. A las pectinas se les ha atribuido un efecto negativo para la salud humana, como es la captación de algunos minerales esenciales, aunque este efecto no está demostrado. Por el contrario, la pectina promueve la eliminación fecal de esteroides, disminuye el colesterol en sangre, y retrasa la absorción intestinal de glucosa, efecto muy beneficioso para los diabéticos dependientes de insulina (Bello Gutierrez, 2000).

El β -glucano, es otro polisacárido estructural que está compuesto por unidades de β -glucosa unidas por enlaces β -(1,3) y β -(1,4), que se encuentra en la avena, y que, debido a su viscosidad, reduce los niveles de LDL-colesterol. Se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales el β -glucano produce hipocolesterolemia, uno de ellos es que la formación de geles viscosos en el tracto gastrointestinal produce la disminución de la absorción de colesterol dietético con un aumento de la excreción de ácidos biliares (Aparicio Vizueté y Ortega Anta, 2015).

Otro tipo de polisacáridos son las gomas y mucílagos, los cuales se utilizan como espesantes, gelificantes y estabilizantes y que se encuentran

presentes, en algunos extractos de semillas y raíces (galactomananos) y exopolisacáridos de microorganismos como la goma xantano (Hanssen y Marsden, 1984), alginatos (Hernández y Sastre, 1999), agar-agar y carragenatos (Bello Gutierrez, 2000).

2. Glicosil hidrolasas

Las glicosil hidrolasas (GH) (EC 3.2.1.-) son un numeroso grupo de enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de enlaces O- u S- glicosídicos entre dos carbohidratos, o entre un carbohidrato y un resto no glucídico. Estas enzimas tienen un gran interés biotecnológico, tanto en diversas industrias alimentarias, como en la producción de productos naturales, incluyendo prebióticos (Sathya y Khan, 2014).

2.1. Clasificación

Las GH se pueden clasificar según su estructura, atendiendo a su similitud de secuencia, según su especificidad de sustrato y en función de su mecanismo de acción.

2.1.1. Clasificación según su estructura

En 1991 Henrissat propuso una clasificación de las glicosil hidrolasas basada en la similitud de secuencia de aminoácidos (Henrissat, 1991). Debido a que existe una relación directa entre la similitud de secuencia y de plegamiento, esta clasificación refleja mejor las características estructurales de estas enzimas, pudiendo revelar relaciones evolutivas entre ellas. Esta clasificación evidencia la dificultad de relacionar entre la pertenencia a una familia y la especificidad de sustrato.

En el año 1998 se creó la base de datos *Carbohydrate Active enZymes* (CAZy) (<http://www.cazy.org>) dedicada al análisis de la información genómica, estructural y bioquímica de las enzimas activas sobre carbohidratos, entre las que se encuentran las glicosidasas o glicosil hidrolasas (GH). En esta base de datos las GH se agrupan en familias creadas en función de la evidencia de la actividad bioquímica de al menos un miembro de la familia. Según la base de datos CAZy, las glicosil hidrolasas se agrupan en 167 familias, algunas de ellas a su vez divididas en subfamilias, como es el caso de las familias GH5, GH13, GH16, GH30 y GH43. Debido a que la estructura de las proteínas evolutivamente se conserva más que su secuencia de aminoácidos, algunas familias también se agrupan en clanes diferentes (GH-A hasta GH-R). Esto ocurre cuando una proteína está relacionada con más de una familia o cuando su estructura muestra similitud con miembros de otras familias (Henrissat y Bairoch, 1996).

2.1.2. Clasificación según su especificidad de sustrato

Según el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), las glicosil hidrolasas se dividen en distintas subclases (aproximadamente 280) en función de los diferentes sustratos sobre los que actúan y se les asigna un código diferente (EC 3.2.1.xx) (www.enzyme-database.org). No obstante, se decidió mantener los nombres sistemáticos como base para la clasificación ya que el número de código sólo es útil cuando se dispone de una lista de clasificación con el nombre de las enzimas, mientras que el nombre sistemático se explica por sí mismo. Los nombres sistemáticos indican el tipo de reacción y son útiles para encontrar nombres comunes que se ajustan a las reglas generales de clasificación.

Además, las glicosil hidrolasas pueden ser exo- o endo- en función de su capacidad para romper un sustrato en el extremo (siendo más frecuentemente por el extremo no reductor) o en el interior de la cadena, respectivamente (Davies y Henrissat, 1995).

2.1.3. Clasificación según su mecanismo catalítico

El mecanismo químico de catálisis de las glicosil hidrolasas puede realizarse mediante inversión o mediante retención de la configuración del carbono anomérico (**Figura 3**). En el mecanismo de inversión generalmente interviene un residuo de glutámico o aspártico (Glu/Asp) que actúa como ácido y un residuo de triptófano (Trp) que actúa como base. Se produce una protonación del oxígeno por parte del ácido y un ataque nucleófilo por parte de una molécula de agua activada previamente por la base (**Figura 3A**) (Gloster et al., 2008). Por otro lado, el mecanismo de retención (**Figura 3B**) implica un desplazamiento doble a través de un intermedio covalente donde uno de los residuos enzimáticos actúa como nucleófilo (generalmente un residuo de Glu) y el otro como un ácido o una base general (normalmente un residuo de Glu) (Gloster et al., 2008). En el caso de las sialidasas (que hidrolizan S-glicósidos) el nucleófilo suele ser un residuo de tirosina (Tyr) (Koshland, 1956).

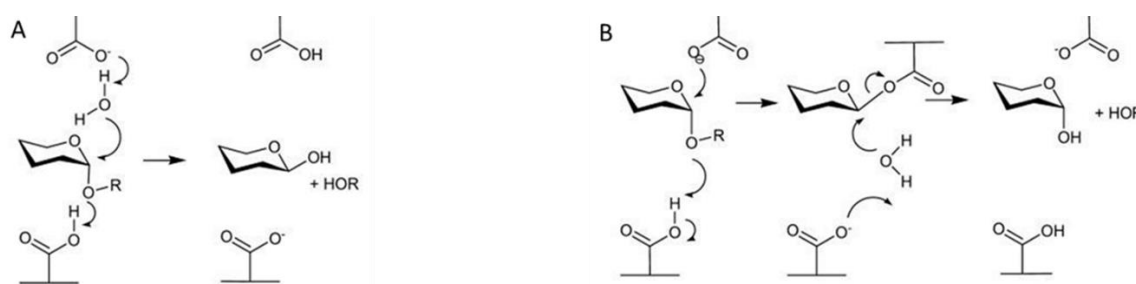


Figura 3. Mecanismo catalítico de glicosil hidrolasas. (A) mecanismo de inversión, (B) mecanismo de retención (Gloster et al., 2008).

Se han descrito variaciones en estos mecanismos de acción. En uno de estos mecanismos modificados el ácido glutámico está reemplazado por una glutamina, disminuyendo así la repulsión (Tiels et al., 2012). Este mecanismo ocurre en α -manosidasas de la familia GH92 y en mirosinasas de la familia GH1. Las mirosinasas hidrolizan glucosinolatos y en ellas el ácido glutámico está sustituido por glutamina y por una base exógena como es la coenzima L-ascorbato (Burmeister et al., 2000).

2.2. Aplicaciones de las glicosil hidrolasas en la industria alimentaria

El uso de métodos químicos tradicionales para el procesado de los carbohidratos provoca un aumento de los costes y una disminución en el rendimiento obtenido. Por ello, en los últimos años, la utilización de enzimas capaces de hidrolizar carbohidratos se ha convertido en una alternativa muy interesante, debido a la estereoselectividad y eficacia de las mismas (Bojarová y Křen, 2009). A pesar de que el uso de glicosil hidrolasas en la industria alimentaria está creciendo rápidamente, se considera insuficiente el número de enzimas disponibles para cubrir la enorme demanda que existe actualmente. Los avances tanto en tecnología como el amplio conocimiento de la biología molecular han impulsado la investigación de nuevas glicosidasas o glicosidasas modificadas con aplicaciones específicas con una mayor eficacia catalítica (Sathya y Khan, 2014). Además, el empleo de glicosil hidrolasas de origen microbiano es una alternativa adecuada para la disponibilidad de nuevas enzimas puesto que ofrecen múltiples ventajas en cuanto a su regio- y estereoselectividad, eficacia, diversidad y sostenibilidad para el diseño de nuevos oligosacáridos y/o derivados con propiedades bioactivas (Díez-Municio et al., 2014; Shmid et al., 2016).

El chequeo inicial de las actividades hidrolíticas de las glicosidasas empleando carbohidratos derivados de *p*-nitrofenilo (*p*-NF) suele ser un paso inicial para verificar su actividad hidrolítica. Entre las glicosil hidrolasas destacan por su interés especialmente las α - y β -galactosidasas, α -glucosidasas, α -amilasas, α -ramnosidasas y glicosil hidrolasas que actúan sobre carbohidratos fosforilados, entre otras.

El interés de las α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) deriva de sus potenciales aplicaciones tecnológicas y medicinales. La aplicación industrial más importante de estas glicosil hidrolasas es en la industria del azúcar de remolacha, la industria de la pulpa y el papel, así como en el procesamiento de piensos (Carrera-Silva et al., 2006). También existe un alto interés en medicina por enzimas con actividad α -galactosidasa ya que se utilizan en la transformación del grupo sanguíneo, en el tratamiento de la enfermedad de Fabry y en xenotransplantes (Gote et al., 2006).

En la industria alimentaria, las β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) se utilizan por su capacidad para hidrolizar lactosa y sintetizar galactooligosacáridos (GOS) prebióticos. Entre ellas, existen β -galactosidasas activas a temperaturas extremas, o en presencia de sales utilizadas para mejorar la conversión catalítica de lactosa (Iqbal et al., 2010; Kittibunchakul et al., 2019).

Las α -glucosidasas (EC 3.2.1.20) poseen un gran interés en biomedicina como señalizadores de rutas metabólicas (Kim et al., 2017), su papel en las interacciones patógeno-hospedador, tratamientos frente a la diabetes, sus habilidades biosintéticas para el desarrollo de tejidos orgánicos y su uso en degradación de materiales vegetales u obtención de productos del almidón (Jeon et al., 2015).

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) catalizan la hidrólisis de enlaces glucano α -(1,4) internos liberando maltosa. Este tipo de enzimas se encuentran dentro de las enzimas industriales más conocidas e importantes, con numerosas aplicaciones en el procesado del almidón, producción de alcohol, elaboración de cerveza, sector textil e industria del papel (Souza y Magalhães, 2010). La maltosa es un compuesto muy utilizado en la industria alimentaria, biomédica y química (Jeon et al., 2016). La actividad hidrolítica de las α -amilasas también es de gran interés en la industria farmacéutica para el uso de la maltosa como posible sustituyente de la D-glucosa en la alimentación intravenosa (Outtrup y Norman, 1984).

Desde su descubrimiento, las α -ramnosidasas (EC 3.2.1.40) han tenido distintas aplicaciones en la industria alimentaria, como pueden ser la elaboración de zumos cítricos o su uso como edulcorantes. Estas enzimas se pueden utilizar para aumentar la biodisponibilidad de algunos polifenoles como la hesperidina, una flavanona glucósido encontrada en cítricos que puede tener diversos efectos beneficiosos en la salud (Ávila et al., 2009). La mejora de la biodisponibilidad de los flavonoides se ha asociado con un menor riesgo de padecer enfermedades coronarias (Hertog et al., 1993). Las α -ramnosidasas también poseen relevancia en la industria farmacéutica para su uso como precursores en la preparación de distintos fármacos puesto que la ramnosa es crucial como intermediario en la síntesis orgánica de fármacos (Yadav et al., 2010). En los últimos años, también ha aumentado el interés por el uso de α -ramnosidasas en la industria del vino.

Compuestos volátiles como el linalool, geraniol, nerol o citronelol son α -terpenos responsables del aroma del vino que están presentes en la piel de la uva de forma que la presencia de estas enzimas potencia su liberación, modificando así sus propiedades organolépticas (Yadav et al., 2010).

Otros carbohidratos interesantes para las industrias alimentaria, cosmética y de detergentes son los carbohidratos fosforilados. Estos carbohidratos se utilizan como precursores para la síntesis de carbohidratos activados por nucleótidos y como intermediarios en la síntesis de carbohidratos complejos. Las glicosidasas con actividades fosfo- β -glucosidasa (EC 3.2.1.86) y fosfo- β -galactosidasa (EC 3.2.1.85) son interesantes para la síntesis de oligosacáridos ya que su utilización supone un abaratamiento de costes frente a los elevados costes que ocasiona la síntesis química de los mismos (Wildberger et al., 2015).

Por último, otra actividad hidrolítica interesante que se ha encontrado en proteínas de la familia GH1 es la actividad β -tioglucosidasa o mirosinasa (EC 3.2.1.147). Las tioglucosidasas son enzimas que se encuentran de forma natural en las plantas crucíferas y tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de glucosinolatos (tioglicósidos) a isotiocianatos, atribuyéndose a estos últimos compuestos potentes propiedades anticancerígenas. También se ha descrito que poseen capacidad de regular genes que codifican proteínas protectoras frente al estrés oxidativo o la inflamación (Brown y Hampton 2011; Mi et al., 2011), actividad antibiótica frente a *Helicobacter pylori* (Fahey et al., 2002), y otras propiedades preventivas frente a diferentes enfermedades crónicas (Fahey et al., 2017).

3. Metabolismo de carbohidratos en bacterias lácticas

Las bacterias lácticas se definen como un grupo de microorganismos Gram-positivos con forma de cocos o bacilos, microaerófilos y no esporulados, que llevan a cabo la fermentación de carbohidratos produciendo como principal metabolito ácido láctico (Makarova et al., 2006; Bachmann et al., 2017). Englobadas dentro de este grupo se incluyen varias especies con gran interés

industrial pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella* (Holzapfel y Wood, 1995). La mayoría de las bacterias lácticas son inocuas para los humanos, por lo que se consideran seguras o GRAS (*Generally Recognized As Safe*) para el consumidor (Makarova et al., 2006). Estas bacterias se usan ampliamente en la industria alimentaria. Además de su uso como cultivos iniciadores, se han empleado para la producción de compuestos aromatizantes, péptidos antimicrobianos y otros metabolitos que contribuyen a la mejora de las propiedades sensoriales y nutritivas de los alimentos, así como para alargar su vida útil (Nguyen et al., 2011). Las bacterias lácticas se aíslan de numerosos nichos ecológicos, desde el tracto gastrointestinal humano, de animales e insectos, hasta plantas, suelos y aguas, lo que da una idea de la habilidad de este tipo de bacterias para colonizar numerosos ecosistemas, debido a su capacidad para metabolizar gran variedad de carbohidratos (Buron-Moles et al., 2019).

Entre las bacterias lácticas, *Lactococcus lactis* es la especie más estudiada por lo que constituye un modelo para el resto de bacterias lácticas. En *L. lactis* se ha descrito que los carbohidratos presentes en el medio pasan al interior celular a través de la membrana citoplasmática mediante transportadores. Fundamentalmente, existen tres tipos de transportadores de carbohidratos en bacterias. El primero de ellos es el sistema fosfotransferasa o sistema de translocación de fosfoenolpiruvato (PEP-PTS), mediante el cual los carbohidratos se introducen al interior celular acoplados a su fosforilación (Postma et al., 1993). En segundo lugar, también existen sistemas de transporte secundario en los que la captación de los carbohidratos se encuentra ligada a un gradiente iónico a través de permeasas (Poolman, 1993). Y, por último, existen sistemas de transporte primario tipo ABC donde se produce una translocación del carbohidrato al interior celular acoplado a la hidrólisis de ATP, que es llevada a cabo mediante ATPasas (Fath y Kolter, 1993). Desde el punto de vista bioenergético, el sistema de transporte PTS es probablemente el más eficiente, ya que el carbohidrato se transloca y fosforila en un solo paso a expensas de una molécula de PEP (equivalente a una molécula de ATP, ya que durante la glicólisis una molécula de ATP deriva de una de PEP). En cambio, en el caso de

los carbohidratos que se acumulan activamente por sistemas de transporte no PTS, se debe gastar más de un equivalente de ATP tanto para el transporte como para la fosforilación subsiguiente (Neves et al., 2005).

El metabolismo de lactosa, glucosa y galactosa es de especial relevancia para la industria láctea (**Figura 4**). El principal sistema de transporte que media el transporte de glucosa en *L. lactis* es el sistema de PTS-manosa que, además de la glucosa, transporta 2-deoxi-D-glucosa, manosa, glucosamina y fructosa (Bull, 2007). Algunas cepas de *L. lactis* poseen además un segundo sistema de PTS-glucosa, que presenta especificidad para glucosa y α -metil-glucósido (Thompson y Saier, 1981). Alternativamente, la glucosa también se puede transportar mediante una permeasa y posteriormente fosforilarse por acción de una glucoquinasa dependiente de ATP (Thompson et al., 1985). La lactosa también se puede translocar por un sistema PTS-lactosa para producir lactosa 6-fosfato o por una permeasa (Vos et al., 1990; Vos y Vaughan, 1994). La lactosa 6-fosfato, posteriormente se hidroliza produciendo galactosa 6-fosfato y glucosa. La glucosa formada se fosforila a glucosa-1-fosfato que puede seguir la glicólisis, mientras que la galactosa 6-fosfato se introduce en forma de los intermediarios glicolíticos dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (Thompson, 1979; Crow y Thomas, 1984). En el caso del transporte de lactosa a través de una permeasa, ésta se hidroliza produciendo glucosa y galactosa. La galactosa se metaboliza en glucosa 1-fosfato que por isomerización pasa a glucosa 6-fosfato que entra en la vía glicolítica. Por analogía con el metabolismo de la lactosa, la galactosa se metaboliza por la vía de la tagatosa 6-fosfato cuando se transloca mediante el sistema PTS-galactosa, o también se puede transportar por permeasas (Thomas et al., 1980).

Otros dos azúcares importantes en la industria alimentaria son la fructosa y la sacarosa (**Figura 4**).

permeasa dependiente de ATP y se convierte en glucosa y β -glucosa 1-fosfato por la acción de una maltosa fosforilasa dependiente de fósforo inorgánico. La anomerización de la β -glucosa 1-fosfato en glucosa 1-fosfato y la entrada en la vía glicolítica se cataliza por medio de una β -fosfoglucomutasa específica. Esta última enzima también participa en el metabolismo de la trehalosa, que entra en la célula a través de un sistema de PTS-trehalosa produciendo trehalosa 6-fosfato que se convierte a su vez en glucosa 6-fosfato y β -glucosa 1-fosfato a través de la trehalosa 6-fosfatofosforilasa (Andersson et al., 2001).

Como ya se ha comentado, las bacterias lácticas son adecuadas y seguras para la industria alimentaria debido a que están reconocidas con el estatus *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*). Por lo tanto, las enzimas derivadas de estos organismos se pueden utilizar en aplicaciones relacionadas con la alimentación (Iqbal et al., 2010). Se han estudiado algunas glicosil hidrolasas procedentes de bacterias lácticas que están implicadas en el metabolismo de carbohidratos.

Los lactobacilos y las bifidobacterias persisten en el tracto gastrointestinal (TGI) de los seres humanos y poseen α -galactosidasas (EC 3.2.1.22) capaces de producir α -galactooligosacáridos (α -GOS) que pueden ser utilizados como prebióticos (Goh y Klaenhammer, 2015). La actividad α -galactosidasa en lactobacilos fue descrita inicialmente por Mital et al. (1973). Algunas especies de lactobacilos como *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *L. reuteri* poseen α -galactosidasas (MeIA), algunas de las cuales se han caracterizado bioquímicamente y se ha estudiado su capacidad de transglicosilación, así como la actividad prebiótica de los α -galactooligosacáridos (α -GOS) formados (Garro et al., 1993; Silvestroni et al., 2002; Tzortzis et al., 2003; LeBlanc et al., 2004).

Las β -galactosidasas (EC 3.2.1.23) usan predominantemente lactosa como sustrato y se utilizan en la industria láctea, así como para la síntesis de β -galactooligosacáridos (β -GOS) como prebióticos (Iqbal et al., 2010; Schwab et al., 2010). Tanto en *Lactobacillus* como en otras bacterias lácticas se han estudiado algunas β -galactosidasas. Entre otras, se han caracterizado bioquímicamente las β -galactosidasas LacZ, de *Bifidobacterium infantis* HL96 (Hung et al., 2001) y LacLM, de *L. plantarum* (Iqbal et al., 2010; Schwab et al., 2010).

Las α -glucosidasas (EC 3.2.1.20) son enzimas muy utilizadas en la degradación de sustratos vegetales (Jeon et al., 2015). La primera vez que se detectó actividad α -glucosidasa en una bacteria láctica fue en *Lactobacillus acidophilus* (Li y Chan, 1983). Además, se han caracterizado a nivel bioquímico y genético varias α -glucosidasas presentes en cepas del género *Lactobacillus* (De Cort et al., 1994; Kang et al., 2009; Møller et al., 2012; Delgado et al., 2017).

Las enzimas con actividad α -amilasa (EC.3.2.1.1) presentan numerosas aplicaciones en el procesado del almidón, producción de alcohol, elaboración de cerveza, sector textil e industria del papel (Souza y Magalhães, 2010). Se han descrito y estudiado actividades amilolíticas en bacterias lácticas como *Lactobacillus manihotivoran* (Morlon-Guyot et al., 2001), *Lactobacillus amylophilus* GV6 (Vishnu et al., 2000), *Lactobacillus plantarum* A6 (Giraud et al., 1994), *Streptococcus bovis* JB1 (Freer, 1993), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84 (Petrov et al., 2008), *Lactobacillus plantarum* S21 (Kanpiengjai et al., 2015) y *Enterococcus faecium* (Shibata et al., 2007).

Las α -ramnosidasas (EC 3.2.1.40) se pueden utilizar para la elaboración de edulcorantes en la industria alimentaria o para aumentar la biodisponibilidad de hesperidina, que presenta diversos efectos beneficiosos en la salud (Ávila et al., 2009). La mayoría de las α -ramnosidasas caracterizadas actualmente provienen de bacterias Gram positivas, entre las cuales se encuentran bacterias lácticas como *Lactobacillus plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009), *Lactobacillus acidophilus* (Beekwilder et al., 2009) y *Pediococcus acidilactici* (Michlmayr et al., 2011).

Además, las actividades fosfo- β -glucosidasa (EC 3.2.1.86) y fosfo- β -galactosidasa (EC 3.2.1.85) son interesantes para la síntesis de oligosacáridos ya que su utilización supone una reducción en los costes frente a la síntesis química (Wildberger et al., 2015). Hasta la fecha se han caracterizado algunas fosfo- β -glicosidasas en bacterias lácticas como la fosfo- β -glucosidasa BglD de *Oenococcus oeni* (Capaldo et al., 2011) y las fosfo- β -galactosidasas Lac de *Lactobacillus gasseri* JCM 1031 (Suzuki et al., 1996) y LacG1 y LacG2 de *Lactobacillus gasseri* ATCC33323^T (Honda et al., 2012).

Por último, las tioglucosidasas (EC 3.2.1.147) son enzimas que se encuentran de forma natural en crucíferas y tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de glucosinolatos (tioglicósidos) a isotiocianatos. Se han descrito algunas cepas de bacterias lácticas que poseen actividad mirosinasa como son *Lactobacillus plantarum* KW30, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KF147 (Mullaney et al., 2013) y *Lactobacillus agilis* R16 (Palop et al., 1995).

3.1. Metabolismo de carbohidratos en *L. plantarum*

L. plantarum es una especie de bacteria láctica que se encuentra en una amplia variedad de nichos, fundamentalmente aquellos con alto contenido en carbohidratos (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011), además de formar parte de manera natural de la microbiota del tracto gastrointestinal (Ahrné et al., 1998).

En el año 2003 se secuenció por completo el genoma de la cepa *Lactobacillus plantarum* WCFS1 que tiene un tamaño de 3,3 Mb (Kleerebezem et al., 2003) y, por tanto, está considerada como la cepa de referencia a nivel de especie (Martino et al., 2016). La cepa WCFS1 posee numerosas proteínas implicadas en el transporte y utilización de carbohidratos, además de las correspondientes proteínas acompañantes regulatorias. Ello le permite crecer en numerosas fuentes de carbono. El genoma de *L. plantarum* WCFS1 presenta 25 sistemas enzimáticos completos tipo PTS, y algunos incompletos (Mayo et al., 2008). Ejemplo de ello son los sistemas PEP-PTS para fructosa, manosa, celobiosa, trehalosa, β -glucosa, manitol, maltosa, glucitol-sorbitol, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, galactosa, lactosa, sacarosa, rafinosa-melibiosa-galactosa, ascorbato, manosa-fructosa-sorbosa y galactitol (biocomputo2.ibt.unam.mx/OperonPredictor/). Además, incluye otros 30 sistemas de transporte (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011) como sistemas ABC para manosa, maltodextrinas y maltosa; sistemas principales facilitadores de carbohidratos (MSF) para arabinosa, β -ramnosa o mioinositol; o transportadores de ribosa y maltosa-isomaltosa-trehalosa (biocomputo2.ibt.unam.mx/OperonPredictor/). Los genes que codifican estos transportadores están agrupados con genes que codifican enzimas y proteínas

reguladoras implicadas en el metabolismo de carbohidratos (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011).

Según la base de datos *Prokariotic operon Database* (Taboada et al., 2012) (biocomputo2.ibt.unam.mx/OperonPredictor/) los genes de glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 se encuentran organizados en operones adyacentes a genes que codifican sistemas de transporte y proteínas reguladoras de los mismos. En el caso de las glicosil hidrolasas de la familia GH1, éstas se encuentran asociadas a sistemas de transporte PTS (Michlmayr y Kneifel, 2014).

L. plantarum WCFS1 posee 55 proteínas anotadas en la base de datos *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZy) (<http://www.cazy.org/b125.html>) (Lombard et al., 2014) como posibles glicosil-hidrolasas (GH), también conocidas como glicosidasas o glicósido hidrolasas (**Tabla 1**). Estas proteínas están clasificadas en 18 familias de glicosil hidrolasas las cuales están implicadas en la hidrólisis, síntesis o modificación de carbohidratos y glicoconjugados.

Tabla 1. Proteínas de *L. plantarum* WCFS1 anotadas en la base de datos CAZy como glicosil hidrolasas y familias a las que pertenecen.

Familia	Nº	Proteínas
GH1	11	Lp_0440, Lp_0906, Lp_1401, Lp_2777, Lp_2778, Lp_3011, Lp_3132, Lp_3512, Lp_3525, Lp_3526 y Lp_3629
GH2	1	Lp_3483 + Lp_3484
GH13	11	Lp_0020, Lp_0025, Lp_0174, Lp_0179, Lp_0189, Lp_0193, Lp_0263, Lp_2757, Lp_3220, Lp_3627 y Lp_3641
GH20	1	Lp_3645
GH23	5	Lp_0302, Lp_0673, Lp_2409, Lp_3014 y Lp_3015
GH25	7	Lp_0675, Lp_0681, Lp_1158, Lp_1767, Lp_2401, Lp_2810 y Lp_3093
GH31	1	Lp_3534
GH32	1	Lp_0187
GH36	1	Lp_3485
GH38	1	Lp_3631
GH39	1	Lp_1187
GH42	1	Lp_3469
GH65	4	Lp_0028, Lp_0181, Lp_1730 y Lp_3530
GH73	4	Lp_1138, Lp_2645, Lp_3151 y Lp_3153
GH78	2	Lp_3471 y Lp_3473
GH85	1	Lp_0182
GH92	1	Lp_3634
GH125	1	Lp_3632

La mayoría de estas proteínas también están presentes en otras cepas de *L. plantarum* y, hasta el comienzo de estas tesis, algunas de ellas se han caracterizado con mayor o menor grado de profundidad (**Tabla 2**). Por ejemplo, se han caracterizado glicosidasas con actividad β -fructosidasa [equivalente a Lp_0187 (SacA) en *L. plantarum* WCFS1 (Mendoza-Llerenas et al., 2016) y en *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ST-III (Chen et al., 2014)], α -galactosidasa [Lp_3485 (MeIA)] (Silvestroni et al., 2002), β -galactosidasas heteroméricas [Lp_3483 (LacL) y Lp_3484 (LacM)] (Mayo et al., 1994; Fernández et al., 1999), β -galactosidasas Lp_3469 (LacA)] (Iqbal et al., 2010), α -amilasa [Lp_0179 (Amy2)] (Jeon et al., 2016; Kanpiengjai et al., 2015), y α -ramnosidasas [Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2)] (Ávila et al., 2009; Beekwilder et al., 2009), entre otras. También se ha descrito alguna glicosidasa en otras cepas de *L. plantarum* que no está presente en *L. plantarum* WCFS1, como es el caso de una α -1,6-glucosidasa descrita en *L. plantarum* LL441 (Delgado et al., 2017), entre otras.

De la potencialidad metabólica que posee *L. plantarum* WCFS1 para transformar carbohidratos, sólo se ha caracterizado un reducido número de proteínas con actividad glicosidasa, permaneciendo un alto número de estas enzimas sin caracterizar en la actualidad. La caracterización de un gran número de enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos en *L. plantarum* WCFS1 aportaría información muy relevante sobre el metabolismo de estos compuestos tanto en la especie *L. plantarum* como para otras especies de bacterias lácticas que poseen proteínas similares.

Tabla 2. Características de las glicosil hidrolasas descritas en diversas cepas de *L. plantarum*.

Cepa	Enzima	Masa molecular (kDa)	Sustratos	T ^a óptima (°C)	pH óptimo	Referencia
<i>L. plantarum</i> C3.8	Lp_3483 (LacL)+Lp_3484 (LacM)	-	α -NPG	-	-	(Mayo et al., 1994)
<i>L. plantarum</i> ^a	Lp_3483 (LacL)+Lp_3484 (LacM)	-	Sistema API	-	-	(Fernández et al., 1999)
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	Lp_3485 (MelA)	84	Lactosa/melibiosas/galactosa/rafinosa	-	-	(Silvestroni et al., 2002)
<i>L. plantarum</i> NCC245	Lp_3471 (Ram1)+Lp_3473 (Ram2)	73+57	<i>p</i> -NPR/hesperidina/rutina	50/60	7,0/5,0	(Ávila et al., 2009)
<i>L. plantarum</i> DSM20205	Lp_3471 (Ram1)	-	<i>p</i> -NP- α -L-Ram	-	6,0	(Beekwilder et al., 2009)
<i>L. plantarum</i> WCFS1	Lp_3483 (LacL)+Lp_3484 (LacM)	72+35	α -NPG/lactosa	55/60	7,5/7,0	(Iqbal et al., 2010)
<i>L. plantarum</i> ST-III	Lp_0187 (SacA)	56,7	1-kestosa	37	6,0	(Chen et al., 2014)
<i>L. plantarum</i> S21	AmyL	95	Almidón	45	5,0	(Kanpiengjai et al., 2015)
<i>L. plantarum</i> ST-III	Lp_0179 (Amy2)	49-50	Almidón	30	3,0	(Jeon et al., 2016)
<i>L. plantarum</i> WCFS1	Lp_0187 (SacA)	58	Sacarosa	37	6,0-6,5	(Mendoza-Llerenas et al., 2016)
<i>L. plantarum</i> LL441	Mail	68	<i>p</i> -NP- α -Glu	30	5,0	(Delgado et al., 2017)

^a varias cepas de *Lactobacillus plantarum*

Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

VII. ANEXOS

En el género *Lactobacillus* se ha descrito que el tamaño del genoma está relacionado con la capacidad del microorganismo para metabolizar un amplio número de carbohidratos. De este modo, especies con genomas de mayor tamaño suelen ser capaces de utilizar un número más amplio de carbohidratos complejos, mientras que genomas más pequeños se asocian con hábitats más restringidos y son capaces de utilizar únicamente azúcares simples.

L. plantarum WCFS1 es la primera cepa secuenciada del género *Lactobacillus* y de la especie *L. plantarum* y, por tanto, está considerada como la cepa de referencia de esta especie (Martino et al., 2016). Según *Integrated Microbial Genomes* (IMG) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>), esta cepa presenta uno de los genomas de mayor tamaño y el 2,9% de sus genes codifica enzimas que actúan sobre carbohidratos (van den Broek et al., 2008). El genoma de la cepa WCFS1 presenta numerosos sistemas enzimáticos de transporte de carbohidratos tipo PEP-PTS y otros sistemas de transporte de carbohidratos lo que le permite crecer en numerosas fuentes carbono (Mayo et al., 2008). Los genes que codifican estos transportadores están agrupados con genes que codifican enzimas y proteínas reguladoras implicadas en el metabolismo de carbohidratos (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). Por ello, en *L. plantarum* WCFS1 se han identificado *in silico* un elevado número de genes que pueden codificar enzimas implicadas en la hidrólisis, síntesis o modificación de carbohidratos y glicoconjugados. Según la base de datos CAZY (<http://www.cazy.org/b125.html>) la cepa *L. plantarum* WCFS1 presenta 55 proteínas anotadas como posibles glicosil hidrolasas. Algunas de estas proteínas se han caracterizado con mayor o menor grado de profundidad y se ha demostrado que presentan actividades β -fructosidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa o α -ramnosidasa entre otras. Estas proteínas constituyen un grupo interesante de enzimas con potenciales aplicaciones en la industria alimentaria.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la hipótesis de partida de este trabajo se basa en el hecho de que *L. plantarum* WCFS1 es un modelo útil y versátil para la identificación de nuevas actividades enzimáticas con interés tecnológico y biológico. Estas enzimas podrían llevar a cabo la síntesis eficaz de nuevos compuestos con propiedades beneficiosas sobre la salud humana, como por ejemplo la síntesis de nuevos prebióticos. Esto se ve respaldado,

Objetivos

principalmente, por el elevado número de genes identificados *in silico* en la cepa WCFS1 que podrían codificar un amplio abanico de enzimas implicadas en la hidrólisis y síntesis de carbohidratos. Basándonos en esta hipótesis, el objetivo general de esta tesis es el estudio de las actividades glicosil hidrolasa presentes en *L. plantarum* WCFS1 dirigido a aumentar el conocimiento de la capacidad hidrolítica sobre carbohidratos presente en esta cepa, así como la disponibilidad de un amplio abanico de enzimas activas sobre carbohidratos con potenciales aplicaciones en el ámbito alimentario.

Los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

1. Estudio de la capacidad metabólica de *L. plantarum* WCFS1 sobre carbohidratos.
2. Identificación y caracterización bioquímica de glicosil hidrolasas en *L. plantarum* WCFS1.
3. Relevancia de estas glicosil hidrolasas en el fenotipo de *L. plantarum* WCFS1.
4. Análisis *in silico* de la presencia/ausencia de glicosil hidrolasas en distintas cepas de la especie *L. plantarum* y de otras especies pertenecientes al grupo *plantarum*.

Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

VII. ANEXOS

1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado los plásmidos y las estirpes bacterianas indicados en las **Tablas 3** y **4** respectivamente, así como los oligonucleótidos sintéticos descritos en la **Tabla 5**.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Genotipo/fenotipo relevante ^a	Referencia/Origen
pURI2-Cter	Derivado de pT7-7, Amp ^R	Curiel et al., 2011
pURI2-Cter- <i>lp_0263</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3	Derivado de pT7-7, Amp ^R	Curiel et al., 2011
pURI3- <i>lp_3525</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3- <i>lp_3629</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter	Derivado de pT7-7, Amp ^R	Curiel et al., 2011
pURI3-Cter- <i>lp_0179</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_0187</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_0440</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_0906</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_1401</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_2757</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_2777</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_2778</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3011</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3132</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3220</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3469</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3471</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3473</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3485</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3512</i>	Amp ^R	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3526</i>	Amp ^R	Este estudio
pUCE191	Derivado de pUC19, Amp ^R , Em ^R	Arrecubieta et al., 1995
pUCE191- <i>lp_0187*</i>	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191- <i>lp_0263*</i>	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191- <i>lp_0906*</i>	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191- <i>lp_2777*</i>	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191- <i>lp_3469*</i>	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191- <i>lp_3471*</i>	Amp ^R , Em ^R	Este estudio
pUCE191- <i>lp_3629*</i>	Amp ^R , Em ^R	Este estudio

^a Amp^R, resistente a ampicilina; Em^R, resistente a eritromicina; *pUCE191 con un fragmento interno del correspondiente gen

Tabla 4. Estirpes bacterianas empleadas en este trabajo.

Estirpe ^a	Genotipo/fenotipo relevante	Referencia/Origen
<i>Escherichia coli</i>		
DH5αF'	F' <i>endA1 hsdR17(rk-mk-) supE44 thi-1 recA1 gyrA(Na1r) relA1Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (Φ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>	Hanahan, 1983/Promega
DH10B	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 deoR araD139 Δ (ara leu)7697 galU galK rpsL nupG λ-</i>	Durfee et al., 2008
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int: :(lac: PlacUV5:T7 gene 1) i21 Δnin5 T1</i>	Studier et al., 1990/Novagen
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
WCFS1 (NCIMB 8826)	Cepa silvestre	Kleerebezem et al., 2003/NCIMB ^a
WCFS1Δ <i>lp_0187</i>	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp_0187</i>	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp_0263</i>	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp_0263</i>	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp_0906</i>	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp_0906</i>	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp_2777</i>	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp_2777</i>	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp_3469</i>	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp_3469</i>	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp_3471</i>	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp_3471</i>	Este estudio
WCFS1Δ <i>lp_3629</i>	Derivada de WCFS1; Δ <i>lp_3629</i>	Este estudio

^a NCIMB, *National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria*

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'→3') ^a
371	CATCATGGTGACGATGACGATAAGATGGTAGAGTTTCCGGAAGGCTTTG
372	AAGCTTAGTTAGCTATTATGCGTATCAAAACCCATTCCGTTCCCAAGC
427	CATCATGGTGACGATGACGATAAGATGTCAGAGTTCCAGAA
428	AAGCTTAGTTAGCTATTATGCGTACTATTTCTTTGTCAGCCATTATGC
444	GGAACCTAGAGGGTATTAATAATGAAATTATCAGAACAAGTGATTTAT
445	CTATTAATGATGATGATGATGATGACCTAACAAACGCGCAACCGCTTGA
697	CAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAACGAGAAAAATATAAACACA
698	ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACTTATTAATAATTTATAGCTATT
1224	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA
1233	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
1591	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAACAACGAGTGGTTTACGA
1592	GCTATTAATGATGATGATGATGATGCTTCAAATCGGCCCCATTCTGC
1593	GTTGGTACCCGATGATCCTGAC
1594	GAATTCTAGAAACTAAAGCCA
1597	CATTCAAGGTACCTAAAGTCGTTG
1598	GTATTTCTAGAAGTAAATATCAG
1601	CATCAACGGTACCGGTAAAGCTGAG
1602	CTCACCCATCTAGATAAACGGTGTTG
1611	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACAAAAGGATACAAAATGCCCA
1612	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATAATCTTCACCATCACTCGCAAT
1666	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGATTAAGGACGAGCGTTTTG
1667	GCTATTAATGATGATGATGATGATGCTCAATTTCCGGCACCATTGTGCGC
1668	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGATGTTTACAAAACGAGTCCTA
1669	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGTTGAATGACTATACTATTTTCATC
1670	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAATTTCCGGCTGATTTTTACT
1671	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATTTGAGGCCGAGGGACCCAGATC
1672	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGATAACGAGCGACAGATGCCCA
1673	GCTATTAATGATGATGATGATGATGCAATTCATCTCCATTTTTGCTAG
1674	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGATTACGAAAAGATTTCTTAT
1675	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATCTAGACTAGTTCCATTTGTCTG
1676	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTATAACCAACTTATCCTAAAA
1677	GCTATTAATGATGATGATGATGATGAGCTAGATCTTCACCATTAGATTT
1678	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTATTCAAAAACAATGCCAACTG
1679	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGTCCCAAATCTTCCCCATTGGAAGC
1697	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATATGGAATCGTAAACCCGTT
1698	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGTTTAAATTTGGTTTCATTGTTATC
1699	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCAGTAACGTTGCAGCAAACCTT
1700	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGGTCCTTAGCCTGAAGTAATGTAC
1703	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCCAATCCATTAAGACAACA
1704	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGTTTATTCATCATATAGACTTGAAC
1705	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTCATGTGCGAAAGAGGCTGTTT
1706	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGACTGGGACCACCCGAGTTCTATT
1707	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGTTTACTTTTTCAAATCAATA
1708	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGAACGAGGTACTTATTAATCAAGTA
1723	AGGCAATGTCCTTGGTGC
1726	GTGACAGCCAATTTTATGG
1727	TCCCTCCAGTTTTACCTCTG
1750	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCACGCGATACGCAAACGCAAT
1751	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATTGGACTGGTCAGCAACTTTAGT
1800	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAACTAGCTGGAATTAGGCACC
1801	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGAGCCACGGTTAATTCAAAGCCTCC
1802	TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCAAAAAAATTTGGTGGCAAAAAG
1803	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATGCTCATTTGAATTCACCTCAAAAAG
1830	GCTACAACAAAGGTACCTAAACGTG
1831	TGTTTATCTAGATCTGACCAATCG
1832	GGCATCGTTTTGGTACCAGACCGGAC
1833	AATATCATGTTTCTAGAAATACTGG
1857	GCTAATCGGTACCCAGACGACTACT
1858	TGCCACTGGATTTTTCTAGAGGTGC
1859	CTTGGTACCATCGACGAGTGGCAGA
1860	AAATTGAGGAGTAGTATCTAGAGGC

^a Las dianas de restricción *KpnI* y *XbaI* se encuentran subrayadas

2. Medios y condiciones de cultivos

Lactobacillus plantarum WCFS1, de manera general, se cultivó en medio MRS (Pronadisa, España) a 30 °C sin agitación. Para los cultivos en medio sólido se añadió agar al 1,5%. En los ensayos con extractos proteicos y células durmientes (*resting cell*) con el fin de evitar el mecanismo de regulación por catabolito que afecta a la expresión de los genes que codifican determinadas glicosidasas, *L. plantarum* WCFS1 se cultivó en medio MRS en el que se sustituyó la glucosa por galactosa (Marasco et al., 2000). La concentración de antibióticos utilizada para el cultivo de cepas resistentes fue 10 µg/mL para eritromicina y 100 µg/mL para lincomicina.

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron rutinariamente en el medio de Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) a 37 °C en agitación a 140 rpm, o añadiendo agar al 1,5% para los cultivos en medio sólido. Cuando se requirió se añadió ampicilina al medio a una concentración de 100 µg/mL.

Todas las cepas se conservaron congeladas a -80 °C en el medio de cultivo correspondiente, al que se le añadió glicerol estéril a una concentración final del 10%. En el momento de sembrarlas, las cepas se descongelaron y se cultivaron en sus correspondientes medios de cultivo.

3. Técnicas de ADN

3.1. Extracción de ADN cromosómico

Para la extracción del ADN cromosómico de *L. plantarum* WCFS1 las bacterias se cultivaron en 10 mL de medio MRS a 30 °C sin agitación durante 18 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 16000 x *g* durante 15 min a temperatura ambiente en una microcentrífuga (*Hettich*®, MIKRO 120, Alemania). Las células sedimentadas se lavaron en 500 µL de TES (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM). El sedimento se resuspendió en 600 µL de solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) conteniendo 10 mg/mL de lisozima (*Sigma-Aldrich*, Alemania) y se incubó durante 30 min a 37 °C.

Con el fin de producir la lisis celular, a la suspensión obtenida se le añadieron 70 μL de SDS al 10% y se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se añadieron 10 μL de proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (*Sigma-Aldrich*, Alemania) y de nuevo se incubó durante 30 min 37 °C. Una vez lisado el cultivo, el ADN se desproteinizó mediante dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Para precipitar el ADN cromosómico se añadió NaCl 5M para conseguir una concentración final de 200 mM y dos volúmenes de etanol frío (-20 °C). El tubo se agitó lentamente hasta que apareció el ADN como un precipitado. El ADN precipitado se lavó con etanol frío (-20 °C) al 70% y se dejó secar al aire. Finalmente, el ADN se disolvió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; 1 mM EDTA) y se almacenó a -20 °C hasta su uso (Sambrook et al., 1989).

3.2. Extracción de ADN plasmídico

3.2.1. Extracción rápida

Con el propósito de seleccionar las cepas de *E. coli* transformadas con los plásmidos recombinantes portadores del gen de interés, se utilizó un método rápido de extracción de plásmidos a partir de colonias crecidas en medio sólido. Para llevar a cabo la extracción del ADN plasmídico, la colonia se recogió con una punta estéril y se resuspendió en 20 μL de una solución compuesta por lisozima 0,5 mg/mL, EDTA 25 mM pH 8,0, Tris HCl 25 mM pH 7,5, RNasa 0,1 mg/mL, azul de bromofenol al 0,02% y glicerol al 0,015%. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se añadieron 5 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 16000 x g durante 2 min en una microcentrífuga (*Hettich®*, MIKRO 120, Alemania). A continuación, se recogieron 10 μL de la fase superior acuosa y se realizó una electroforesis convencional en geles de agarosa. Como control se utilizó el plásmido molde procesado de la misma forma que las muestras. Las células transformadas con los plásmidos recombinantes se seleccionaron mediante la diferencia de tamaño del plásmido recombinante con respecto al plásmido original debido a la presencia de los genes clonados.

3.2.2. Extracción de alta pureza

Para obtener un ADN plasmídico de mayor pureza, se realizó la extracción con los sistemas comerciales *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, Suiza) y *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* (FAVORGEN, Biotech Corp, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos, una vez extraídos, se conservaron a -20 °C hasta su uso.

3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR

Para llevar a cabo la amplificación de ADN, los reactivos empleados se adquirieron a las casas comerciales *Applied Biosystems* y *Takara Biotechnology*.

Las reacciones de amplificación de ADN se llevaron a cabo en un volumen final de 25 o 50 µL, conteniendo ADN polimerasa termoestable, tampones de reacción, desoxinucleótidos (dNTPs), ADN molde y los oligonucleótidos utilizados como cebadores. En las reacciones de PCR se utilizaron las siguientes ADN polimerasas: *AmpliTaq Gold™* (*Applied Biosystems*, USA), a una concentración final de 0,025 U/µL y *PrimeSTAR™ HS* (*Takara Biotechnology*, Japón) a una concentración final de 1,25 U/µL, siguiendo las instrucciones suministradas por los proveedores. Se han utilizado los tampones de reacción recomendados para cada una de las polimerasas empleadas. Cuando se utilizó la enzima *AmpliTaq Gold™* se empleó MgCl₂ a una concentración 2 mM en la mezcla final, estando el tampón de reacción compuesto por Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM y los dNTPs a una concentración final de 0,25 mM. En los casos en los que se utilizó la polimerasa *PrimeSTAR™ HS* se utilizó un tampón de reacción conteniendo MgCl₂ 5 mM en la mezcla final y una concentración final de dNTPs de 0,2 mM. Los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración final de 1 µM cuando se utilizó la polimerasa *AmpliTaq Gold™* y de 0,3 µM en el caso de la polimerasa *PrimeSTAR™ HS*. El ADN molde (~200 ng) que contiene la secuencia que se pretende amplificar se añadió en último lugar. Las reacciones de PCR se realizaron indistintamente en los termocicladores *Personal*,

Mastercycler gradient (Eppendorf, Alemania) y *SimpliAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems by Thermofisher, USA).

Las reacciones de PCR consistieron en 30 ciclos de tres fases cada uno: fase de desnaturalización del ADN (95 °C durante 30 segundos para *AmpliAq Gold™* y 98 °C durante 10 segundos para *PrimeSTAR™ HS*), una fase de hibridación de los oligonucleótidos con el ADN molde cuya temperatura varió dependiendo del ensayo realizado (30 segundos para *AmpliAq Gold™* y 5 segundos para *PrimeSTAR™ HS*), y una fase de elongación o síntesis de ADN realizada a 72 °C durante un tiempo proporcional al tamaño del fragmento a amplificar. En las reacciones realizadas con ADN polimerasa *AmpliAq Gold™* se tuvo que introducir una etapa previa de 95 °C durante 10 min para su activación puesto que esta enzima se suministra en estado inactivo.

3.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para resolver las muestras de ADN se utilizaron geles de agarosa al 0,7% ó 2% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM), utilizando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió un 20% de su volumen de una solución compuesta por azul de bromofenol al 0,25%, xilencianol FF al 0,25% y glicerol al 30% en agua. Las electroforesis se realizaron a 90 V y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con *GelRed™ Nucleic acid Gel Stain* (Biotium, USA) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor. Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante radiación ultravioleta a 302 nm en un sistema de captura y análisis de imágenes *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad, USA). Como marcadores de tamaño se utilizaron ADN del fago *Lambda* cortado con *EcoT14I* (Takara Biotechnology, Japón) y el marcador *100 bp ladder* (Biotools, España).

3.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se llevó a cabo mediante el kit *QIAquick Gel extraction* (QIAGEN, Alemania) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor. En este caso para la visualización de los fragmentos de ADN se utilizó un equipo transiluminador (*Vilber Lourmat*, Francia).

3.6. Métodos de clonaje

3.6.1. Método de clonaje independiente de ligación (LIC)

En esta tesis se utilizaron los vectores pURI3 (Rivas et al., 2007), pURI2-Cter y pURI3-Cter de la familia pURI (Curiel et al., 2011) (**Figura 5**) para realizar el clonaje de los genes de interés mediante un método de clonaje independiente de ligación (LIC) descrito por De las Rivas y colaboradores (De las Rivas et al., 2007).

El vector de expresión pURI2-Cter (7,8 kb) deriva del vector de expresión pIN-III (lpp^P -5) A3 (De las Rivas et al., 2007). En este vector la expresión de la proteína de interés se encuentra bajo el control de los promotores lpp^P -5 y lac^{PO} inducibles mediante IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) (Inouye y Inouye, 1985).

El vector de expresión pURI3 (2,7 kb) deriva del vector comercial pT7-7 (De las Rivas et al., 2007). Este vector contiene una secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región RBS que codifica un residuo de metionina en el extremo amino terminal, tres aminoácidos espaciadores y una cola de afinidad que codifica seis residuos de histidina, un residuo espaciador que codifica una glicina y la secuencia de reconocimiento para la proteasa enteroquinasa (DDDDK). Esta secuencia líder continúa con la metionina inicial de la proteína de interés, una región intergénica no codificante de 230 pb que contiene la diana de restricción *NotI* y finalmente cuatro codones de terminación en tándem. En los vectores pURI3 y pURI3-Cter la expresión de la proteína de

interés se encuentra bajo el control del promotor \emptyset del fago T7 con una ARN polimerasa inducible mediante IPTG (Studier y Moffatt, 1986).

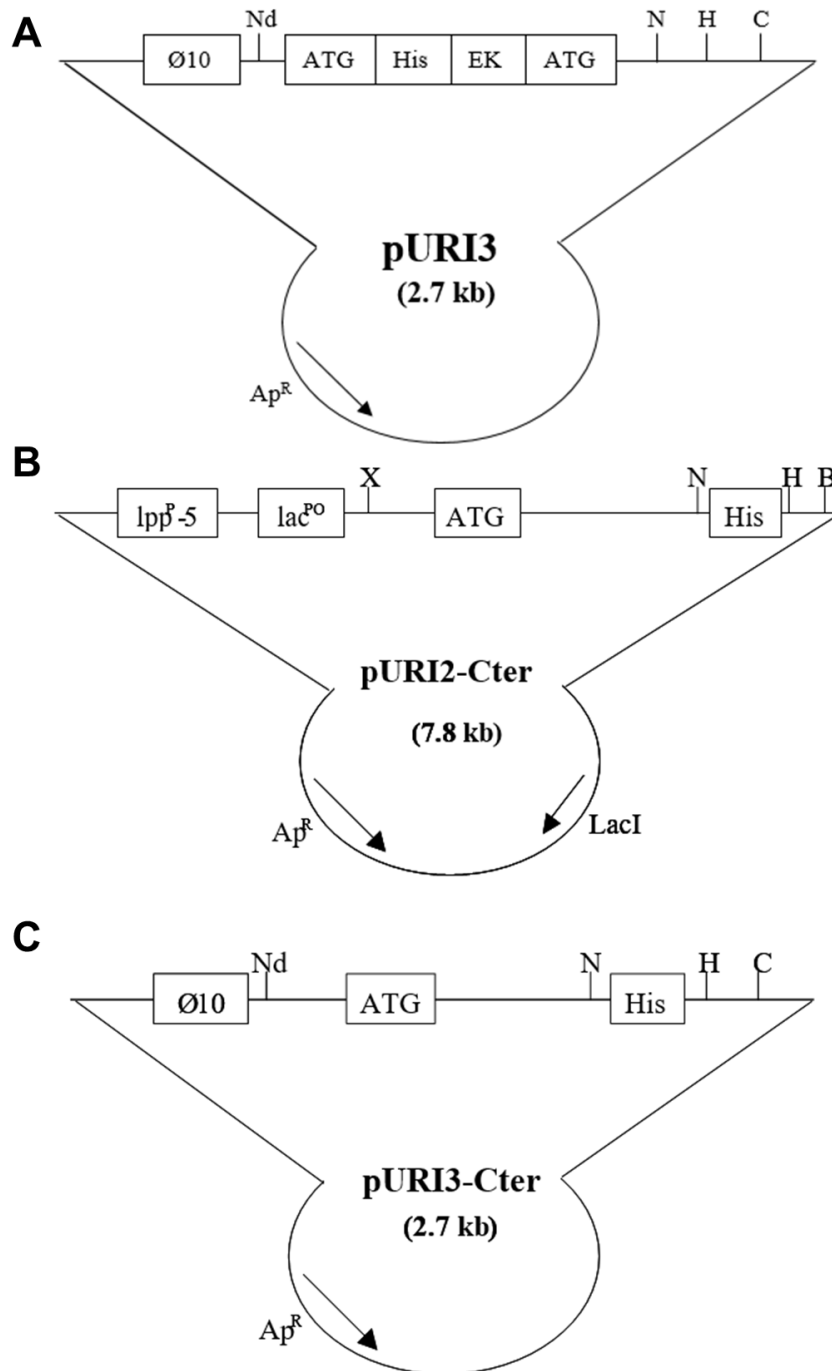


Figura 5. Representación esquemática de los vectores de expresión utilizados en este trabajo: pURI3 (A), pURI2-Cter (B) y pURI3-Cter (C).

En el caso de los vectores pURI2-Cter y pURI3-Cter presentan la secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región RBS, constituida por un residuo de metionina en el extremo amino terminal. La cola de afinidad que codifica seis residuos de histidina se localiza a 280 pb tras ese residuo de metionina, seguida de cuatro codones de terminación en tándem. De esta forma la cola de histidinas se inserta en el extremo C-terminal del gen clonado.

El proceso para llevar a cabo el clonaje mediante el método LIC se llevó a cabo amplificando en primer lugar los genes de *L. plantarum* utilizando ADN polimerasa *PrimeSTARTM HS* (*Takara Biotechnology*, Japón) y los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 5**, diseñados con extremos 5' complementarios a regiones presentes en los vectores de expresión. De esta manera, en una segunda amplificación, utilizando el vector como molde y el gen amplificado como cebador, los extremos 5' hibridan en el plásmido, permitiendo a la enzima ADN polimerasa copiar el resto del plásmido y la consiguiente inserción del gen de interés en el mismo.

Para seleccionar los plásmidos que contienen el gen de interés, se realizó una digestión de la mezcla anterior con la enzima *DpnI* (*Roche*, Suiza) durante 18 h a 37 °C, ya que éstos no presentan secuencias metiladas y por lo tanto no van a ser digeridos por dicha enzima. Posteriormente, cuando el gen de interés no presentaba la diana de corte con *NotI* (*Takara*, Japón), se llevó a cabo una segunda digestión con esta enzima durante 4 h a 37 °C en tampón H (*Takara*, Japón), ya que esta diana de restricción se encuentra en la región intergénica no codificante presente sólo en el plásmido original y no en los plásmidos que han incorporado el inserto. Posteriormente, ambas enzimas se inactivaron mediante una incubación a 65 °C durante 25 min y, una vez inactivadas, en los casos en los que la construcción se llevó a cabo en derivados de pURI3-Cter y pURI3, células competentes de *E. coli* DH10B se transformaron con el producto de digestión. Cuando la construcción se llevó a cabo en el derivado de pURI2-Cter, células competentes de *E. coli* DH5 α F' se transformaron con el producto de la digestión (**apartado 4.1 de Materiales y Métodos**). Como medio de selección se utilizaron placas de LB suplementadas con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL.

3.6.2. Método de clonaje con enzimas de restricción

Este método se realizó para clonar fragmentos de los genes de interés en el vector pUCE191 (Amp^R y Em^R) derivado de pUC19 (Arrecubieta et al., 1995), con el fin de interrumpirlos posteriormente en *L. plantarum* mediante un proceso de inserción-duplicación por recombinación homóloga ya que el plásmido pUCE191 no replica en *L. plantarum*.

Los plásmidos derivados de pUC19 presentan un fragmento del gen *lacZ* que codifica los primeros 146 aminoácidos de la β -galactosidasa LacZ, dentro de este fragmento se encuentra el sitio de clonaje múltiple (MCS) del plásmido sin interrumpir el marco de lectura. Cuando se utilizan estos plásmidos para transformar cepas que producen el fragmento perteneciente a la zona C-terminal de esta enzima, como es el caso de *E. coli* DH10B, tiene lugar un proceso de α -complementación que dará lugar a la proteína completa. Por el contrario, cuando se clona un gen, o fragmento de gen, en el MCS no se produce esta α -complementación ya que no se sintetiza el fragmento N-terminal de LacZ. La presencia o ausencia de una β -galactosidasa LacZ funcional servirá posteriormente para seleccionar las colonias de interés en placas.

Los fragmentos se amplificaron mediante PCR utilizando ADN cromosómico de *L. plantarum* WCFS1 como molde. Los cebadores se diseñaron incorporando las dianas de restricción *KpnI* y *XbaI* de tal forma que los fragmentos amplificados presentaban estas dianas en sus extremos 5' y 3' respectivamente (**Tabla 5**). Tanto los fragmentos amplificados como el vector pUCE191 se digirieron con ambas enzimas de restricción, se purificaron siguiendo el método de purificación en geles de agarosa mencionado en el **apartado 3.5 de Materiales y Métodos** y, posteriormente se ligaron usando la enzima *T4 DNA ligase* (USB[®], *Affymetrix*, USA) durante 18 h a 4 °C. Finalmente, con el producto de ligación se transformó *E. coli* DH10B (**apartado 4.1 de Materiales y Métodos**).

3.7. Secuenciación de ADN y análisis de la información

La secuenciación de ADN se realizó en la empresa *Secugen* (<http://www.secugen.es>). Para ello se utilizó un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377* (*Applied Biosystems*, USA) con el kit de secuenciación *BigDye® Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*, USA) con terminadores fluorescentes y el ADN polimerasa *AmpliTaq FS* (*Applied Biosystems*, USA).

4. Transformación genética de cepas bacterianas

4.1. Transformación genética de *Escherichia coli*

Para la transformación genética de *E. coli*, se prepararon células competentes obtenidas mediante el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983). Las células competentes se obtuvieron cultivando células de *E. coli* DH10B, BL21 (DE3) o DH5 α F' en 100 mL de LB hasta una DO₆₀₀ de 0,48. Posteriormente se mantuvieron en hielo durante 30 min y el cultivo se centrifugó a 8000 x g durante 7 min a 4 °C (*Sorvall™ RC 6 Plus*, *Thermo Fisher*, USA). El sedimento celular se resuspendió en 30 mL de la solución TFBI (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KOAc 30 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol 15%) durante 90 min a 4 °C. Pasado ese tiempo, la suspensión celular se centrifugó a 8000 x g durante 7 min a 4 °C (*Sorvall™ RC 6 Plus*, *Thermo Fisher*, USA) y el sedimento se resuspendió suavemente en 4 mL de la solución TFBII (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15%) hasta obtener una suspensión homogénea de células competentes. La suspensión se repartió en alícuotas de 200 μ L y éstas se conservaron a -80 °C.

La transformación de las células obtenidas se realizó incubándolas con el plásmido (100 ng) durante 15 min en hielo, seguido de 3 min a 37 °C y de 5 min en hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de LB a las células y se incubaron a 37 °C durante una hora. Transcurrida la incubación las células transformadas se seleccionaron en placas de LB conteniendo el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias.

Las colonias de *E. coli* DH10B transformadas con las construcciones realizadas en pUCE191 se cultivaron en placas de LB suplementadas con ampicilina (100 µg/mL), isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (*Sigma-Aldrich*, Alemania) (0,2 mM), utilizado como inductor del gen *lacZ*, y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) (*Roche*, Suiza) (0,04 mg/mL). El compuesto X-gal se hidroliza por acción de la enzima β-galactosidasa LacZ y tras oxidarse origina un compuesto azul (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo) en aquellas colonias en las que se produzca la α-complementación, mientras que serán blancas aquellas colonias en las que no haya dicha complementación al poseer un fragmento clonado en el plásmido.

4.2. Transformación genética de *Lactobacillus plantarum*

La obtención de células electrocompetentes de *L. plantarum* y la transformación de las mismas se llevó a cabo mediante el método descrito por Aukrust y Blom (1992). Con objeto de obtener células de *L. plantarum* electrocompetentes con una pared celular permeable, éstas se cultivaron en medio MRS modificado (MRS*). El medio MRS* se diferencia del medio MRS convencional (De Man et al., 1960) en que se ha sustituido la glucosa, principal fuente de carbono, por el aminoácido glicina (1%). En las células Gram+ esta modificación del medio provoca una alteración en la organización del peptidoglicano, debilitando la pared celular y aumentando su permeabilidad (Hammes et al., 1973). Las células se incubaron en este medio a 30 °C durante 18 h. Posteriormente, se añadió glucosa (1% concentración final) al cultivo y éste se incubó hasta una DO₆₀₀ de 0,6, momento en el que se centrifugó el cultivo a 3000 x g durante 5 min a 4 °C (*Sorvall™ RC 6 Plus*, *Thermo Fisher*, USA). El sedimento celular se lavó con MgCl₂ (1 mM) y después con polietilenglicol (PEG-1500) al 30%. Finalmente, el sedimento celular se volvió a resuspender suavemente en PEG-1500 al 30% en frío, en una centésima parte del volumen inicial del cultivo.

La transformación se llevó a cabo mediante electroporación, añadiendo 4 µL de plásmido recombinante derivado de pUCE191 (**apartado 3.6.2 de Materiales y Métodos**) a 40 µL de células electrocompetentes de *L. plantarum*. La mezcla se transfirió a cubetas de electroporación de 0,2 cm, previamente

enfriadas, y se aplicaron los siguientes parámetros: 400 Ω , 25 μF y 1,50 kV en un equipo *Gene Pulser XcellTM* (Bio-Rad, USA). Las células transformadas se cultivaron en medio MRS suplementado con 0,5 M de sacarosa y 0,1 M de MgCl_2 a 30 °C sin agitación durante 2 h, permitiendo así la reconstitución de la pared celular. Las células transformadas se seleccionaron en placas de MRS suplementadas con lincomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y eritromicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 30 °C hasta la aparición de colonias.

4.2.1. Interrupción genética de *L. plantarum*

Con objeto de analizar la implicación de algunas glicosil hidrolasas en el fenotipo mostrado por *L. plantarum* WCFS1 en el metabolismo de carbohidratos, se llevó a cabo la interrupción en *L. plantarum* de los genes de que las codifican. La interrupción se llevó a cabo mediante un proceso de inserción-duplicación utilizando el plásmido pUCE191 a través de un proceso de recombinación homóloga. Para ello, se amplificaron fragmentos internos de los genes mediante PCR y se clonaron en el plásmido pUCE191 (**apartado 3.6.2. de Materiales y Métodos**) ya que, pUCE191 replica en *E. coli*, pero es incapaz de replicar en *L. plantarum*.

A partir de las células de *E. coli* DH10B transformadas se extrajeron los plásmidos recombinantes conteniendo los fragmentos internos de los genes de interés. Posteriormente, las células competentes de *L. plantarum* se transformaron con los plásmidos obtenidos previamente en *E. coli* (**apartado 4.2 de Materiales y Métodos**).

Las células transformadas de *L. plantarum* presentan en su cromosoma el resultado de la recombinación homóloga entre el gen nativo cromosómico y el correspondiente fragmento interno clonado en el plásmido pUCE191, produciéndose la consiguiente interrupción génica por inserción del plásmido y duplicación del fragmento del gen de interés. Dichos transformantes se seleccionaron en placas de MRS suplementadas con eritromicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y lincomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para evitar la selección de mutantes espontáneos resistentes a dichos antibióticos, se comprobó la presencia del plásmido pUCE191 en el interior de las células transformadas mediante amplificación por PCR del gen que confiere resistencia a eritromicina, utilizando los oligonucleótidos 697 y 698 (**Tabla 5**). Además, se comprobó la correcta integración de los plásmidos en los genes seleccionados de *L. plantarum* mediante amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos complementarios al plásmido pUCE191 (oligonucleótido 1224 y 1233) y los complementarios a una región externa al fragmento del gen interrumpido. En esta tesis se utilizaron los mismos cebadores que se emplearon para amplificar cada gen para su clonaje (**Tabla 5**).

5. Técnicas de proteínas

5.1. Hiperproducción y purificación de enzimas recombinantes

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de las proteínas con actividad glicosil hidrolasa estudiadas en esta tesis, los genes que las codifican se clonaron en los vectores de expresión pURI3, pURI2-Cter y pURI3-Cter de la familia pURI (Curiel et al., 2011) mediante el sistema de clonación LIC (De las Rivas et al., 2007). Estos vectores de expresión presentan promotores inducibles por IPTG y una secuencia que codifica una cola de afinidad de seis histidinas (His₆), con objeto de purificar las proteínas recombinantes en un único paso. Además, en el vector pURI3, esta secuencia líder presenta la secuencia de reconocimiento para la proteasa enteroquinasa (EK) entre la secuencia de aminoácidos de la proteína y la cola de histidinas del extremo N-terminal. De esta forma, se puede eliminar la cola de afinidad de la proteína recombinante una vez purificada y obtener así una proteína recombinante idéntica a la proteína silvestre.

Inicialmente se transformaron células de *E. coli* DH10B para la propagación de los plásmidos pURI3 y pURI3-Cter. En el caso del gen *lp_0263* se utilizaron directamente células DH5 α F' transformadas con el plásmido pURI2-Cter. Posteriormente, para la expresión en los plásmidos pURI3 y pURI3-Cter, se utilizó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) puesto que se necesita la presencia de la

ARN polimerasa T7 del fago defectivo DE3. Los cultivos se incubaron a 37 °C en medio LB con ampicilina (100 µg/mL) en agitación a 140 rpm. Se ensayaron diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación valorando así las condiciones óptimas para la producción de las proteínas recombinantes. La inducción se ensayó a 22, 30 y 37 °C durante 4 y 18 h con agitación y, en la mayoría de los casos, se observó que las condiciones óptimas de inducción fueron 22 °C durante 18 h.

Finalizado el periodo de inducción, las células se recogieron mediante centrifugación a 8000 x g durante 15 min a 4 °C en la centrífuga *Sorvall™ RC 6 Plus* (*Thermo Fisher*, USA). Las células se resuspendieron en tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0 y se rompieron mediante tres pases en la prensa de French (*Aminco French pressure cell*, *SLM Instruments*, USA) para obtener el extracto celular conteniendo la enzima recombinante hiperproducida soluble. Dicha fracción soluble se centrifugó a 47000 x g durante 40 min a 4 °C (*Sorvall™ RC 6 Plus*, *Thermo Fisher*, USA). Finalmente, el extracto se filtró a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro (*Millipore*, USA).

Una vez filtrado el extracto obtenido éste se puso en contacto con 1 mL de resina *TALON®* de cobalto (*Clontech*, *Takara*, Mountain View, CA, USA) durante 20 min a temperatura ambiente en un agitador de rodillos (*Movil-Rod*, *Selecta*, España). La resina con cobalto se equilibró previamente con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0. Una vez unida la proteína a la resina, se realizó un primer lavado con fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0, y un segundo lavado con este mismo tampón, pero conteniendo imidazol 10 mM. Posteriormente, la proteína recombinante se eluyó con imidazol 150 mM en el mismo tampón fosfato sódico.

La pureza de la proteína se estimó en geles de SDS-PAGE, generalmente al 10%, y, además, permitió identificar las fracciones que contenían la proteína. Dichas fracciones se dializaron frente a tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0 a 4 °C utilizando membranas de diálisis (*OrDial D35-MWCO 3500*, *Orange Scientific*, Bélgica) de 3,5 kDa de diámetro de poro. Se realizaron cuatro cambios de tampón para eliminar el imidazol presente en la muestra.

La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de extinción molar teórico de cada proteína (<http://web.expasy.org/protparam/>), mediante la utilización de la Ley de Lambert-Beer.

Para los ensayos de cristalización, la purificación de la proteína se llevó a cabo utilizando una columna HisTrap™ HP de níquel inmovilizado de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA) acoplada a un sistema cromatográfico ÄKTAprime Plus (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA). El extracto filtrado libre de células se aplicó a la columna previamente cargada con Ni²⁺ y equilibrada en tampón Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 con una bomba peristáltica P-1 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Illinois, USA) con un flujo de 5 mL/min. Después de recoger la muestra, la columna se acopló al sistema ÄKTAprime Plus. Tras un exhaustivo lavado de la columna con tampón Tris 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0, imidazol 10 mM, se aplicó un gradiente lineal de imidazol (10-500 mM) con un volumen final de 150 mL y un flujo de 5 mL/min. El perfil de elución se analizó recogiendo fracciones de 3 mL y midiendo la absorbancia a 254 nm. Tras recoger las fracciones que contenían la proteína de interés y concentrarlas mediante ultrafiltración hasta un volumen final de 3 mL, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular por tamaño con una columna Superdex 200 HiLoad 16/600 prep grade (Sigma-Aldrich). Este paso cromatográfico permite eliminar el imidazol de la etapa cromatográfica anterior, así como los posibles agregados solubles y, por lo tanto, tener una idea real de la polidispersión de la muestra en solución y una estimación del estado oligomérico de la proteína. Como en el paso anterior, el perfil de elución se analizó midiendo la absorbancia a 254 nm y recogiendo fracciones de 2 mL. Las fracciones conteniendo la proteína se mezclaron y se concentraron mediante ultracentrifugación (5000 x g en ciclos de 10 min; Eppendorf 5810 R) con filtros Millipore (10 kDa cutoff) hasta una concentración final aproximada de 10 mg/mL. La concentración de proteína se estimó mediante medidas espectrofotométricas con un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), empleando un E^{0.1%} (280 nm, 1 cm) teórico estimado con la herramienta informática Protparam de Expasy.

5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utiliza geles de poliacrilamida a una concentración de acrilamida dependiente del tamaño molecular de las proteínas a analizar (Laemmli, 1970). Las muestras con la proteína a resolver se hirvieron durante 5 min en presencia de un tampón Tris-HCl 6,5 mM pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,005%. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente, utilizando como electrolito el tampón Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las proteínas presentes en los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (*Sigma-Aldrich*, Alemania). Como marcador de masa molecular se empleó *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (*Bio-Rad*, USA).

5.3. Espectrometría de masas

La masa molecular y la homogeneidad de proteínas se analizó mediante espectrometría de masas en el Servicio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química Física "Rocasolano" (IQFR, CSIC). Se empleó un espectrómetro *Voyager DE PRO* (*Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU*) equipado con un láser de nitrógeno a 337 nm (anchura de pulso 10 ns y frecuencia 3 Hz) y una fuente iónica con extracción retardada. La ionización de las muestras se llevó a cabo por MALDI (ionización por láser asistida por matriz).

5.4. Caracterización bioquímica de las enzimas glicosil hidrolasas

La actividad glicosil hidrolasa de las enzimas se determinó mediante un método colorimétrico utilizando 25 carbohidratos derivados de *p*-nitrofenilo (*p*-NF) (**apartado 6.1.3 de Materiales y Métodos**). En el caso de las glicosidasas de la familia GH1, se utilizaron adicionalmente 2 carbohidratos tioglucosilados derivados de *p*-NF.

Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones estándar. En primer lugar, se realizó un ensayo de especificidad de sustrato en el que la enzima (4 μg) con posible actividad glicosil hidrolasa se incubó en presencia de los 25 carbohidratos derivados de *p*-NF (10 mM de concentración final), en tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico) 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 en un volumen final de 75 μL a 30 °C, durante 10 min. La reacción se detuvo añadiendo 75 μL de una solución de carbonato sódico 1 M a pH 9.0. Posteriormente, se seleccionó el carbohidrato derivado de *p*-NF hidrolizado más eficazmente por cada glicosil hidrolasa para realizar su caracterización bioquímica completa.

La cuantificación de la actividad se determinó espectrofotométricamente valorando la cantidad de *p*-NF liberado midiendo su absorbancia a 420 nm (*PowerWave HT, Bio-Tek, USA*), conociendo su coeficiente de extinción molar ($9310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y el paso óptico (0,43 cm) utilizando la Ley de Lambert-Beer. De este modo, se calcularon los moles de *p*-NF liberados teniendo en cuenta que el volumen total de reacción era de 150 μL . Paralelamente, se llevó a cabo un control de la reacción sin enzima para valorar la hidrólisis espontánea de los sustratos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La actividad específica, que son los moles de *p*-NF producido por minuto por mg de proteína, se determinó a partir de ensayos realizados en condiciones de saturación de sustrato.

La temperatura óptima de las enzimas con actividad glicosil hidrolasa se determinó mediante el ensayo colorimétrico con el *p*-NF hidrolizado más eficazmente por cada proteína en condiciones estándar, pero modificando la temperatura de reacción. La enzima se incubó con el sustrato durante 10 min a diferentes temperaturas comprendidas entre 4 y 65 °C (4, 22, 30, 37, 45 y 65 °C) y se determinó la actividad relativa en función del valor de absorbancia más alto.

Para estudiar la estabilidad térmica de las enzimas glicosil hidrolasas se incubaron en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0, a varias temperaturas (22, 30, 37, 45 y 65 °C) durante diferentes intervalos de tiempo (0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 h). Tras los periodos de incubación, se determinó la actividad

relativa de las enzimas utilizando para ello el ensayo colorimétrico en condiciones estándar.

Con objeto de determinar el pH óptimo, las enzimas se incubaron a diferentes valores de pH (3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 y 8,0), durante 10 min a 30 °C, utilizando tampón citrato sódico 50 mM pH 3,0, acetato sódico-ácido acético 50 mM para los pH de 4,0 a 6,0, tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM para pH 6,5 y 7,0, y finalmente tampón Tris-HCl 50 mM para pH 8,0.

Para el estudio del efecto de metales y otros aditivos en la actividad glicosil hidrolasa se prepararon disoluciones de diferentes aditivos en agua a una concentración de 25 mM. Los aditivos ensayados fueron: cationes divalentes (KCl, CaCl₂, HgCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, NiCl₂, FeCl₂, MnCl₂), detergentes (Tritón X-100, Tween 20, Tween 80, SDS), agentes caotrópicos (urea, DMSO), agentes reductores (cisteína, β-mercaptoetanol), un inhibidor de proteasas de serina (PMSF), un modificador covalente de histidina, lisina, cisteína y tirosina (DEPC) y un quelante de cationes divalentes (EDTA). La proteína se preincubó durante 5 min a temperatura ambiente en MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 en presencia de 1 mM de los distintos aditivos. Posteriormente se añadió el sustrato y la reacción se realizó siguiendo las condiciones estándar, determinando la actividad glicosil hidrolasa relativa a la muestra control sin aditivos. También se realizó un control sin DTT para evaluar su posible efecto.

Para estudiar los parámetros cinéticos de cada enzima, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 150 µL en condiciones estándar. Se utilizaron dos intervalos de concentraciones de sustrato en función de los requerimientos de cada enzima. Uno de los intervalos empleado fue 0,1, 0,25, 0,35, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mM. El otro consistió en el intervalo 0,1, 0,25, 0,35, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 y 1 mM. Para cada concentración de sustrato, se añadió el volumen correspondiente de tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0. El lector de microplacas *PowerWave HT* (Bio-Tek, USA) se programó para que la reacción tuviera lugar a 30 °C y para que tomase medidas cada 30 s durante 10 min a 420 nm. El software de análisis de datos empleado fue el *Gen 5* (versión 2.06).

Tanto para analizar y representar gráficamente los datos obtenidos, como para determinar la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la velocidad máxima (V_{max}), se empleó el programa informático *SigmaPlot* (versión 13) ajustando los datos a un modelo de tipo Michaelis-Menten.

Con el fin de conocer algunos de los carbohidratos naturales sobre los que actúan las glicosil hidrolasas estudiadas, se analizó la especificidad de sustrato frente a una colección de carbohidratos naturales complejos (di- y trisacáridos) (*Sigma-Aldrich*, Alemania). Posteriormente, éstas reacciones se analizaron mediante LC-RID (HILIC) y GC-FID (**apartado 6.2.1 y 6.2.2 de Materiales y Métodos**).

5.5. Cristalización

La glicosil hidrolasa Lp_2777 se cristalizó, en el Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR-CSIC) mediante técnicas de alto rendimiento que permiten muestrear cientos de potenciales condiciones mediante el uso de robots de cristalización empleando el método de difusión de vapor en gota sentada.

El análisis inicial de las condiciones de cristalización de la proteína Lp_2777 de *L. plantarum* WCFS1 se realizó a una temperatura de 18 °C utilizando el método de difusión de vapor con gota sentada (Jancarik y Kim, 1991). Para ello se empleó en primer lugar un test previo denominado PCT (*Pre Crystallization Test*) (*Hampton, Research, USA*) para establecer la concentración adecuada de proteína con la que trabajar. Una vez conocida la concentración adecuada de proteína, se utilizaron los siguientes *kits* comerciales de cristalización: *Crystal Screen I y II e Index* de *Hampton Research*® (*Hampton, Research, USA*); *PACT* y *JCSG* de *Quiagen*; y *JBS Classic 1-4* de *Jena Bioscience*, en placa de 96 pocillos (*Innovaplate™ SD-2, Innovadyne Technologies Inc, USA*), utilizando un robot *Nanodrop Innovadyne (IDEX Health and Science LLC)*. Las gotas contenían 250 nL de proteína (6-20 mg/mL) en tampón Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, DTT 2 mM y 250 nL de solución de cristalización, estando equilibradas frente a un reservorio de solución de cristalización de 65 µL. Las condiciones iniciales en las que se observó material

cristalino se sometieron a subsiguientes etapas de escalado y optimización manual en placas *Linbro* de 48 pocillos (*Hampton, Research, USA*) con volúmenes de reservorio de 150 μL y gotas con diferentes proporciones de precipitante y proteína.

Las condiciones finales optimizadas que permitieron la preparación de cristales de alta calidad de Lp_2777 fueron tampón MES 0,1 M, pH 6,0, MgCl_2 0,2 M, 20% PEG 6000 a una relación 1:3 (v/v) (precipitante:proteína), con un volumen final de 4 μL .

5.6. Análisis bioinformático

El programa FASTA, herramienta perteneciente al NCBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastal/>) se utilizó para la búsqueda de secuencias similares depositadas en las bases de datos de EMBL y *GenBank* (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

Los alineamientos múltiples de las secuencias se llevaron a cabo con el programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

La búsqueda de secuencias de péptidos señal se realizó mediante el programa *SignalP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Para el cálculo del punto isoeléctrico (pI), coeficiente de extinción molar (ϵ) y el peso molecular de las enzimas se utilizó la herramienta informática *EXPASY* (<https://web.expasy.org/protparam/>) perteneciente al Instituto de Bioinformática Suizo, SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*).

Para la predicción de la localización celular de las proteínas se utilizó el programa *CELLO v.2.5: subCELLular LOcalization predictor* (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) perteneciente a *Molecular Bioinformatics Center* (*National Chiao Tung University*).

6. Ensayos de actividad enzimática

6.1. Análisis de carbohidratos derivados de *p*-nitrofenilo

Los ensayos de actividad glicosil hidrolasa se llevaron a cabo mediante un método colorimétrico utilizando una colección de carbohidratos derivados de *p*-NF. La hidrólisis del enlace glicosídico produce la liberación de *p*-NF (de color amarillo), lo que permite la cuantificación de la actividad siguiendo la absorbancia a 420 nm en un lector de microplacas *PowerWave HT* (*Bio-Tek*, USA) como ya se ha comentado anteriormente en el apartado de caracterización bioquímica. Una desventaja de este método colorimétrico es la sensibilidad de estos sustratos a imidazol, lo que imposibilita la utilización de proteínas eluidas directamente de las resinas de afinidad a metales (Kuznetsova et al., 2005), por lo que éstas se deben dializar previamente.

Los carbohidratos derivados de *p*-NF que se utilizaron se muestran en la **Tabla 6**. Las estructuras de estos compuestos aparecen en el **Anexo II**.

Tabla 6. Carbohidratos derivados de *p*-NF empleados en este trabajo.

Sustrato	Proveedor
<i>p</i> -NF- α -D-Galactopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -D-Glucopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -D-Manopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -D-Xilopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -L-Arabinofuranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -L-Arabinopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -L-Fucopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -L-Ramnopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Fucopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Galactopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Galactopiranosido	<i>GoldBio</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Glucopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Glucopiranosido	J. Cumella (IQM-CSIC) (Acebrón et al., 2017)
<i>p</i> -NF- β -D-Glucurónido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Manopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Ribofuranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Xilopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -L-Fucopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF-N-Acetil- α -D-Glucosamínido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF-N-Acetil- β -D-Glucosamínido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -D-Maltopentaósido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- α -D-Maltopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Celobiosa	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Lactopiranosido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF- β -D-Maltósido	<i>Sigma-Aldrich</i> (St.Louis, MO, USA)
<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Tioglucopiranosido	J. Cumella (IQM-CSIC)
<i>p</i> -NF- β -D-Tioglucopiranosido	J. Cumella (IQM-CSIC)

6.1.1. Análisis en células durmientes o quiescentes (*resting cells*)

Se ha demostrado que *L. plantarum* posee un mecanismo de regulación por catabolito que afecta a la expresión de genes que codifican determinadas glicosidasas (Marasco et al., 2000). Por ello, las células durmientes requeridas para el ensayo de actividades glicosidásicas se obtuvieron a partir de cultivos crecidos en galactosa, una fuente de carbono no represora.

Las células durmientes se obtuvieron a partir de cultivos de *L. plantarum* WCFS1 o de sus mutantes, cultivados en MRS con galactosa a 30 °C sin agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 5000 x *g* durante 5 min a 4 °C (*Sorvall™ RC 6 Plus, Thermo Fisher, USA*) y se lavaron dos veces con una solución de NaCl 145 mM. Las células sedimentadas se mantuvieron en hielo hasta su uso (Landete et al., 2014). En el momento de su uso las células previamente obtenidas se resuspendieron en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 y 15 µL de las mismas se incubaron con 30 µL de sustrato a 25 mM ó con 60 µL de sustrato 12,5 mM en agua (1 mM de concentración final) (75 µL de volumen final de reacción) a 30 °C, durante 10 min. Paralelamente, se llevó a cabo un control de la reacción con células durmientes para valorar la absorbancia de fondo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.1.2. Análisis en extractos proteicos

Los extractos proteicos libres de células se obtuvieron a partir de cultivos de *L. plantarum* WCFS1 o de sus mutantes. Para ello, los cultivos se centrifugaron a 8000 x *g* durante 15 min a 4 °C (*Sorvall™ RC 6 Plus, Thermo Fisher, USA*). El sedimento celular se sometió a tres lavados en solución salina para eliminar restos del medio y, posteriormente, se resuspendió en tampón MOPS 50 mM, 20 mM NaCl, DTT 1 mM pH 7,0. Esta suspensión celular se rompió mediante diez pases por una prensa de French (*Aminco French pressure cell, SLM Instruments, USA*) a una presión de 1.100 psi. Posteriormente este lisado se puso en contacto con 500 mg de esferas de vidrio (425-600 micrones, *Sigma-Aldrich, Alemania*). La suspensión celular resultante se sometió a tres ciclos de agitación en un

equipo *FastPrep*TM Fp120 (*Savant*, USA) a 5.000 rpm durante 40 s. Entre cada ciclo de agitación los viales se enfriaron durante 2 min en nieve carbónica. A continuación, se centrifugó a 16000 x *g* durante 2 min para eliminar las células completas y los restos celulares (*Hettich*[®], MIKRO 120, Alemania). Todo el proceso se realizó a 4 °C. El sobrenadante obtenido se filtró con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro (*Millipore*, USA). Posteriormente se utilizaron 45 µL de extracto los cuales se incubaron con 30 µL de sustrato a 25 mM ó 15 µL de extracto, con 60 µL de sustrato 12,5 mM en agua (1 mM de concentración final) (75 µL de volumen final de reacción) a 30 °C, durante 10 min.

En los extractos proteicos se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se añadieron 5 µL de la muestra a analizar a 1 mL del reactivo *Bradford Protein Assay* (*Bio-Rad*, USA) diluido en agua destilada (1:4). A continuación, se agitó la mezcla y se midió en el espectrofotómetro a 595 nm. La curva patrón se realizó utilizando diferentes concentraciones de la proteína seroalbúmina bovina en las mismas condiciones. Paralelamente, se llevó a cabo un control de la reacción con extracto para valorar la absorbancia de fondo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.1.3. Análisis en proteínas puras

Para los ensayos de especificidad de sustrato con proteínas, la enzima pura (4 µg) se incubó con 30 µL de sustrato 25 mM ó 60 µL de sustrato 12,5 mM en agua (10 mM de concentración final) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 (75 µl de volumen final de reacción) a 30 °C, durante 10 min. Para los ensayos de caracterización de glicosil hidrolasas se utilizó el derivado de *p*-NF que cada una de ellas hidrolizó más eficazmente. La reacción se detuvo añadiendo 75 µl de una solución de carbonato sódico 1 M a pH 9,0. Paralelamente, se llevó a cabo un control de la reacción sin enzima para valorar la hidrólisis espontánea de los sustratos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.2. Análisis de carbohidratos naturales con proteínas puras

Para el análisis de la actividad hidrolítica de las glicosil hidrolasas frente a diferentes carbohidratos naturales (di- y trisacáridos), las reacciones se llevaron a cabo con 150 μ L de enzima en 1 mL de carbohidrato en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM pH 7,0 a la temperatura óptima de cada enzima en las condiciones descritas en la **Tabla 7** durante 48 h, y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-RID) y cromatografía de gases (GC-FID). Algunas de las estructuras de estos carbohidratos naturales aparecen en el **Anexo III**.

Tabla 7. Carbohidratos naturales utilizados en este trabajo.

Sustrato	Proveedor	Condiciones
Lactosa Sacarosa	<i>Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemania)</i>	20% p/v
Trehalosa	<i>Fluka Analytical (St. Gallen, Suiza)</i>	
Melibiososa	<i>Difco (Detroit, USA)</i>	
Turanosa Leucrosa Isomaltulosa Kojibiososa Gentiobiososa Lactulosa	<i>Carbosynth, Berkshire (Reino Unido)</i>	
Maltosa Celobiososa Rafinosa	<i>Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)</i>	
Maltulosa Nigerosa Isomaltosa 2'-Fucosil-lactosa	<i>Carbosynth, Berkshire (Reino Unido)</i>	
Dextrano 20 KDa α -Ciclodextrina β -Ciclodextrina γ -Ciclodextrina Acarbosa D-Panosa Maltopentaosa Dextrina 20 KDa	<i>Sigma-Aldrich, (St.Louis, MO, USA)</i>	5% p/v
Almidón de patata Amilosa Amilopectina	<i>Sigma-Aldrich, (St.Louis, MO, USA)</i>	1% p/v (activación previa 100 °C 30 min)
Pululano	<i>Sigma-Aldrich, (St.Louis, MO, USA)</i>	1% p/v

6.2.1. Análisis mediante HPLC-RID (HILIC)

Las reacciones de las proteínas incubadas con los carbohidratos naturales se diluyeron en una mezcla de acetonitrilo:agua (70:30) a una concentración final de carbohidrato de 10 mg/mL, se filtraron con membranas PVDF de 0,2 mm de tamaño de poro (*Millipore*, Massachusetts, USA) y se analizaron en un equipo de HPLC *Agilent Technologies 1220 Infinity LC System 1260*. El equipo consta de una bomba *Smartlinepump 100*, un detector de índice de refracción K-2301 y un inyector de muestras automático AS 3800 (*Knauer*, Germany). La separación de carbohidratos se llevó a cabo en una columna *Kromasi® (100-NH₂; 250 mm × 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula)* (*Akzo Nobel*, Brewster, NY, USA) utilizando acetonitrilo:agua (70:30 v/v) como fase móvil y eluyendo en gradiente isocrático a un flujo de 1 mL/min durante 30 min. El volumen de inyección fue de 20 μL (conteniendo 800 μg de carbohidrato). El procesamiento de los datos se realizó utilizando el paquete informático *EuroChrom* para Windows v.3.05. Los carbohidratos de las mezclas de reacción se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención (*t_R*) con sus estándares. El análisis cuantitativo se realizó mediante curvas de calibración estándar en un rango de 0,05-1 mg/mL. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, encontrándose todos los valores de desviación estándar relativa (RSD) por debajo del 10%. Las cantidades de los diferentes carbohidratos se expresaron en porcentaje (w/w).

6.2.2. Análisis mediante GC-FID

Las reacciones de las proteínas incubadas con los carbohidratos naturales se analizaron mediante cromatografía de gases utilizando el método de oximas trimetiladas (TMSOs) (Brobst y Lott, 1966). A 15 μL de la mezcla de reacción (4,5 mg de carbohidrato) se le añadieron 0,4 mL de una solución de patrón interno (I.S; 0.5 mg/mL de fenil-β-glucósido). Después, la mezcla se desecó a 38-40 °C en un rotavapor (*Büchi Labortechnik AG*, Flawil, Suiza). Las oximas del carbohidrato se formaron añadiendo 250 μL de cloruro de hidroxilamina (2,5%) en piridina y calentando la muestra a 70 °C durante 30 min. Posteriormente se añadieron 250 μL de hexametildisilazano, 25 μL de ácido trifluoroacético (TFA)

y la mezcla se calentó a 50 °C durante 30 min. Finalmente, la reacción se centrifugó a 6700 x *g* durante 2 min a temperatura ambiente y los sobrenadantes se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

El análisis de las reacciones de hidrólisis se realizó mediante GC-FID en un equipo *Agilent Technologies 7890A* (*Agilent Technologies*, Wilmington, DE, USA) equipado con un detector de llama (FID). Las oximas trimetiladas se procesaron utilizando una columna capilar de sílice de fase reticulada unida a DB-5HT (5% fenil-metilpolisiloxano; 15 m × 0,32 mm i.d., 0,10 µm de espesor) (*J&W Scientific*, Folson, California, USA) (Julio-Gonzalez et al., 2019). La temperatura inicial del horno fue 150 °C, la cual se incrementó 3 °C por min hasta alcanzar una temperatura de 380 °C. Esta temperatura se mantuvo durante 76 min. El inyector y el detector mantuvieron unas temperaturas de 280 °C y 385 °C, respectivamente. Las inyecciones se llevaron a cabo utilizando nitrógeno a un caudal de 1 mL/min como gas portador. El tratamiento y la integración de los datos se realizaron mediante el paquete informático *Agilent OpenLab*. El análisis cuantitativo se realizó mediante curvas de calibración estándar utilizando como patrón interno 0,5 mg/mL de fenil-β-glucósido.

6.3. Análisis del perfil metabólico de carbohidratos mediante micromatrices fenotípicas (*Phenotype Microarray, PM*)

Con objeto de conocer el potencial metabólico de *L. plantarum* WCFS1 sobre diferentes carbohidratos se estudió el perfil de utilización de 190 fuentes de carbono (**Tabla 8**) utilizando el sistema *Phenotype Microarray* (*Biolog*, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el estudio de la relevancia funcional de glicosidasas se construyeron cepas mutantes (**apartado 4.3 de Materiales y Métodos**) interrumpiendo los genes que codifican las enzimas que presentan actividades identificadas como únicas en *L. plantarum* WCFS1 con objeto de asociar una proteína específica con una actividad enzimática concreta. Con estos mutantes se realizó también el análisis del perfil metabólico de carbohidratos mediante el sistema *Phenotype Microarray* (*Biolog*, USA).

Se partió de un cultivo de MRS en placa de la cepa silvestre o de las cepas mutadas de *L. plantarum* WCFS1 incubadas a 30 °C 48 h. Posteriormente, se inocularon dichas células procedentes de la placa de cultivo en la solución de ensayo indicada el proveedor (DO₆₀₀ de 0,65). La solución de ensayo consistió en una solución de aditivos (1x), IF-0a GN/GP (1x), *dye mix* G (1x) y agua estéril. La solución de aditivos contenía los siguientes compuestos: MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1 mM, L-glutamato 50 μM, L-cistina 12,5 μM pH 8,5, 5'-UMP 25 μM, L-arginina 25 μM, hipoxantina 25 μM, β-NAD 5 μM, riboflavina 0,25 μM, extracto de levadura 0,005%, Tween 80 0,005% y agua estéril. Finalmente, las dos placas conteniendo las distintas fuentes de carbono, placas PM1 y PM2A, se inocularon con 100 μL de solución de ensayo por pocillo, se incubaron a 30 °C durante 48h y se midieron a 590nm.

Tabla 8. Fuentes de carbono presentes en las placas PM1 y PM2A ensayadas mediante micromatrices fenotípicas en este trabajo.

PM1		PM2A	
L-Arabinosa	m-Ácido tartárico	Condroitín sulfato C	Ácido caproico
N-Acetil-D-glucosamina	D-Glucosa-1-fosfato	α -Ciclodextrina	Ácido citracónico
D-Ácido sacárico	D-Fructosa-6-fosfato	β -Ciclodextrina	Ácido citramálico
Ácido succínico	Tween 80	γ -Ciclodextrina	D-Glucosamina
D-Galactosa	Ácido α -hidroxiglutarico- γ -Lactona	Dextrina	Ácido-2-hidroxibenzoico
L-Ácido aspártico	Ácido α -hidroxibutírico	Gelatina	Ácido-4-hidroxibenzoico
L-Prolina	β -Metil-D-glucósido	Glicógeno	β -Ácido hidroxibutírico
D-Alanina	Adonitol	Inulina	γ -Ácido hidroxibutírico
D-Trehalosa	Maltotriosa	Laminarina	α -Ácido cetovalérico
D-Manosa	2-Deoxi adenosina	Manano	Ácido itacónico
Dulcitol	Adenosina	Pectina	5-ceto-D-Ácido glucónico
D-Serina	Glicil-L-Ácido aspártico	N-Acetil-D-galactosamina	D-Ácido láctico metil éster
D-Sorbitol	Ácido cítrico	N-Acetil ácido neuramínico	Ácido malónico
Glicerol	m-Inositol	β -D-Alosa	Ácido melibiónico
L-Fucosa	D-Treonina	Amigdalina	Ácido oxálico
D-Ácido glucurónico	Ácido fumárico	D-Arabinosa	Ácido oxomálico
D-Ácido glucónico	Ácido bromo succínico	D-Arabitol	Ácido quínico
D,L- α -Glicerol fosfato	Ácido propiónico	L-Arabitol	D-Ribono-1,4-lactona
D-Xilosa	Ácido múcico	Arbutina	Ácido sebácico
L-Ácido láctico	Ácido glicólico	2-Deoxi-D-ribose	Ácido sórbico
Ácido fórmico	Ácido glioxílico	i-Eritritol	Ácido succinámico
D-Manitol	D-Celobiosa	D-Fucosa	D-Ácido tartárico
L-Ácido glutámico	Inosina	3-O- β -D-Galactopiranosil-D-Arabinosa	L-Ácido tartárico
D-Glucose-6-fosfato	Glicil-L-Ácido glutámico	Gentiobiosa	Acetamida
D-Ácido galactónico- γ -Lactona	Ácido tricarbóxico	L-Glucosa	L-Alaninamida
D,L-Ácido málico	L-Serina	Lactitol	N-Acetil-L-ácido glutámico
D-Ribosa	L-Treonina	D-Melezitosa	L-Arginina
Tween 20	L-Alanina	Maltitol	Glicina
L-Ramnosa	L-Alanil-Glicina	α -Metil-D-glucósido	L-Histidina
D-Fructosa	Ácido acetoacético	β -Metil-D-galactósido	L-Homoserina
Ácido acético	N-Acetil- β -D-manosamina	3-Metil glucosa	Hidroxi-L-prolina
α -D-Glucosa	Mono metil succinato	β -Metil-D-ácido glucurónico	L-Isoleucina
Maltosa	Metil piruvato	α -Metil-D-manósido	L-Leucina
D-Melibiosa	D-Ácido málico	β -Metil-D-xilósido	L-Lisina
Timidina	L-Ácido málico	Palatinosa	L-Metionina
L-Asparagina	Glicil-L-Prolina	D-Rafinosa	L-Ornitina
D-Ácido aspártico	<i>p</i> -hidroxifenil ácido acético	Salicina	L-Fenilalanina
D-Ácido glucosamínico	<i>m</i> -hidroxifenil ácido acético	Sedoheptulosa	L-Ácido piroglutámico
1,2-Propanodiol	Tiramina	L-Sorbosa	L-Valina
Tween 40	D-Psicososa	Estaquiosa	D,L-Carnitina
α -Ácido-cetoglutarico	L-Lixosa	D-Tagatosa	Sec-Butilamina
α -Ácido-cetobutírico	Glucuronamida	Turanosa	D,L-Octopamina
α -Metil-D-galactósido	Ácido pirúvico	Xilitol	Putrescina
α -D-Lactosa	L-Ácido galactónico- γ -Lactona	N-Acetil-D-glucosaminitol	Dihidroxiacetona
Lactulosa	D-Ácido galacturónico	γ -Ácido aminobutírico	2,3-Butanodiol
Sacarosa	Feniletamina	δ -Ácido aminovalérico	2,3-Butanodiona
Uridina	2-Aminoetanol	Ácido butírico	3-Hidroxi 2-butanona
L-Glutamina		Ácido cáprico	

Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

VII. ANEXOS

1. Estudio de la capacidad metabólica de *L. plantarum* WCFS1 sobre carbohidratos

1.1. Identificación de actividades glicosil hidrolasa

La especie *L. plantarum* es muy abundante en la naturaleza, siendo posible aislar cepas pertenecientes a esta especie en hábitats muy diferentes (Kleerebezem et al., 2003). Su presencia en distintos ambientes indica una alta capacidad metabólica para poder adaptarse a diferentes condiciones de crecimiento. Esta alta capacidad de adaptación de la especie *L. plantarum* se refleja en la alta variabilidad intraespecífica que presenta (Martino et al., 2016) lo que genera diferencias en su metabolismo, como, por ejemplo, en el metabolismo de carbohidratos. Bringel et al. (2001) analizaron actividades glicosídicas en varias cepas de *L. plantarum* y encontraron un grupo de cepas que fueron capaces de hidrolizar melezitosa y α -metil-D-manósido, mientras que otro grupo de cepas de *L. plantarum* hidrolizaron dulcitol y α -metil-D-glucósido. Posteriormente, Landete et al. (2014) utilizando carbohidratos derivados de *p*-NF describieron diferencias también en las actividades presentes entre células durmientes y extractos proteicos. Todas las cepas analizadas mostraron actividad α -D-glucosidasa tanto en células durmientes como en extractos proteicos. Sin embargo, no se detectaron actividades β -D-glucosidasa ni β -D-galactosidasa en extractos proteicos, por lo que estas actividades parecían estar ligadas a membrana. Por otro lado, ninguna de las cepas estudiadas presentó actividad β -D-fucosidasa, β -D-xilosidasa ni α -D-ramnosidasa.

Por ello, y con objeto de ampliar estos resultados se decidió utilizar la cepa WCFS1 como modelo para realizar un estudio de las actividades glicosídicas presentes tanto en células durmientes como en extractos proteicos utilizando 24 carbohidratos derivados de *p*-NF (**apartados 6.1.1 y 6.1.2. de Materiales y Métodos**). La **Figura 6** refleja la capacidad hidrolítica de células durmientes y extractos proteicos de *L. plantarum* WCFS1 sobre carbohidratos derivados de *p*-NF. Los resultados obtenidos muestran la existencia de

diferencias muy importantes entre las actividades glicosídicas que presentan células durmientes y extractos proteicos de *L. plantarum* WCFS1. En general los extractos proteicos presentaron una mayor capacidad de hidrolizar los carbohidratos derivados de *p*-NF que las células durmientes, 15 carbohidratos fueron hidrolizados por los extractos proteicos, mientras que las células durmientes fueron capaces de hidrolizar sólo siete. De los 24 carbohidratos derivados de *p*-NF analizados, sólo seis de ellos fueron hidrolizados tanto por células durmientes como por extractos proteicos (*p*-NF- α -D-galactopiranosido, *p*-NF- α -D-glucopiranosido, *p*-NF- α -L-arabinopiranosido, *p*-NF- β -D-galactopiranosido, *p*-NF- β -D-glucopiranosido y *p*-NF- β -D-ribofuranosido), aunque algunos de ellos con distinta intensidad. Únicamente las células durmientes fueron capaces de hidrolizar eficazmente el carbohidrato *p*-NF- β -D-maltósido. Por su parte, los extractos proteicos hidrolizaron exclusivamente nueve de los carbohidratos derivados de *p*-NF analizados (*p*-NF- α -D-manopiranosido, *p*-NF- α -L-ramnopiranosido, *p*-NF- β -D-fucopiranosido, *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido, *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido, *p*-NF- β -D-manopiranosido, *p*-NF- β -D-xilopiranosido, *p*-NF- α -D-maltósido y *p*-NF- β -D-lactopiranosido). Este resultado, que en principio podría resultar sorprendente, se puede explicar por el hecho de que las células durmientes tienen su metabolismo detenido por lo que no es posible la síntesis de nuevas proteínas o proteínas inducibles. Por ejemplo, no se pueden sintetizar transportadores de membrana que puedan facilitar la entrada de los carbohidratos derivados de *p*-NF analizados al interior celular para ser hidrolizados por las proteínas intracelulares presentes. Una de las diferencias más significativas encontrada entre los carbohidratos derivados de *p*-NF hidrolizados por extractos proteicos y que no resultan hidrolizados por las células durmientes es la utilización de sustratos fosforilados como los carbohidratos *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido y *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido. Esto es debido, probablemente a que algunos carbohidratos utilizan transportadores que a través de un mecanismo de fosforilación introducen carbohidratos al interior celular para así metabolizarlos (Evanovich et al., 2019). Al encontrarse ya fosforilados para el caso de los sustratos *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido y *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido no existiría un transportador específico para estos carbohidratos, los cuales no

pasarían al interior de la célula y por tanto no resultan hidrolizados por las células durmientes.

	<i>p</i> -NF- α -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Manopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Xilopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Arabinofuranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Arabinopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Ramnopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Glucurónido	<i>p</i> -NF- β -D-Manopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Ribofuranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Xilopiranosido	<i>p</i> -NF- β -L-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF-NA- α -D-Glucosaminido	<i>p</i> -NF-NA- β -D-Glucosaminido	<i>p</i> -NF- α -D-Maltósido **	<i>p</i> -NF- β -D-Celobiosa **	<i>p</i> -NF- β -D-Lactopiranosido **	<i>p</i> -NF- β -D-Maltósido **
CÉLULAS DURMIENTES																								
EXTRACTOS PROTEICOS																								

Figura 6. Hidrólisis de carbohidratos derivados de *p*-NF mediante células durmientes y extractos proteicos de *L. plantarum* WCFS1. Las intensidades de color reflejan un diferente grado de hidrólisis valorado a 420 nm, <0,1 (blanco), 0,1-1,0 (color intermedio) y >1,0 (color oscuro).

Los resultados obtenidos en esta tesis respecto a la hidrólisis de 24 carbohidratos derivados de *p*-NF coinciden con lo publicado previamente para la cepa *L. plantarum* WCFS1 al estudiar su capacidad para hidrolizar sólo cinco de estos carbohidratos (Landete et al., 2014). Células durmientes de la cepa WCFS1, al igual que otras 19 cepas de *L. plantarum* aisladas de diferentes sustratos, fueron capaces de hidrolizar *p*-NF- β -D-galactopiranosido, *p*-NF- α -D-glucopiranosido, y *p*-NF- β -D-glucopiranosido. Sin embargo, al igual que en este estudio, ninguna de las 20 cepas analizadas fue capaz de hidrolizar *p*-NF- β -D-fucopiranosido ni *p*-NF- β -D-xilopiranosido. La cepa WCFS1 no fue seleccionada por Landete et al. (2014) para estudiar su capacidad hidrolítica en extractos proteicos. Sin embargo, al contrario que los extractos proteicos de la cepa WCFS1 estudiados en esta tesis, los extractos proteicos de las cepas seleccionadas por Landete et al. (2014) no presentaron actividad sobre *p*-NF- β -D-fucopiranosido, *p*-NF- β -D-xilopiranosido o *p*-NF- β -D-galactopiranosido. Estas diferencias pueden deberse a la alta variabilidad genética que presenta la especie *L. plantarum*, aunque no se puede excluir que los diferentes medios de

cultivo utilizados para la obtención de estos extractos sean los responsables de las diferencias observadas. En el estudio llevado a cabo por Landete et al. (2014) las cepas de *L. plantarum* se cultivaron en medio basal modificado que contiene glucosa como fuente de carbono, descrito previamente para *L. plantarum* (Rozès y Peres, 1998). Sin embargo, en este estudio la cepa WCFS1 se cultivó en medio MRS en el que sustituyó glucosa por galactosa como fuente de carbono, para evitar la represión por catabolito. Esta represión puede ser responsable de la ausencia, en el estudio de Landete et al. (2014), de las actividades hidrolíticas sobre *p*-NF- β -D-fucopiranosido, *p*-NF- β -D-xilopiranosido o *p*-NF- β -D-galactopiranosido, que en esta tesis se han observado en la cepa WCFS1 cultivada en condiciones no represivas.

Una vez conocido el perfil de utilización de 24 carbohidratos derivados *p*-NF tanto por células durmientes como por extractos proteicos de la cepa *L. plantarum* WCFS1, se decidió conocer el perfil de utilización de 190 fuentes de carbono utilizando el sistema *Phenotype Microarray* (Biolog, USA) en cultivos de *L. plantarum* WCFS1 (**apartado 6.3. de Materiales y Métodos**). Junto con las micromatrices de ADN y las tecnologías proteómicas, las micromatrices fenotípicas representan una tecnología relevante en la investigación biológica actual. Así como las micromatrices de ADN y las tecnologías proteómicas han hecho posible ensayar miles de genes o proteínas a la vez, las micromatrices fenotípicas permiten medir cuantitativamente miles de fenotipos celulares simultáneamente. La tecnología de micromatrices fenotípicas permite a los investigadores evaluar cerca de 2.000 fenotipos de una célula microbiana en un solo experimento. A través de la cuantificación completa y precisa de fenotipos es posible obtener una perspectiva objetiva de diferencias genéticas, pudiendo correlacionar genotipos con fenotipos, así como determinar las propiedades metabólicas de una célula. Este sistema se ha aplicado previamente con éxito en algunas bacterias lácticas y en otras cepas de *L. plantarum* para describir su capacidad para utilizar carbohidratos (Di Cagno et al., 2010; Ceapa et al., 2015; Menon et al., 2015). En *Lactobacillus rhamnosus* este sistema se utilizó para clasificar 25 cepas en tres grupos en función del metabolismo de carbohidratos (Ceapa et al. 2015). La mayoría de estas cepas (81%) fueron capaces de metabolizar nueve de las fuentes de carbono ensayadas (D-melezitosa, ácido-

64

D-glucónico, D-celobiosa, dulcitol, arbutina, glicerol, ácido acetoacético, L-ramnosa y D-sorbitol). Di Cagno et al. (2010) determinaron que, de las 72 cepas de *L. plantarum* analizadas, todas fueron capaces de metabolizar maltosa. El 90% de estas cepas además utilizaron D-celobiosa y tan sólo el 50% metabolizaron D-fructosa, gentiobiosa, α -D-glucosa, D-manitol, D-manosa, β -metil-D-glucósido y sacarosa (**Tabla 9**). Este sistema también se utilizó para conocer la capacidad metabólica de dos cepas de *L. plantarum*, ATCC 14917^T y RENO0093, revelando que la primera utilizó 26 de los sustratos analizados, mientras que la capacidad para utilizar estos sustratos fue mayor en la cepa RENO0093 que metabolizó 34 de los mismos (Menon et al., 2015) (**Tabla 9**). En esta tesis la cepa *L. plantarum* WCFS1 fue capaz de utilizar 29 de las 190 fuentes de carbono incluidas en las micromatrices analizadas. Como se puede observar en la **Tabla 9**, respecto a la cepa ATCC 14917^T, las diferencias encontradas han sido que sólo la cepa ATCC 14917^T fue capaz de metabolizar β -metil-D-glucósido y turanosa, mientras que por el contrario sólo la cepa WCFS1 metabolizó lactulosa, ácido-L-láctico, ácido-D-láctico metil éster, L-arabinosa y α -D-lactosa. Al comparar los compuestos metabolizados por *L. plantarum* WCFS1 respecto a la cepa RENO0093 se observa que esta cepa fue la única que metabolizó ácido-L-láctico, ácido-D-láctico metil éster y ácido D-glucónico. Por el contrario, la cepa RENO0093, que resultó ser la cepa que utilizó mayor número de sustratos, fue la única capaz de metabolizar β -metil-D-glucósido, N-acetil- β -D-manosamina, dextrina, palatinosa, D-xilosa, dextrina, α -metil-D-manósido, y α -metil-D-galactósido. Se puede destacar que, de estos ocho compuestos, los siete últimos fueron metabolizados exclusivamente por la cepa RENO0093, no resultando utilizados por la cepa WCFS1 ni por la cepa ATCC 14917^T, y resulta más sorprendente aún, que los últimos cinco compuestos tampoco fueron utilizados por ninguna de las 72 cepas analizadas en el estudio de Di Cagno et al. (2010). Los resultados obtenidos en este apartado confirman la alta diversidad metabólica, consecuencia de la alta diversidad genética, que presenta la especie *L. plantarum* (De las Rivas et al., 2006).

Tabla 9. Metabolismo de carbohidratos en diferentes cepas de *L. plantarum* analizado mediante micromatrices.

Carbohidratos	WCFS1	ATCC 14917^{Ta}	RENO0093^a	Otras 72 cepas^b
N-Acetil-β-D-manosamina	-	-	+	+
Amigdalina	+	+	+	+
D-Arabitól	-	-	-	+
Arbutina	+	+	+	+
D-Celobiosa	+	+	+	+
Dextrina	-	-	+	+
D-Fructosa	+	+	+	+
Gentiobiosa	+	+	+	+
α-D-Glucosa	+	+	+	+
Lactulosa	+	-	+	+
Maltosa	+	+	+	+
D-Manitol	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+
D-Melibiosa	+	+	+	+
3-Metil-D-glucosa	+	+	+	+
β-Metil-D-glucósido	-	+	+	+
Salicina	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+
D-Trehalosa	+	+	+	+
Turanosa	-	+	-	+
Ácido-α-hidroxi-butírico	-	-	-	+
D,L-Ácido láctico	-	-	-	+
L-Ácido láctico	+	-	-	+
D-Ácido láctico metil éster	+	-	-	+
L-Ácido málico	-	-	-	+
Ácido pirúvico metil éster	-	-	-	+
Maltotriosa	+	+	+	-
N-Acetil-D-glucosamina	+	+	+	-
D-Glucosamina	+	+	+	-
D-Melezitosa	+	+	+	-
L-Lixosa	+	+	+	-
D-Galactosa	+	+	+	-
D-Ribosa	+	+	+	-
2-Deoxi-D-ribosa	+	+	+	-
L-Arabinosa	+	-	+	-
Ácido-D-glucónico	+	+	-	-
α-D-Lactosa	+	-	+	-
Palatinosa	-	-	+	-
D-Xilosa	-	-	+	-
α-Metil-D-manósido	-	-	+	-
α-Metil-D-galactósido	-	-	+	-

^a Menon et al., 2015; ^b Di Cagno et al., 2010 (al menos alguna de las cepas ensayada dio positivo)

Para el estudio del metabolismo de carbohidratos en *L. plantarum* también se han realizado otras aproximaciones experimentales, como por ejemplo la utilización de sistemas bioquímicos miniaturizados, como el sistema API 50 CHL (Buron-Moles et al., 2019). En el estudio realizado en una cepa de *L. plantarum* se confirmó la utilización de 14 de los carbohidratos incluidos,

tanto en el sistema API 50 CHL, como en el sistema *Phenotype* Microarray. Todas las cepas analizadas utilizando ambos sistemas fueron capaces de metabolizar amigdalina, arbutina, D-celobiosa, D-fructosa, gentiobiosa, α -D-glucosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melibiosa, salicina, D-sorbitol, sacarosa y D-trehalosa. La utilización común de estos compuestos puede indicar un posible papel relevante en el metabolismo general de la especie *L. plantarum*.

La actividad hidrolítica de *L. plantarum* WCFS1 sobre carbohidratos derivados de *p*-NF, así como sobre algunas fuentes de carbono incluidas en el sistema *Phenotype Microarray* (*Biolog*, USA) que se ha observado en esta tesis es debida, en parte, a la existencia de proteínas con actividad glicosidasa. Las glicosidasas (también conocidas como glicosil hidrolasas, GH) catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos para generar carbohidratos más sencillos. Junto a las glicosil transferasas, las GH representan las principales enzimas catalíticas para la síntesis y rotura de enlaces glicosídicos. Las GH constituyen un grupo muy abundante de enzimas en las que el método más utilizado para predecir su función bioquímica consiste en su clasificación basada en su secuencia de aminoácidos. Este método se aplica para deducir cual es la posible función de las enzimas que se han secuenciado recientemente y cuya función real todavía no se ha podido demostrar bioquímicamente. La clasificación de enzimas glicosidasas basada en la similitud de sus secuencias, ha llevado a la creación de 167 familias diferentes. Esta clasificación aparece en la página web de la base de datos CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*, <http://www.cazy.org>). Esta base de datos CAZy describe las familias de enzimas relacionadas estructuralmente y que, posiblemente, degradan, modifican o crean enlaces glicosídicos de manera similar. Según la base de datos CAZy, la secuencia completa del genoma *L. plantarum* WCFS1 posee 55 proteínas anotadas como posibles glicosil hidrolasas (GH), y pertenecientes a 18 familias distintas.

En esta tesis se ha realizado la caracterización fisicoquímica de un elevado número de las proteínas anotadas como glicosil hidrolasas en *L. plantarum* WCFS1 con objeto de conocer su actividad hidrolítica sobre enlaces

glicosídicos específicos e intentar poder asociar su actividad con la actividad hidrolítica y metabolismo de carbohidratos identificado en esta cepa. En esta tesis se han intentado hiperproducir de forma recombinante las 55 proteínas de *L. plantarum* WCFS1 anotadas como glicosil hidrolasas (datos no mostrados), obteniéndose finalmente de forma soluble 20 de estas proteínas. Las glicosil hidrolasas producidas con éxito de forma recombinante en esta tesis están incluidas sólo en seis de las 18 familias; en la familia GH1 (once proteínas), GH13 (cuatro proteínas), GH32 (una proteína), GH36 (una proteína), GH42 (una proteína) y GH78 (dos proteínas) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Posibles glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 estudiadas en esta tesis.

Proteína	Familia GH	Anotación NCBI/CAZY
Lp_0179 (Amy2)	13	α -Amilasa/Maltodextrinasa/Ciclomaltodextrinasa
Lp_0187 (SacA)	32	Sacarosa-6-P-hidrolasa/ β -Fructofuranosidasa
Lp_0263 (TreA)	13	Trehalosa-6-P-hidrolasa
Lp_0440 (Pbg1)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_0906 (Pbg2)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_1401 (Pbg3)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_2757	13	α -Amilasa-maltogénica
Lp_2777 (Pbg4)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_2778 (Pbg5)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_3011 (Pbg6)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_3132 (Pbg7)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_3220 (Agl4)	13	Sacarosa/Trehalosa-6-P-hidrolasa/ α -Glucosidasa
Lp_3469 (LacA)	1	β -Galactosidasa
Lp_3471 (Ram1)	78	α -L-Ramnosidasa
Lp_3473 (Ram2)	78	α -L-Ramnosidasa
Lp_3485 (MelA)	36	α -Galactosidasa
Lp_3512 (Pbg8)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_3525 (Pbg9)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_3526 (Pbg10)	1	6-P- β -Glucosidasa
Lp_3629 (Bgl)	1	β -Galactosidasa/ β -Glicosidasa

El trabajo descrito en esta tesis representa un amplio estudio sobre las glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1. Los genes que codifican estas enzimas se clonaron, se expresaron heterológamente y, las glicosidasas correspondientes, se purificaron y caracterizaron fisicoquímicamente. Todo ello con el objetivo de ampliar el conocimiento del metabolismo de carbohidratos y de valorar el posible uso de estas glicosil hidrolasas para el diseño de nuevos compuestos con propiedades beneficiosas para la salud humana.

1.2. Clonaje, producción y caracterización bioquímica de glicosil hidrolasas

Para obtener en estado puro las proteínas que están anotadas en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 como posibles glicosil hidrolasas se siguió una estrategia común en todas ellas. Esta consistió en clonar el gen que las codifica en un vector para su hiperexpresión y conseguir así hiperproducir la proteína, la cual se purificó posteriormente en un único paso mediante cromatografía de afinidad. Con las proteínas puras se estudió su actividad sobre una colección de carbohidratos derivados de *p*-NF con el fin de clasificarlas en función de su especificidad de sustrato.

Se ha descrito que el rendimiento en la producción de proteínas recombinantes solubles depende en gran medida del tipo de proteína y que, además, puede variar significativamente en función del vector de clonaje utilizado por lo que no es habitual producir proteínas de forma soluble en el primer intento (Structural Genomics Consortium et al., 2008). El grupo de investigación en dónde se ha realizado esta tesis dispone de la familia pURI de vectores de expresión para la hiperproducción y purificación de proteínas recombinantes solubles (Curiel et al., 2011). Desde su construcción, los vectores pURI se han utilizado con éxito para la producción de proteínas recombinantes de *L. plantarum* (De las Rivas et al., 2007; Curiel et al., 2011). En esta tesis se ha utilizado fundamentalmente el vector pURI3-Cter que produce proteínas recombinantes con una cola de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal.

Con todas las proteínas estudiadas en esta tesis se realizó un abordaje similar. En primer lugar se comprobó su localización, determinándose de forma teórica mediante el programa *CELLO* v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>) que todas ellas presentan una localización intracelular, y en segundo lugar, la existencia o no de un péptido señal, mediante el programa *SignalP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Los genes de la cepa *L. plantarum* WCFS1 que codifican proteínas anotadas como glicosil hidrolasas se clonaron en los vectores de expresión de la familia pURI (**apartado 3.6.1 de Materiales y Métodos**) utilizando las parejas de oligonucleótidos que se muestran en la **Tabla 11**. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la **Tabla 5** (**apartado 1. de Materiales y Métodos**). Los tamaños de los fragmentos amplificados también se indican en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 caracterizadas en este estudio.

Proteína	GH	Tamaño aa / kDa	Gen	pb	Cebadores	Vector	Rendimiento (mg/L)
Lp_0179 (Amy2)	13	440 / 49,9	<i>amy2</i>	1.320	1750 + 1751	pURI3-Cter	6,6
Lp_0187 (SacA)	32	501 / 56,7	<i>sacA</i>	1.503	1697 + 1698	pURI3-Cter	6,7
Lp_0263 (TreA)	13	547 / 62,0	<i>treA</i>	1.641	444 + 445	pUR2-Cter	15,8
Lp_0440 (Pbg1)	1	478 / 54,9	<i>pbg1</i>	1.434	1666 + 1667	pURI3-Cter	4,7
Lp_0906 (Pbg2)	1	500 / 57,9	<i>pbg2</i>	1.500	1668 + 1669	pURI3-Cter	14,3
Lp_1401 (Pbg3)	1	490 / 55,8	<i>pbg3</i>	1.470	1670 + 1671	pURI3-Cter	18,2
Lp_2757	13	574 / 64,4	-	1.722	1800 + 1801	pURI3-Cter	5,3
Lp_2777 (Pbg4)	1	480 / 54,7	<i>pbg4</i>	1.440	1591 + 1592	pURI3-Cter	21,4
Lp_2778 (Pbg5)	1	479 / 54,9	<i>pbg5</i>	1.437	1611 + 1612	pURI3-Cter	1,9
Lp_3011 (Pbg6)	1	460 / 53,4	<i>pbg6</i>	1.380	1672 + 1673	pURI3-Cter	16,9
Lp_3132 (Pbg7)	1	483 / 55,4	<i>pbg7</i>	1.449	1674 + 1675	pURI3-Cter	20,3
Lp_3220 (Agl4)	13	555 / 63,9	<i>agl4</i>	1.665	1802 + 1803	pURI3-Cter	14,7
Lp_3469 (LacA)	42	683 / 78,1	<i>lacA</i>	2.049	1703 + 1704	pURI3-Cter	7,2
Lp_3471 (Ram1)	78	652 / 74,8	<i>ram1</i>	1.956	1705 + 1706	pURI3-Cter	2,7
Lp_3473 (Ram2)	78	525 / 59,7	<i>ram2</i>	1.575	1707 + 1708	pURI3-Cter	31,8
Lp_3485 (MelA)	36	738 / 83,6	<i>melA</i>	2.214	1699 + 1700	pURI3-Cter	13,5
Lp_3512 (Pbg8)	1	486 / 55,9	<i>pbg8</i>	1.458	1676 + 1677	pURI3-Cter	2,4
Lp_3525 (Pbg9)	1	480 / 54,6	<i>pbg9</i>	1.440	427 + 428	pURI3	3,4
Lp_3526 (Pbg10)	1	487 / 55,4	<i>pbg10</i>	1.461	1678 + 1679	pURI3-Cter	5,2
Lp_3629 (Bgl)	1	461 / 52,7	<i>bgl</i>	1.383	371 + 372	pURI3	5,8

Los oligonucleótidos utilizados presentan en sus extremos 5' nucleótidos capaces de hibridar con los vectores de expresión utilizados, permitiendo un clonaje independiente de ligación (Curiel et al., 2011). Los plásmidos recombinantes se propagaron en la cepa de *E. coli* DH10B o DH5 α F' y una vez verificadas sus secuencias, en el caso de los derivados de pURI3 y pURI3-Cter se transfirieron a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) (**apartado 4.1 de Materiales y Métodos**) para la hiperproducción de las proteínas glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1.

Después de realizar diversos ensayos variando las condiciones de inducción (temperatura, tiempo de inducción y concentración de inductor) se comprobó que, generalmente, las condiciones con las que se conseguía un mayor rendimiento en la producción de la proteína recombinante en forma soluble era mediante una inducción con 0,4 mM de IPTG y una incubación a 22 °C durante 20 h. Además, se ha descrito que una baja temperatura para la inducción favorece la producción de proteínas recombinante solubles (Structural Genomics Consortium et al., 2008). Por ello, para todas las glicosil hidrolasas estudiadas en esta tesis se seleccionó 22 °C como temperatura de inducción durante una incubación de 20 h.

Las glicosil hidrolasas recombinantes producidas se purificaron en un único paso, mediante una cromatografía de afinidad a cobalto debido a la presencia de una cola de seis histidinas en su extremo C-terminal (vectores pURI2-Cter y pURI3-Cter) o en su extremo N-terminal (vector pURI3). La cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados permite una adsorción muy selectiva de la enzima recombinante (Armisen et al., 1999). Las proteínas se eluyeron de la resina con imidazol 150 mM y posteriormente se dializaron (**apartado 5.1 de Materiales y Métodos**). Los derivados de *p*-NF utilizados para el cribado de estas proteínas se hidrolizan rápidamente a temperaturas elevadas y a pH extremos en presencia de imidazol (Kuznetsova et al., 2005) lo que implica la necesidad de dializar las proteínas producidas antes de su análisis para eliminar el imidazol presente.

Tanto los extractos proteicos procedentes de las células de *E. coli* transformadas con el plásmido recombinante, como las glicosil hidrolasas una

vez purificadas y dializadas, se sometieron a SDS-PAGE para comprobar la presencia de la proteína de interés. De manera general, en los geles de poliacrilamida se observó que, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido recombinante, como en las diferentes fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol, aparecieron las proteínas recombinantes con los tamaños esperados, y que estaban comprendidos entre 50 y 84 kDa (**Tabla 11**). Los rendimientos en la producción y purificación de estas 20 glicosil hidrolasas fueron muy variables y oscilaron entre 2 y 32 mg/L de cultivo (**Tabla 11**).

Aunque se pueda predecir el tipo de reacción catalizada por una enzima, es muy difícil determinar el sustrato utilizado por ella. A esta dificultad hay que añadir el enorme potencial de las enzimas para evolucionar, ya que pequeños cambios en su estructura pueden ocasionar importantes consecuencias catalíticas. De hecho, existen numerosos ejemplos de mutaciones puntuales en un único aminoácido que originan cambios drásticos en las propiedades de la enzima y en los sustratos sobre los que actúa, por ejemplo, facilitando el acceso de sustratos más voluminosos al centro activo (White, 2006). Un método habitual para realizar una primera clasificación de las glicosil hidrolasas y que permite conocer la especificidad de sustrato de las mismas es el método espectrofotométrico en el que se utilizan sustratos cromogénicos artificiales derivados de *p*-NF. En esta tesis se utilizó una colección de 25 carbohidratos derivados de *p*-NF para realizar un cribado inicial rápido en placas multipocillo en las que cada pocillo contenía un sustrato diferente. La actividad hidrolítica sobre estos carbohidratos cromogénicos derivados de *p*-NF se cuantificó como el *p*-NF liberado midiendo la absorbancia a 420 nm en un lector de microplacas *PowerWave HT* (Bio-Tek, USA).

Con cada una de las 20 glicosil hidrolasas purificadas y dializadas de *L. plantarum* WCFS1 se realizó el ensayo colorimétrico con carbohidratos derivados de *p*-NF con objeto de intentar relacionar la actividad glicosídica que presenta cada una de las proteínas puras con la actividad glicosídica observada tanto en las células durmientes como en los extractos proteicos

(apartado 6.1.1. y 6.1.2. de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 7**.

Glicosil hidrolasa	Familia GH																											
		<i>p</i> -NF- α -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Manopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Xilopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Arabinofuranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Arabinopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Ramnopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Glucurónido	<i>p</i> -NF- β -D-Manopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Ribofuranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Xilopiranosido	<i>p</i> -NF- β -L-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF-NA- α -D-Glucosamínido	<i>p</i> -NF-NA- β -D-Glucosamínido	<i>p</i> -NF- α -D-Maltopentaosido *****	<i>p</i> -NF- α -D-Maltopiranosido **	<i>p</i> -NF- β -D-Celobiosa **	<i>p</i> -NF- β -D-Lactopiranosido **	<i>p</i> -NF- β -D-Maltosido **		
Lp_0179	13																											
Lp_0187	32																											
Lp_0263	13																											
Lp_0440	1																											
Lp_0906	1																											
Lp_1401	1																											
Lp_2757	13																											
Lp_2777	1																											
Lp_2778	1																											
Lp_3011	1																											
Lp_3132	1																											
Lp_3220	13																											
Lp_3469	42																											
Lp_3471	78																											
Lp_3473	78																											
Lp_3485	36																											
Lp_3512	1																											
Lp_3525	1																											
Lp_3526	1																											
Lp_3629	1																											

Figura 7. Hidrólisis de carbohidratos derivados de *p*-NF mediante glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1. * disacáridos y pentasacárido. Las intensidades de color reflejan un diferente grado de hidrólisis valorado a 420 nm, <0,1 (blanco), 0,1-1,0 (color intermedio) y >1,0 (color oscuro).

La **Figura 7** muestra que las 11 proteínas pertenecientes a la familia GH1 y que están anotadas como 6-P- β -glucosidasas, a excepción de Lp_3629 (Bgl) que está anotada como β -galactosidasa/ β -glicosidasa, son capaces de hidrolizar eficazmente *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido, por lo que en ellas coincidiría su anotación con la actividad hidrolítica observada (**Tabla 10**). El

sustrato *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido no está disponible comercialmente, lo que explicaría que la proteína Lp_3629 (Bgl) esté anotada como β -galactosidasa puesto que esta proteína también presenta baja actividad hidrolítica sobre el sustrato *p*-NF- β -D-galactopiranosido (Acebrón et al., 2009). No obstante, atendiendo a los resultados obtenidos en esta tesis la anotación de Lp_3629 (Bgl) debería corregirse y anotarse como 6-P- β -glucosidasa. También se puede observar en la **Figura 7**, que de las 11 proteínas pertenecientes a la familia GH1, la proteína Lp_3525 (Pbg9) es la única capaz de hidrolizar eficazmente los sustratos *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido y *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido, por lo que en su anotación se podría incluir también su actividad 6-P- β -galactosidasa.

El sustrato *p*-NF- α -D-maltopiranosido resultó hidrolizado por glicosil hidrolasas incluidas en las familias GH13 [Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757] y GH32 [Lp_0187 (SacA)], anotadas como α -amilasas y sacarosa-6-P-hidrolasa/ β -fructofuranosidasa, respectivamente (**Tabla 10**). De estas proteínas, la proteína Lp_2757 fue la única capaz de hidrolizar eficazmente el pentasacárido *p*-NF- α -D-maltopentaósido. De las proteínas producidas, Lp_3220 (Agl4) también pertenece a la familia GH13, pero, al contrario de Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757, no hidrolizó *p*-NF- α -D-maltopiranosido, siendo capaz de hidrolizar eficazmente el sustrato *p*-NF- α -D-glucopiranosido. Entre otras posibles funciones, Lp_3220 (Agl4) está correctamente anotada en las bases de datos como α -glucosidasa.

De los sustratos analizados, Lp_3485 (MelA) (GH36) hidrolizó *p*-NF- α -D-galactopiranosido estando correctamente anotada en las bases de datos como α -D-galactosidasa. También aparecen correctamente anotadas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) (GH78) como α -L-ramnosidasas puesto que sólo fueron capaces de hidrolizar eficazmente el sustrato *p*-NF- α -L-ramnopiranosido (**Figura 7**). De las proteínas analizadas la única que hidroliza con eficacia tres de los sustratos analizados es Lp_3469 (LacA) (GH42). Esta proteína está anotada como β -galactosidasa, aunque hidrolizó también *p*-NF- α -L-arabinopiranosido y *p*-NF- β -D-fucopiranosido, por lo que su anotación también debería revisarse.

Los resultados obtenidos con las 20 glicosil hidrolasas mediante la hidrólisis de carbohidratos derivados de *p*-NF indican que *L. plantarum* WCFS1 posee glicosil hidrolasas que presentan actividad α -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.22) [Lp_3485 (MelA)], α -D-glucosidasa (E.C 3.2.1.20) [Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4)], α -L-arabinosidasa (E.C 3.2.1.-) [Lp_3469, (LacA)], α -L-ramnosidasa (E.C 3.2.1.40) [Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2)], β -D-fucosidasa (E.C 3.2.1.38) (Lp_3469, LacA), β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.23) [Lp_3469, (LacA)], 6-P- β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.85) [Lp_3525 (Pbg9)], 6-P- β -D-glucosidasa (E.C 3.2.1.86) [Lp_0440 (Pbg1), Lp_0906 (Pbg2), Lp_1401 (Pbg3), Lp_2777 (Pbg4), Lp_2778 (Pbg5), Lp_3011 (Pbg6), Lp_3132 (Pbg7), Lp_3512 (Pbg8), Lp_3525 (Pbg9), Lp_3526 (Pbg10), y Lp_3629 (Bgl)], α -D-maltopentaosidasa (E.C 3.2.1.133) (Lp_2757) y α -D-maltosidasa (E.C 3.2.1.1) [Lp_0179 (Amy2), Lp_0187 (SacA) y Lp_2757], consiguiendo así identificar un total de diez actividades glicosil hidrolíticas distintas entre las 20 glicosidasas producidas.

Una vez identificadas las actividades hidrolasas que presentan las proteínas puras sobre los carbohidratos derivados *p*-NF, se realizó la caracterización fisicoquímica de la proteína utilizando para ello el carbohidrato derivado de *p*-NF hidrolizado más eficazmente (**apartado 5.4 de Materiales y Métodos**). En la caracterización se determinaron algunos de sus parámetros fisicoquímicos, como temperatura y pH óptimos, y termoestabilidad. Asimismo, se determinaron sus constantes cinéticas, y el efecto de diferentes aditivos entre los que se encuentran iones metálicos (K^+ , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} o Mn^{2+}), detergentes (Tritón-X-100, Tween 20, Tween 80 y SDS), agentes caotrópicos (urea y DMSO), agentes reductores (cisteína y β -mercaptoetanol), inhibidores de proteasas y ARNasas (PMSF y DEPC) y quelantes de iones divalentes (EDTA). La caracterización fisicoquímica de las proteínas permite conocer las condiciones en las que trabajan y su capacidad para ser usadas en los procesos tecnológicos encaminados a la elaboración de productos alimentarios.

1.2.1. Familia 1 (GH1)

Frecuentemente las glicosil hidrolasas de la familia GH1 presentan actividades β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) y β -galactosidasa (EC 3.2.1.23). Sin embargo, en esta familia también se han descrito otras actividades como 6-P- β -glucosidasa (EC 3.2.1.86), 6-P- β -galactosidasa (EC 3.2.1.85), β -manosidasa (EC 3.2.1.25), β -D-fucosidasa (EC 3.2.1.38), lactasa (EC 3.2.1.108), tioglucosidasa (EC 3.2.1.147) y β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31). Esta familia de glicosil hidrolasas presentan una estructura clásica denominada barril TIM (β/α)₈ que es un dominio estructural de proteínas muy conservado que consiste en ocho hélices alfa y ocho láminas beta paralelas que se alternan formando un solenoide que se curva para cerrarse sobre sí mismo en forma de toroide. En cuanto a su mecanismo de acción, estas glicosil hidrolasas presentan un mecanismo de retención que implica un desplazamiento doble a través de un intermediario covalente, en el que se encuentran implicados dos residuos de glutamato, uno actúa como un ácido o una base, y el otro como nucleófilo (Michalska et al., 2013).

Las 11 proteínas pertenecientes a la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1 [Lp_0440 (Pbg1), Lp_0906 (Pbg2), Lp_1401 (Pbg3), Lp_2777 (Pbg4), Lp_2778 (Pbg5), Lp_3011 (Pbg6), Lp_3132 (Pbg7), Lp_3512 (Pbg8), Lp_3525 (Pbg9), Lp_3526 (Pbg10), y Lp_3629 (Bgl)] se encuentran anotadas en las bases de datos NCBI/CAZy como 6-P- β -glucosidasas (E.C 3.2.1.86) a excepción de la proteína Lp_3629 (Bgl) que se encuentra actualmente anotada como β -galactosidasa (E.C 3.2.1.23) (**Tabla 10**). Inicialmente la proteína Lp_3629 (Bgl) estaba anotada en la base de datos NCBI como posible β -glucosidasa. Teniendo en cuenta esta anotación, Acebrón et al. (2009) clonaron el gen e hiperprodujeron la proteína de forma recombinante. Sin embargo, cuando intentaron verificar la actividad β -glucosidasa de la proteína Lp_3629 (Bgl) pura utilizando *p*-NF- β -D-glucopiranosido como sustrato comprobaron que no era capaz de hidrolizarlo. Por el contrario, la proteína sí presentó una moderada actividad hidrolítica sobre *p*-NF- β -D-galactopiranosido por lo que su anotación se revisó apareciendo desde entonces anotada como β -galactosidasa (Acebrón et al., 2009). Los resultados obtenidos en esta tesis

confirman que Lp_3629 (Bgl) presenta moderada actividad β -galactosidasa, al igual que las proteínas Lp_0906 (Pbg2), Lp_2778 (Pbg5) y Lp_3220 (Agl4). De hecho, esta actividad β -galactosidasa moderada ha permitido la síntesis de galactooligosacáridos y oligosacáridos derivados de lactulosa mediante la enzima Lp_3629 (Bgl) inmovilizada covalentemente a soportes de glioxil agarosa (Benavente et al., 2015). Sin embargo, el sustrato que resultó hidrolizado más eficazmente fue el *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido por lo que Lp_3629 (Bgl) debería anotarse como 6-P- β -glucosidasa al igual que el resto de GH1 estudiadas en esta tesis (**Figura 7**). Esta actividad sobre azúcares 6-fosforilados se confirma con los datos estructurales obtenidos de la glicosil hidrolasa Lp_3629 (Bgl). La estructura cristalográfica de Lp_3629 (Bgl) revela la existencia de un bolsillo de unión a fosfato en el centro activo. Se trata de una estructura inusual en la que la molécula de fosfato está fuertemente unida lo cual indica que reconoce azúcares fosforilados (Acebrón et al., 2017).

Sin embargo, con objeto de conocer si la diferente anotación inicial de Lp_3629 (Bgl) se correspondía con un menor grado de identidad de esta proteína respecto al resto de glicosil hidrolasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1, se realizó un alineamiento de sus secuencias de aminoácidos utilizando para ello el programa *Clustal Omega* (**Figura 8**). El alineamiento reveló que efectivamente la proteína Lp_3629 (Bgl) presentó el menor grado de identidad entre las proteínas GH1. La identidad de Lp_3629 (Bgl) varió de un 23% con Lp_0906 (Pbg2) a un 30% con Lp_3011 (Pbg6). Sin embargo, la identidad entre las glicosil hidrolasas de la familia GH1 osciló entre un 30% entre Lp_3512 (Pbg8), Lp_3132 (Pbg7), Lp_2778 (Pbg5) y Lp_3526 (Pbg10), hasta una identidad del 67% entre Lp_0440 (Pbg1) y Lp_2778 (Pbg5).

Lp_0440	Lp_0906	Lp_1401	Lp_2777	Lp_2778	Lp_3011	Lp_3132	Lp_3512	Lp_3525	Lp_3526	Lp_3629	Proteína
100	40	51	64	67	34	50	47	54	31	29	Lp_0440
	100	39	43	41	32	49	44	44	46	23	Lp_0906
		100	31	51	34	47	48	51	50	27	Lp_1401
			100	66	35	51	49	52	33	28	Lp_2777
				100	36	49	48	49	30	28	Lp_2778
					100	35	34	34	34	30	Lp_3011
						100	30	46	34	28	Lp_3132
							100	50	72	29	Lp_3512
								100	33	29	Lp_3525
									100	27	Lp_3526
										100	Lp_3629

Figura 8. Matriz de identidad de secuencia entre glicosil hidrolasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1 mediante el programa *Clustal Omega*.

Para conocer algunas de las características fisicoquímicas que presentan las glicosil hidrolasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1, se clonaron los genes que las codifican, y las proteínas se hiperprodujeron, purificaron y dializaron (**apartados 3.6.1, 4.1 y 5.1 de Materiales y Métodos**) (**Tabla 11**). El rendimiento en la producción y el grado de pureza de las proteínas recombinantes hiperproducidas se analizó mediante SDS-PAGE. En la **Figura 9** se observan las proteínas purificadas mediante cromatografía de afinidad las cuales presentan tamaños comprendidos entre 53 kDa [Lp_3629 (Bgl)] y 57,9 kDa [Lp_0906 (Pbg2)] coincidiendo todas ellas con sus masas moleculares esperadas (**Tabla 11**). Utilizando el protocolo de hiperproducción y purificación descrito en el **apartado 5.1. de Materiales y Métodos**, se obtuvieron entre 2 mg [Lp_3512 (Pbg8)] y 21 mg [Lp_2777 (Pbg4)] de proteína pura por litro de cultivo (**Tabla 11**).

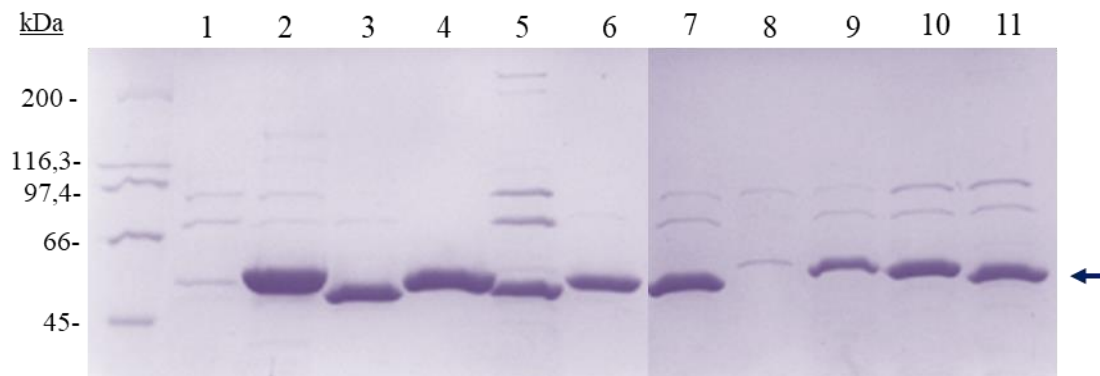


Figura 9. Hiperproducción y purificación de glicosil hidrolasas recombinantes de la familia GH1 de *L. plantarum* WFCS1: proteínas Lp_0440 (1), Lp_0906 (2), Lp_1401 (3), Lp_2777 (4), Lp_2778 (5) y Lp_3011 (6), Lp_3132 (7), Lp_3512 (8), Lp_3525 (9), Lp_3526 (10) y Lp_3629 (11). Se muestra una alícuota (de 5 a 15 μ l) de cada proteína eluída de la columna de afinidad con imidazol (150 mM) y dializada con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0. Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

Una vez obtenidas las proteínas de la familia GH1 puras, tal como se ha comentado anteriormente, se realizó un estudio de su especificidad de sustrato utilizando 25 carbohidratos derivados de *p*-NF (**apartado 6.1.3 de Materiales y Métodos**). La **Figura 7** muestra que, aunque todas las proteínas presentan una alta actividad 6-P- β -glucosidasa, existen ligeras diferencias en su actividad sobre otros sustratos, con la excepción de la alta actividad 6-P- β -galactosidasa que presenta Lp_3525 (Pbg9). Las actividades P- β -glucosidasa y P- β -galactosidasa son muy interesantes en tecnología de alimentos ya que los carbohidratos que metabolizan pueden actuar como donadores en la síntesis de oligosacáridos (Wildberger et al., 2015). Puesto que la síntesis química de estos oligosacáridos es cara, disponer de enzimas con actividad P- β -glucosidasa y P- β -galactosidasa abarataría mucho los costes de producción de estos oligosacáridos prebióticos.

Con objeto de conocer algunas de las características fisicoquímicas que presentan estas proteínas, y de este modo su adecuación para uso industrial, se estudió su comportamiento frente a distintas temperaturas y pHs utilizando *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido como sustrato. Como se puede observar en las **Figuras 10 y 11** las proteínas estudiadas presentaron comportamientos muy

diferentes. Respecto a la temperatura, las proteínas que presentaron menos actividad en todas las temperaturas ensayadas fueron Lp_3011 (Pbg6), Lp_0906 (Pbg2) y Lp_0440 (Pbg1), aunque ésta última presentó una evidente actividad óptima a 22 °C (**Figura 10**). La proteína Lp_3132 (Pbg7) presentó su actividad óptima a 22 °C, mientras que 37 °C fue la temperatura óptima para las proteínas Lp_3629 (Bgl), Lp_1401 (Pbg3), Lp_3512 (Pbg8) y Lp_2778 (Pbg5). Las proteínas Lp_3525 (Pbg9), Lp_3526 (Pbg10) y Lp_2777 (Pbg4) mostraron una alta actividad en todas las temperaturas ensayadas.

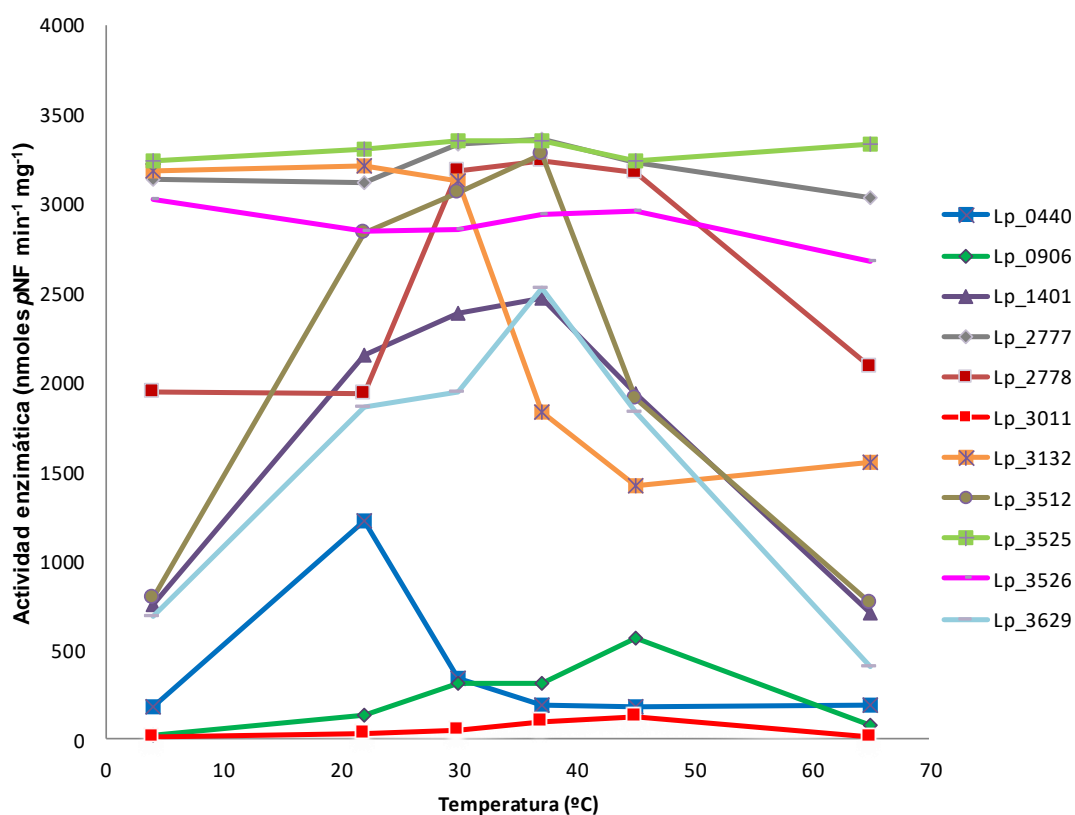


Figura 10. Efecto de la temperatura en la actividad de glicosil hidrolasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1.

De manera similar a la temperatura, se observaron comportamientos muy diferentes respecto a la actividad enzimática de las 6P- β -glucosidasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1 a diferentes pHs (**Figura 11**). Las proteínas Lp_3011 (Pbg6) y Lp_0906 (Pbg2) presentaron muy baja actividad a

todos los pHs ensayados. Las proteínas Lp_3132 (Pbg7) y Lp_0440 (Pbg1) presentaron actividad óptima a pH 6,0 mientras que la proteína Lp_1401 (Pbg3) mostró un pH más básico para su actividad óptima (pH 7,0-8,0). Al igual que lo que ocurre con la temperatura óptima, algunas proteínas presentaron actividad muy alta a todos los pHs ensayados, es el caso de las proteínas Lp_3525 (Pbg9), Lp_3526 (Pbg10), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5).

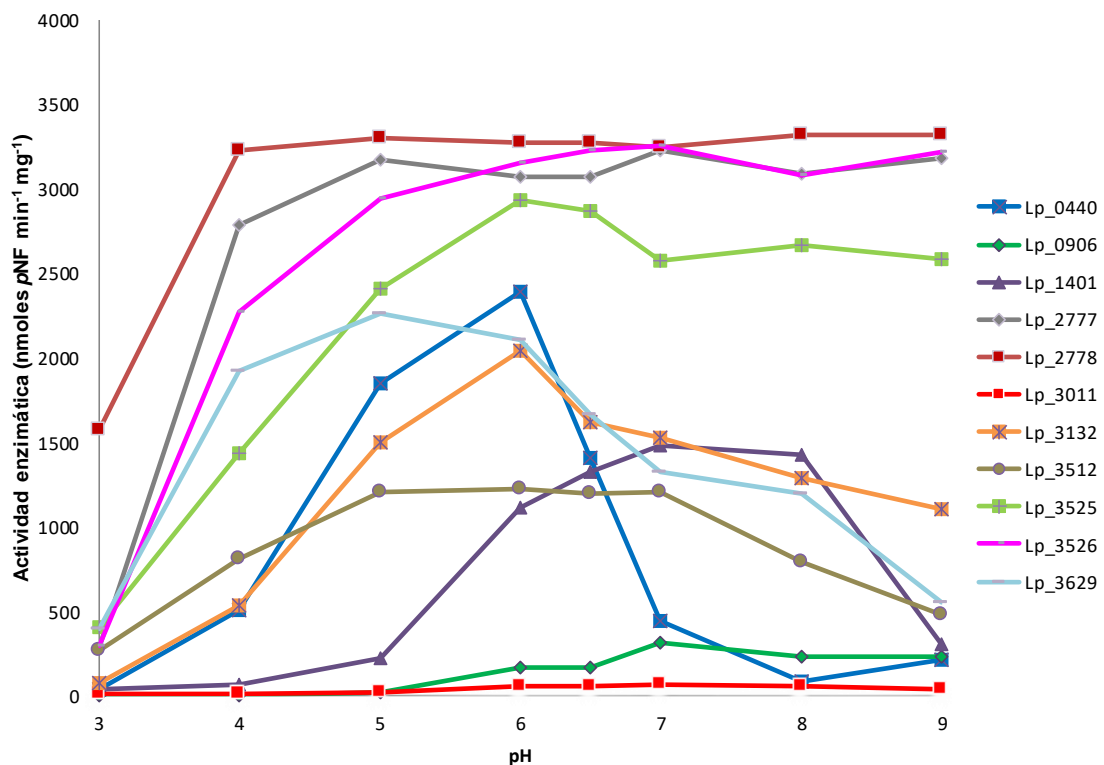


Figura 11. Efecto del pH en la actividad de glicosil hidrolasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1.

Los resultados obtenidos indican que las proteínas Lp_3525 (Pbg9), Lp_3526 (Pbg10), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5) son las que presentan temperaturas y pHs óptimos más versátiles puesto que muestran alta actividad hidrolítica en todas las temperaturas y pHs ensayados, lo que les hace unas candidatas adecuadas para su posible utilización para la hidrólisis de carbohidratos o para la síntesis de oligosacáridos (Wildberger et al., 2015).

Otra actividad hidrolítica interesante que se ha encontrado en proteínas de la familia GH1 es la actividad β -D-tioglucohidrolasa o mirosinasa (EC 3.2.1.147). Las enzimas tioglucohidrolasas que de forma natural se encuentran en las plantas crucíferas, tienen la capacidad de hidrolizar glucosinolatos (tioglicósidos) a isotiocianatos, compuestos con potentes propiedades anticancerígenas, así como propiedades frente al estrés oxidativo o inflamación (Brown y Hampton 2011; Mi et al., 2011). Concretamente, el sulforafano es el isotiocianato más estudiado debido a sus numerosas propiedades bioactivas y que además se le atribuyen propiedades anticancerígenas, actividad antibiótica, en particular, frente a *Helicobacter pylori* (Fahey et al., 2002), así como otras propiedades preventivas frente a diferentes enfermedades crónicas (Fahey et al., 2017). Sin embargo, las tioglucohidrolasas de origen vegetal son termolábiles y se inactivan tras un procesamiento térmico convencional, limitando de forma muy importante la hidrólisis de los glucosinolatos y, por tanto, minimizando la posible ingesta de isotiocianatos (Mahn et al., 2014). Por ello, la búsqueda de fuentes alternativas de tioglucohidrolasas, como las de origen microbiano, puede abrir un amplio abanico de posibilidades basadas en las propiedades potencialmente singulares de las tioglucohidrolasas microbianas frente a las de origen vegetal (termoestabilidad, actividad hidrolítica, etc.), así como la facilidad de su producción, purificación y estandarización a gran escala en comparación con el uso de extractos vegetales ricos en este tipo de enzimas.

Por ello, con objeto de conocer si las glicosil hidrolasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1 son capaces de hidrolizar los sustratos *p*-NF-6-P- β -D-tioglucopiranosido y *p*-NF- β -D-tioglucopiranosido se siguió el mismo método utilizado para el chequeo con los carbohidratos derivados de *p*-NF (**apartado 6.1.3. de Materiales y Métodos**). Los resultados obtenidos indican que ninguna de las once proteínas pertenecientes a la familia GH1 fue capaz de hidrolizar *p*-NF- β -D-tioglucopiranosido. Sin embargo, todas las proteínas analizadas, excepto Lp_0906 (Pbg2), Lp_3011 (Pbg6) y Lp_3629 (Bgl), hidrolizaron *p*-NF-6-P- β -D-tioglucopiranosido. Entre las proteínas que presentaron actividad destacan Lp_3525 (Pbg9), Lp_3132 (Pbg7), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_3526 (Pbg10), cuyos valores de DO_{420nm} fueron 0,74; 0,92; 1,0 y

1,0 respectivamente. Por tanto, estas proteínas se pueden clasificar también como enzimas con actividad mirosinasa.

En un estudio previo realizado por Mullaney et al. (2013) ya se describió la capacidad de cultivos de *L. plantarum* WCFS1, y de otras cepas de esta especie, para hidrolizar glucosinolatos presentes en un extracto de brócoli. Mediante una búsqueda *in silico* de proteínas glicosidasas de la familia GH1, los autores atribuyeron esta actividad a la presencia de las proteínas Lp_3512 (Pbg8) y Lp_3526 (Pbg10). Curiosamente, la proteína Lp_3526 (Pbg10) es una de las proteínas en las que en esta tesis se ha demostrado bioquímicamente la presencia de actividad mirosinasa.

Los resultados obtenidos en el estudio de especificidad de sustrato, así como en la caracterización fisicoquímica de las once glicosil hidrolasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1, demuestran que la existencia de una aparente redundancia bioquímica no implica necesariamente una redundancia funcional puesto que cada una de ellas presenta un comportamiento bioquímico distinto (Nelson et al., 2017). A esto se suma el hecho de que la actividad de cada una de estas proteínas en las células de *L. plantarum* WCFS1 posiblemente presentará también diferencias en cuanto a la expresión de sus genes o en su localización celular, entre otros aspectos.

Entre las proteínas de la familia GH1 estudiadas destacan dos proteínas tanto por su actividad mirosinasa como por su adecuado comportamiento a diferentes temperaturas y pHs, se trata de las proteínas Lp_2777 (Pbg4) y Lp_3525 (Pbg9). La proteína Lp_3525 (Pbg9) es además la única glicosil hidrolasa de la familia GH1 con actividad 6-P- β -D-glucosidasa que también presenta alta actividad 6-P- β -D-galactosidasa. Debido a su posible interés tecnológico se decidió estudiarlas con más profundidad en esta tesis.

1.2.1.1. Lp_2777

Tal y como se ha comentado anteriormente, el gen *pbg4* (*lp_2777*) de *L. plantarum* WCFS1 se clonó en el vector pURI3-Cter utilizando el método LIC

(**apartado 3.6.1. de Materiales y Métodos**), y se hiperprodujo y purificó la proteína Pbg4 (Lp_2777) (**apartado 5.1. de Materiales y Métodos**), obteniéndose un rendimiento en su producción de 21,4 mg de proteína por litro de cultivo (**Tabla 11**). En la **Figura 9** se muestra la proteína Lp_2777 (Pbg4) de 54,7 kDa tras su purificación y diálisis. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos frente a la librería de 25 carbohidratos derivados de *p*-NF (**Figura 7**) se seleccionó el sustrato 6-P-*p*-NF- β -D-glucopiranosido para llevar a cabo su caracterización fisicoquímica. Para el cálculo de la actividad enzimática específica se realizaron ensayos en condiciones de saturación de sustrato. La proteína Lp_2777 (Pbg4) presentó una UE= 39,5 U mg⁻¹ (**Tabla 12**). La actividad específica de esta 6-P- β -D-glucosidasa de *L. plantarum* WCFS1 es aproximadamente un 50% menor que la de una 6-P- β -D-glucosidasa de *Geobacillus kaustophilus* HTA426, ya que ésta presenta un valor de 1,0 x10² U mg⁻¹ (Suzuki et al., 2013).

Según se ha descrito previamente, y tal como muestra la **Figura 10 y 12A**, Lp_2777 (Pbg4) recombinante de *L. plantarum* WCFS1 presentó al menos un 90% de actividad relativa para todas las temperaturas ensayadas, presentando una actividad relativa superior al 96% entre 30 y 45 °C. Esta enzima presenta un comportamiento similar a la 6-P- β -D-glucosidasa BgID de *Oenococcus oeni* en temperaturas inferiores a 40 °C. Sin embargo, la enzima de *L. plantarum* WCFS1 presenta mayor actividad relativa que la de *O. oeni* en temperaturas superiores a 40 °C (Capaldo et al., 2011). De igual manera, respecto al pH, la proteína Lp_2777 (Pbg4) presentó una actividad relativa por encima del 95% para los valores de pH comprendidos entre 5,0 y 8,0 (**Figura 11 y 12B**). Siendo este resultado diferente al descrito para la 6-P- β -D-glucosidasa BgID de *O. oeni* cuya actividad relativa se mantiene alrededor del 60% para valores de pH comprendidos entre 4,5 y 5,5 (Capaldo et al., 2011).

Para caracterizar con más detalle la proteína Lp_2777 (Pbg4), se realizaron estudios de termoestabilidad. Después de 24 h de incubación Lp_2777 (Pbg4) resultó ser bastante termoestable a 22, 30 y 37 °C manteniendo una actividad relativa superior al 94%. Tras las primeras 12 h de

incubación la proteína Lp_2777 (Pbg4) mantuvo aproximadamente un 80% de actividad relativa a 45 °C (**Figura 12C**).

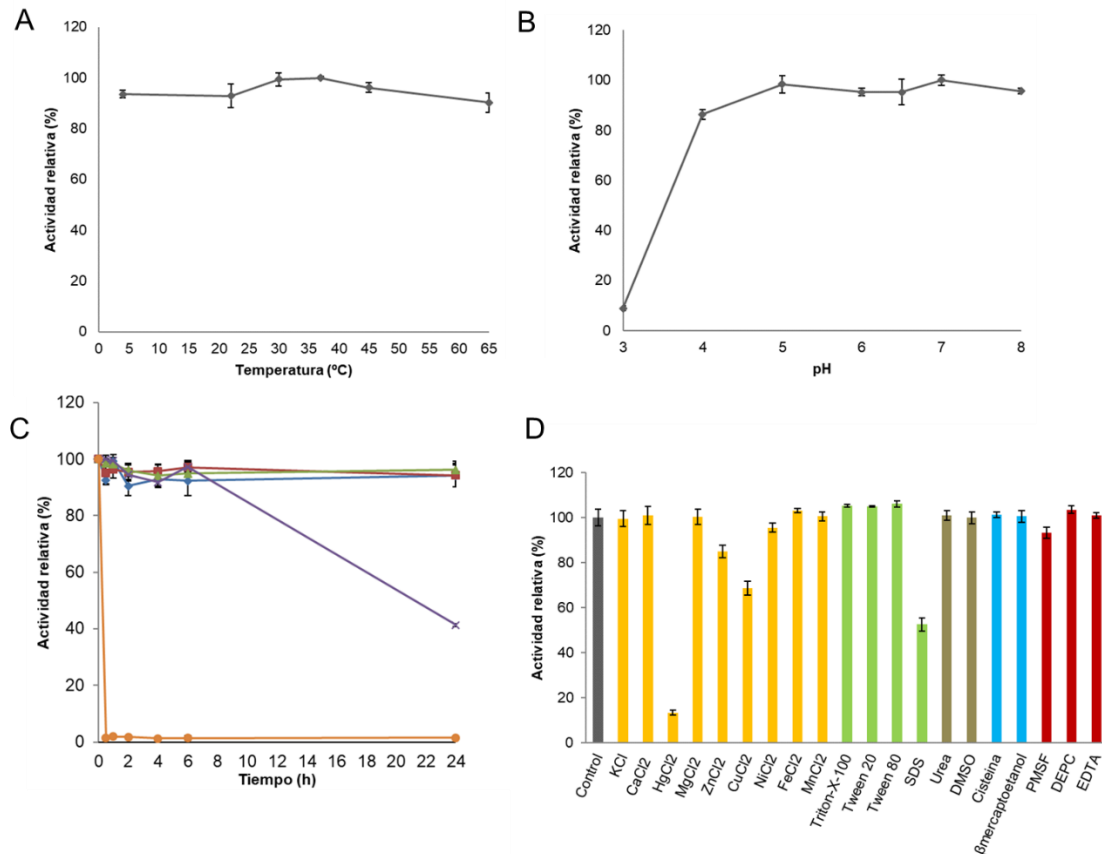


Figura 12. Caracterización de la 6-P-β-D-galactosidasa recombinante Lp_2777 (Pbg4) de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática. Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 (C). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática: iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (D). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C y D, el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo fueron considerados respectivamente como el 100% de actividad.

Como se puede observar en la **Figura 12D**, la actividad relativa de la proteína Lp_2777 (Pbg4) con respecto al control sin aditivo no se vio afectada de forma significativa por ninguno de los aditivos ensayados. Sin embargo en el caso de la 6-P- β -D-glucosidasa BglD de *O. oeni* los aditivos que incrementaron la actividad del enzima fueron Ca^{2+} y Mg^{2+} (Capaldo et al., 2011) que no causaron ningún efecto aparente en la actividad de Lp_2777 (Pbg4). El ión Cu^{2+} y el detergente SDS redujeron la actividad de la proteína Lp_2777 (Pbg4) a un 68 y 53% respectivamente, mientras que el ión Hg^{2+} redujo drásticamente la actividad hasta un 13%. Estos resultados son coincidentes con los descritos para la 6-P- β -D-glucosidasa BglD de *O. oeni* donde el ión Cu^{2+} también disminuyó su actividad enzimática, incluso en mayor medida. Además los iones Co^{2+} y Mn^{2+} también ejercieron un efecto inhibitor (Capaldo et al., 2011). El efecto inhibitor del detergente SDS puede ser debido a una desnaturalización parcial de la proteína.

En la caracterización de la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_2777 (Pbg4) también se incluyó el estudio de sus parámetros cinéticos (**apartado 5.4. de Materiales y Métodos**). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 150 μL en condiciones estándar. Para cada concentración de sustrato, se añadió el volumen correspondiente de tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 y una cantidad de 4 μg de enzima. Posteriormente, el lector de microplacas *PowerWave HT* (Bio-Tek, USA) se programó para que la reacción tuviera lugar a 30 $^{\circ}\text{C}$ y para que tomase medidas cada 30 s durante 10 min a 420 nm. La proteína Lp_2777 (Pbg4) presentó una $E_{cat} (k_{cat}/K_M) = 911,2 \pm 144,9 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (**Tabla 12**) siendo este resultado del orden de 1000 veces superior al valor de la 6-P- β -D-glucosidasa SPy1599 de *Streptococcus pyogenes* (Stepper et al., 2013) y muy inferior al valor de la 6-P- β -D-glucosidasa GK3214 de *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (Suzuki et al., 2013).

La **Figura 8** mostró que el mayor grado de identidad entre las 6-P- β -D-glucosidasas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1 se encuentra entre las proteínas Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5) (66%) y entre Lp_2777 (Pbg4) y Lp_0440 (Pbg1) (64%); puesto que todas ellas presentan alta actividad 6-P- β -

D-glucosidasa se decidió comparar sus parámetros cinéticos frente a este compuesto.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de las 6-P-β-D-glucosidasas Lp_0440 (Pbg1), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5) de *L. plantarum* WCFS1.

	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	E_{cat} (k_{cat}/K_M) (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Lp_0440	0,001±1,8x10 ⁻⁶	0,7±0,1	0,5±1,9x10 ⁻⁶	0,7±0,1
Lp_2777	39,5±0,01	2,4±0,4	2161±0,01	911,2±144,9
Lp_2778	1,9±0,0004	0,7±0,1	102,7±0,0004	146±27

Las proteínas Lp_0440 (Pbg1), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5) presentaron los valores de V_{max} y K_M que se muestran en la **Tabla 12**. Con estos datos se calcularon los parámetros k_{cat} y E_{cat} (k_{cat}/K_M). De estos resultados se puede destacar que la proteína Lp_2777 (Pbg4) mostró una eficiencia catalítica que resultó ser del orden de 1000 y 800 veces mayor que las eficiencias presentadas por las proteínas Lp_0440 (Pbg1) y Lp_2778 (Pbg5) respectivamente.

Como se ha comentado anteriormente, las 6-P-β-D-glucosidasas Lp_0440 (Pbg1), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5) muestran un alto grado de identidad en su secuencia. Sin embargo, se han descrito notables diferencias catalíticas respecto a la hidrólisis de *p*-NF-6-P-β-D-glucopiranosido. También existen diferencias en cuanto a la especificidad de sustrato que presentan, destacando especialmente la alta actividad mirosinasa que sólo presenta Lp_2777 (Pbg4), y la baja actividad 6-P-β-D-galactosidasa que presenta Lp_0440 (Pbg1). Puesto que la estructura cristalográfica de la proteína Lp_0440 (Pbg1) estaba resuelta anteriormente (Michalska et al., 2013) se decidió intentar abordar el estudio de la estructura cristalográfica de Lp_2777 (Pbg4) con el fin de poder atribuir las diferencias observadas a alguna diferencia estructural.

La estructura cristalográfica de la proteína Lp_0440 (Pbg1), que ya estaba resuelta anteriormente (Michalska et al., 2013), revela que esta enzima presenta la típica estructura de barril TIM (β/α)₈ en la que se puede observar el

barril central formado por láminas β , rodeado de α hélices, así como de diversos bucles que conectan las estructuras α y β . El alineamiento múltiple de secuencia entre las proteínas Lp_0440 (Pbg1), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5) revela que existen grandes regiones de similitud entre ellas (**Figura 13**). Los residuos catalíticos Glu-180 y Glu-375 en Lp_0440 (Pbg1), así como los residuos de Lys de unión a fosfato [Lys-438 en Lp_0440 (Pbg1)] se encuentran conservados. En naranja se resaltan los bucles próximos al centro activo donde se observa que existen algunas diferencias que podrían explicar los valores en los parámetros cinéticos calculados, así como en la especificidad de sustrato, y que sólo se puede verificar mediante la resolución de la estructura cristalográfica de estas proteínas.

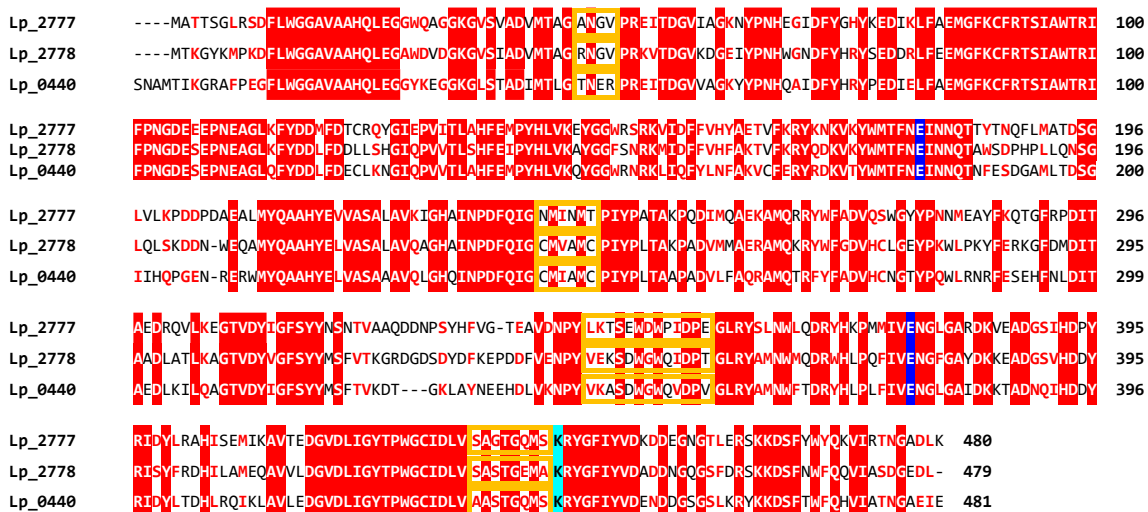


Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas Lp_0440 (Pbg1), Lp_2777 (Pbg4) y Lp_2778 (Pbg5). Se señalan las regiones estrictamente conservadas (letra blanca sobre fondo rojo), los cambios conservativos (letra roja sobre fondo blanco) o no conservativos (letra negra sobre fondo blanco), los residuos catalíticos [Glu-180 y Glu-375 en Lp_0440 (Pbg1)] (letra blanca sobre fondo azul), los bucles importantes (recuadrado naranja) y el residuo Lys-438 [en Lp_0440 (Pbg1)] de unión a fosfato (letra negra sobre fondo turquesa).

Con objeto de caracterizar la estructura tridimensional de Lp_2777 (Pbg4) se realizaron experimentos de cristalización. La estrategia general que se llevó a cabo consistió en dos etapas: una primera de determinación de condiciones de cristalización mediante técnicas de alto rendimiento empleando sistemas automáticos (robots de cristalización), y una segunda, de optimización de esas condiciones preliminares, mediante técnicas manuales. Los resultados de precristalización (**apartado 5.5 de Materiales y Métodos**) mostraron que una concentración de 20 mg/mL de la proteína Lp_2777 (Pbg4) era adecuada para llevar a cabo los experimentos de cristalización.

El siguiente paso fue utilizar el robot *Innovadyne Nanodrop ExtY* (*Solve Scientific*, Australia, Nueva Zelanda). El volumen final de las gotas se ajustó a 500 nL, resultado de mezclar 250 nL de solución de proteína con 250 nL de solución de cristalización, y se equilibró frente a un reservorio de 65 μ L de solución de cristalización. Las placas empleadas contenían diferentes soluciones de cristalización derivadas de productos comerciales. Una vez que se realizó la mezcla, las placas se sellaron con cinta adhesiva para impedir la desecación y se mantuvieron a 18 °C.

Después de 24 h de incubación de las placas, se pudo comprobar la presencia de cristales en tampón MES 0,1 M, pH 6,0, MgCl₂ 0,2 M, 20% PEG 6000 utilizando el kit *PACT* (*Quiagen*). Se seleccionó esta condición para proceder a la optimización de los cristales de Lp_2777 (Pbg4). Se pudo comprobar que modificaciones en la concentración de PEG, de MgCl₂ o del pH conducían a la pérdida de los cristales. La única variable que condujo a mejorar los cristales fue la variación de la relación de volumen precipitante:proteína y el volumen final de la gota. Se consideraron estas relaciones: 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, 2:4 y 4:2 [v/v (precipitante:proteína)]. Los cristales mejoraron su aspecto en cuanto a forma y tamaño para la relación 1:3 (v/v) (precipitante: proteína), con un volumen final de 4 μ L. Finalmente los cristales optimizados aparecían como barras con extremos en punta (**Figura 14**).

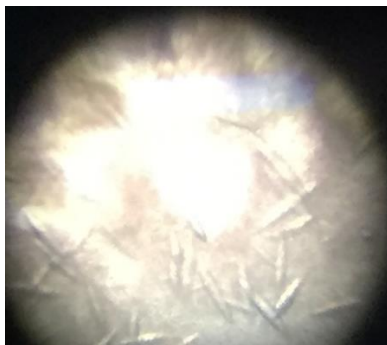


Figura 14. Cristales de la proteína recombinante Lp_2777 (Pbg4) de *L. plantarum* WCFS1 obtenidos en tampón MES 0,1 M, pH 6,0, MgCl₂ 0,2 M, 20% PEG 6000 a una relación 1:3 (v/v) (precipitante: proteína), con un volumen final de 4 μ L.

Aunque los resultados alcanzados en este trabajo han supuesto un notable avance en el proyecto de caracterización estructural de la proteína Lp_2777 (Pbg4), se hace necesario actualmente conseguir cristales de calidad adecuados para llevar a cabo experimentos de difracción de rayos X en fuentes de radiación sincrotrón. Los resultados podrían servir para determinar las bases estructurales de la especificidad de esta enzima, en comparación con Lp_0440 (Pbg1) y Lp_2778 (Pbg5), todas ellas de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1.

Los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica de la glicosil hidrolasa Lp_2777 (Pbg4) de la familia GH1, indican que esta proteína tanto por su amplio intervalo de temperatura y pH óptimos, como por su alta eficiencia catalítica y por su especificidad de sustrato es una enzima adecuada para su posible utilización industrial como 6-P- β -D-glucosidasa o bien como mirosinasa.

1.2.1.2. Lp_3525

La glicosil hidrolasa Lp_3525 (Pbg9) fue la única 6-P- β -D-glucosidasa de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1 que presentó también actividad 6-P- β -D-galactosidasa como actividad principal (**Figura 7**) por ello también se llevó a

cabo su caracterización bioquímica como 6-P- β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.85) utilizando *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido como sustrato. La existencia de glicosidasas poliespecíficas, entre las que se encuentran enzimas de la familia GH1, como es el caso de Lp_3525 (Pbg9), pone de manifiesto que la adquisición de nuevas especificidades de sustrato en glicosidasas es un evento común en la evolución de estas enzimas (Henrissat y Bairoch, 1993).

Tras clonar el gen *pbg9* (*lp_3525*), e hiperproducir y purificar la enzima Lp_3525 (Pbg9) tal y como se describe en el **apartado 1.2.1** de este mismo capítulo, se obtuvieron 3,4 mg de proteína por litro de cultivo (**Tabla 11**). Como se puede observar en la **Figura 9**, la proteína Lp_3525 (Pbg9), purificada y dializada, presenta un tamaño molecular de 54,6 kDa (**Tabla 11**).

La glicosil hidrolasa recombinante Lp_3525 (Pbg9) de *L. plantarum* WCFS1 presentó una temperatura óptima de 45 °C. Su actividad desaparece casi por completo a temperaturas superiores, y se ve disminuida de manera considerable a temperaturas inferiores, alcanzando valores de sólo un 50% de actividad máxima a 37 °C y de un 30% a 30 °C (**Figura 15A**). En estudios previos realizados por Honda et al. (2012) en los que se analizó la actividad de dos 6-P- β -D-galactosidasas (LacG1 y LacG2) de *Lactobacillus gasseri* ATCC33323^T, se observó que la proteína LacG1 presentó una temperatura óptima de 40 °C, muy similar a la que presenta la proteína Lp_3525 (Pbg9) caracterizada en esta tesis, mientras que la temperatura óptima para la proteína LacG2 fue de 50 °C. Resulta interesante comparar los resultados obtenidos utilizando *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido como sustrato con los obtenidos al utilizar *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido puesto que con el primer sustrato la enzima posee una clara temperatura óptima a 40 °C, mientras que con el segundo sustrato presenta una actividad muy similar en casi todas las temperaturas ensayadas (**Figura 10**).

Como se puede observar en la **Figura 15B**, el pH óptimo de la enzima Lp_3525 (Pbg9) para su actividad 6-P- β -D-galactosidasa es 4,0, presentando un intervalo de actividad óptima muy estrecho. La actividad relativa a pH 3,0 es aproximadamente del 70% de la actividad máxima, mientras que disminuye hasta un 50% a pH 5,0. De manera similar a lo que ocurre con la temperatura

óptima, al utilizar *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido como sustrato, la enzima fue activa en un amplio intervalo de pH (pH de 6,0 a 9,0) (**Figura 11**) mientras que presenta un claro pH óptimo a 4,0 cuando el sustrato utilizado es *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido. Una 6-P- β -galactosidasa de *Lactobacillus gasseri* JCM 1031 caracterizada en un estudio previo (Suzuki et al., 1996) presentó un pH óptimo de 5,5, que coincide con el de la enzima LacG2 de *L. gasseri* mencionada anteriormente. De forma similar a lo que ocurre con Lp_3525 (Pbg 9), todas las 6-P- β -galactosidasas de *L. gasseri* descritas muestran alta actividad a pH ácidos. A pH más básicos, su actividad disminuye progresivamente, presentando valores de actividad del 40% a pH 6,0 y perdiendo por completo la actividad a pH 8,0.

En la **Figura 15C**, se observa que la actividad del enzima casi no se ve afectada después de 30 min de incubación a 22, 30 y 37 °C, presentando valores de actividad relativa superiores al 80%. No obstante, la actividad disminuye hasta un 70% a partir de las 6 h de incubación a 37 °C y se mantiene constante tras 24 h de incubación. Estos resultados son similares a los obtenidos por Suzuki et al. (1996) con la P- β -galactosidasa de *L. gasseri* que resultó ser estable a temperaturas inferiores a 50 °C, mientras que quedaba completamente inactivada a temperaturas superiores a 70 °C. Se puede concluir, por tanto, que la enzima Lp_3525 (Pbg9) presenta estabilidad térmica a 22 y 30 °C, ya que transcurridas 24 h de incubación, mantiene una actividad relativa del 85%.

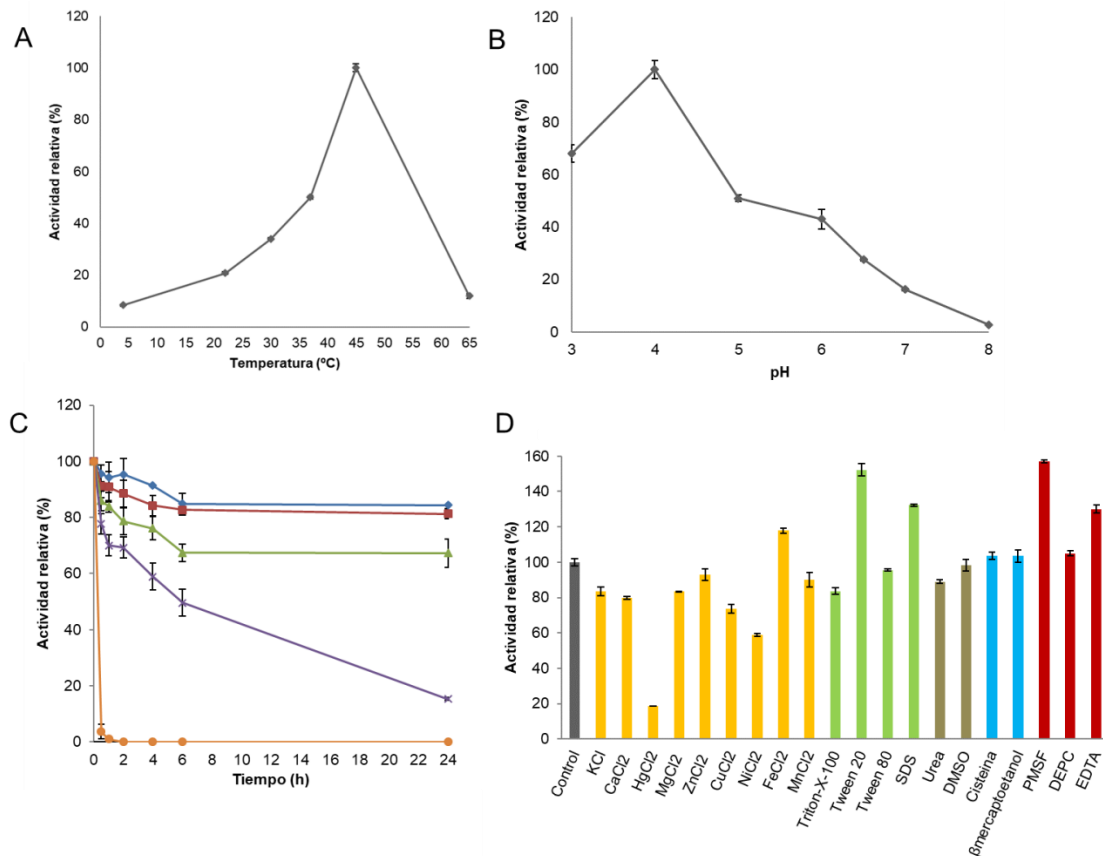


Figura 15. Caracterización de la 6-P-β-galactosidasa recombinante Lp_3525 (Pbg9) de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática. Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 (C). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática: iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (D). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C y D, el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo fueron considerados respectivamente como el 100% de actividad.

Los resultados obtenidos respecto al estudio del efecto de aditivos muestran que, de los iones metálicos ensayados, el Fe^{2+} es el único capaz de aumentar la actividad enzimática en un 118% pudiendo actuar como un cofactor en la catálisis (Matsarskaia et al., 2018) (**Figura 15D**). Por el contrario, el ion Hg^{2+} afecta negativamente a la enzima, ya que, en su presencia, la actividad relativa se ve reducida hasta un 18%. El efecto de ambos iones, es

similar al descrito durante la caracterización de la 6-P- β -galactosidasa de *L. gasseri* comentada previamente (Suzuki et al., 1996). El Ni²⁺ también provoca un efecto negativo en la enzima Lp_3525 (Pbg9), pero en este caso la actividad relativa se reduce solo hasta el 60%. Respecto a los detergentes empleados, el Tween 20 y el SDS aumentan la actividad enzimática un 152 y 132% respectivamente, debido posiblemente a que su efecto tensioactivo puede estar estabilizando la proteína (Jones et al., 2018). El PMSF, agente inhibidor de proteasas de serina, provoca un efecto positivo sobre la actividad de la enzima Lp_3525 (Pbg9) cuando se añade a la reacción, del mismo modo que ocurre con el EDTA, que es un agente quelante de cationes divalentes, los cuales aumentan la actividad relativa a un 157 y 130% respectivamente. Estos resultados parecen indicar que el centro activo de la enzima no presenta residuos de serina. De forma general los efectos activadores de los aditivos mencionados anteriormente pueden estar producidos por cambios conformacionales, secuestro de iones inhibidores o ser debidos a un efecto tensioactivo (Otzen, 2011).

La proteína Lp_3525 (Pbg9) frente al sustrato *p*-NF-6-P- β -D-galactopiranosido presentó los valores de V_{max} y K_M que se muestran en la **Tabla 13**. A partir de estos valores se calcularon los parámetros cinéticos k_{cat} y E_{cat} (k_{cat}/K_M). Los valores de eficiencia catalítica descritos en las dos 6-P- β -D-galactosidasas de *L. gasseri*, LacG1 (3360 min⁻¹ mM⁻¹) y LacG2 (5580 min⁻¹ mM⁻¹) utilizando *o*-NF-Gal-6P, son del orden de 10 a 20 veces mayores que la eficiencia obtenida en la 6-P- β -galactosidasa Lp_3525 (Pbg9) de *L. plantarum* WCFS1 (Honda et al., 2012). Puesto que la proteína Lp_3525 (Pbg9) también presentó actividad frente al sustrato *p*-NF-6-P- β -D-glucopiranosido se calcularon los parámetros cinéticos de la enzima frente a este sustrato tal y como se muestran en la **Tabla 13 (apartado 5.4. de Materiales y Métodos)**. La proteína Lp_3525 (Pbg9) presentó una actividad específica de 0,1 U mg⁻¹ como 6-P- β -D-glucosidasa y de 1,3 U mg⁻¹ como 6-P- β -D-galactosidasa, por lo que la actividad específica fue más de 10 veces superior para el derivado de galactosa. A pesar de ello, la actividad específica de la 6-P- β -D-galactosidasa de *L. plantarum* WCFS1 fue unas 20 veces inferior que la actividad específica de una 6-P- β -D-galactosidasa de *Leptotrichia buccalis* ATCC 14201 (21,6 U

mg⁻¹) descrita previamente (Thompson, 2002). Por otro lado, analizando la eficiencia catalítica tanto para el derivado *p*-NF-6-P-β-D-glucopiranosido como para el derivado *p*-NF-6-P-β-D-galactopiranosido, se puede observar que la capacidad de hidrólisis de la glicosidasa Lp_3525 (Pbg9) fue mayor para el derivado de galactosa que para el de glucosa, ya que dicha constante presentó un valor para el derivado *p*-NF-6-P-β-D-galactopiranosido, aproximadamente 40 veces mayor que el obtenido frente a *p*-NF-6-P-β-D-glucopiranosido.

Tabla 13. Parámetros cinéticos de la glicosil hidrolasa Lp_3525 (Pbg9) como 6-P-β-glucosidasa y 6-P-β-galactosidasa.

	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	E_{cat} (k_{cat}/K_M) (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Lp_3525 Glu	0,1±7,1x10 ⁻⁵	1,3±0,3	7,3±7,1x10 ⁻⁵	5,8±1,5
Lp_3525 Gal	1,3±7,1x10 ⁻⁵	0,3±0,02	677,1x10 ⁻⁵	242±20

En esta tesis se ha demostrado que, aunque la glicosidasa Lp_3525 (Pbg9) de la familia GH1 de *L. plantarum* WCFS1 está anotada como una 6-P-β-glucosidasa (**Tabla 10**) es, además, una 6-P-β-galactosidasa (**Figura 7**). De hecho, los parámetros cinéticos obtenidos demuestran que la eficiencia es mayor en la hidrólisis de *p*-NF 6-P-β-galactopiranosido que en la de *p*-NF-6-P-β-D-glucopiranosido. Este resultado corrobora que las anotaciones en función de la secuencia o estructura de las proteínas deben ser verificadas experimentalmente mediante la producción de la proteína recombinante y su posterior caracterización bioquímica.

1.2.2. Familia 13 (GH13)

Según la base de datos CAZy, dentro de la familia GH13 de glicosil hidrolasas se encuentran incluidas proteínas con actividad α-amilasa (EC 3.2.1.1), oligo-1,6-glucosidasa (EC 3.2.1.10), α-glucosidasa (EC 3.2.1.20), pululasa (EC 3.2.1.41), ciclomaltodextrinasa (EC 3.2.1.54), α-amilasa formadora de maltotetraosa (EC 3.2.1.60), isoamilasa (EC 3.2.1.68), dextrano glucosidasa

(EC 3.2.1.70), trehalosa-6-hidrolasa (EC 3.2.1.93), α -amilasa formadora de maltohexaosa (EC 3.2.1.98), α -amilasa formadora de maltotriosa (EC 3.2.1.116) y amilasa maltogénica (EC 3.2.1.99).

Dentro de esta familia un número elevado de glicosidasas poseen módulos de unión a carbohidratos (CBM), referidos como dominios de unión de almidón. El almidón es el polisacárido más utilizado como ingrediente alimentario. Está compuesto por amilosa, que a su vez está compuesta por polímeros de glucosa α -1,4, y amilopectina, compuesta por polímeros de glucosa α -1,4, con ramificaciones α -1,6. Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) incluidas dentro de la familia GH13, catalizan la hidrólisis de enlaces glucano internos α -1,4, además de realizar reacciones de transglicosilación (Kuriki y Imanaka, 1999). Las α -amilasas clasificadas en la familia GH13 comparten de cuatro a siete regiones de secuencia conservadas (CSR) (Martinovičová y Janeček, 2018). Al igual que las glicosidasas de la familia GH1, presentan la estructura de barril TIM (β/α)₈ con ocho hélices α y ocho láminas β paralelas que se alternan formando un solenoide que se curva para cerrarse sobre sí mismo en forma de toroide.

Actualmente, en la base de datos CAZy existen 42 subfamilias de GH13, aunque no todas las enzimas GH13 están asignadas a una subfamilia (Janeček et al., 2014). Dentro de la familia GH13, las α -amilasas que se encuentran incluidas dentro de una misma subfamilia presentan un mayor grado de similitud de secuencia entre sí que con los miembros de otras subfamilias de GH13.

1.2.2.1. Lp_0179 y Lp_2757

Generalmente, las subfamilias de GH13 incluyen a proteínas que presentan actividades glicosídicas diferentes, aunque estrechamente relacionadas. En la subfamilia GH13_20, que agrupa actividades ciclomaltodextrinasa (EC 3.2.1.54), α -amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), y neopululanasa (EC 3.2.1.135) (Lee et al., 2002; Stam et al., 2006). Estas enzimas se distinguen de

las α -amilasas típicas (EC 3.2.1.1) por poseer un dominio N-terminal responsable de la preferencia como sustrato por ciclomaltodextrinas en lugar de almidón (Lee et al., 2002).

A pesar de la disponibilidad de la secuencia del genoma de *L. plantarum* WCFS1, todavía existe una información limitada sobre la función de los genes que codifican α -amilasas. Como se ha comentado anteriormente, al describir la clasificación utilizada por la base de datos CAZy, hoy en día se utiliza más la clasificación de las glicosidasas en función de la similitud de su secuencia de aminoácidos, o de su estructura tridimensional, las cuales reflejan una relación evolutiva, en lugar de una clasificación en función de la especificidad de sustrato. Sin embargo, este enfoque, abre la puerta a que enzimas que poseen una misma función bioquímica puedan estar clasificadas por separado, y también al hecho de que reacciones similares puedan estar catalizadas por enzimas estructuralmente diferentes y, por lo tanto, por proteínas no relacionadas evolutivamente (Janeček et al., 2014). En definitiva, teniendo en cuenta esta multitud de posibilidades, para poder asignar una función bioquímica específica a una proteína es necesario caracterizar la proteína correspondiente.

Las enzimas con actividad α -amilasa tienen múltiples aplicaciones en el procesamiento del almidón, producción de alcohol, elaboración de cerveza, sector textil e industria del papel (Souza y Magalhães, 2010), además de en la industria alimentaria, biomédica, farmacéutica y química (Outtrup y Norman, 1984; Jeon et al., 2016). *L. plantarum* WCFS1 posee 11 proteínas incluidas en la familia GH13. Entre estas proteínas, sólo dos están anotadas como " α -amilasas", Lp_0179 (Amy2, α -amilasa) y Lp_2757 (α -amilasa maltogénica). La proteína Amy2 (LpMA) de *L. plantarum* spp. *plantarum* ST-III ha sido previamente caracterizada y estudiada como α -amilasa formadora de maltosa (Jeon et al. 2016). La proteína Amy2 de esta cepa posee una secuencia de aminoácidos idéntica a la proteína Lp_0179 (Amy2) de *L. plantarum* WCFS1 (datos no mostrados). La proteína Lp_0179 (Amy2) tiene 440 aminoácidos y presenta los tres dominios típicos de la familia GH13, la estructura catalítica de barril TIM (β/α)₈ (dominio A) con un pequeño dominio B que sobresale del barril

entre la cadena $\beta 3$ y la hélice $\alpha 3$, además de una región C-terminal (dominio C), adoptando un plegamiento β antiparalelo en forma de sándwich (Janeček et al., 2014). En la **Figura 16** se muestra un esquema de sus dominios. Además, la proteína Lp_0179 (Amy2) posee cuatro regiones de secuencia conservadas de la familia GH13 (CSR) (CSR I, II, III, y IV) próximas al dominio C-terminal de las cadenas $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ y $\beta 7$ del barril TIM (β/α)₈ que además incluyen la tríada catalítica (**Figura 16**). La tríada catalítica de las proteínas incluidas en la familia GH13 consiste en Asp-171 (nucleófilo catalítico), Glu-200 (donador de protones), y Asp-277 (estabilizador del estado de transición) en la proteína Lp_0179 (Amy2) (**Figura 16**). Dentro de la familia GH13, la identidad de secuencia entre las proteínas incluidas es muy baja y sólo la tríada catalítica, además de la Arg-169 en Lp_0179 (Amy2) se mantienen conservados de forma general (Janeček et al., 2014) (**Figura 16**).

A diferencia de la proteína Lp_0179 (Amy2), que aún no ha sido asignada a una subfamilia, la proteína Lp_2757 está incluida en la subfamilia GH13_20. Los miembros de esta subfamilia se distinguen por la especificidad de sustrato, con preferencia sobre ciclomaltodextrinas en lugar de almidón, y por la presencia de un dominio N-terminal que precede al barril TIM (β/α)₈ (**Figura 16**). Aunque la función de este dominio N-terminal aún no se conoce completamente, se ha descrito que a menudo actúa a modo de ancla para la unión del almidón (Abe et al., 2005). Este dominio de unión al almidón también se ha clasificado dentro de la base de datos CAZy como módulo de unión a carbohidratos (CBM). La base de datos de CAZy incluye este dominio N-terminal que posee la glicosil hidrolasa Lp_2757 en la familia 34 (CBM34). Además de este dominio N-terminal, la proteína Lp_2757, así como otras α -amilasas de la familia GH13, posee tres de las regiones de secuencia conservadas (CSR V, VI y VII), próximas a la región C-terminal del dominio B y/o próximas a la región C-terminal de las láminas $\beta 2$ y $\beta 8$ del barril TIM, además de otros residuos que pueden explicar las diferentes especificidades de las glicosil hidrolasas de la familia GH13 entre sí (Janeček et al., 2014) (**Figura 16**).

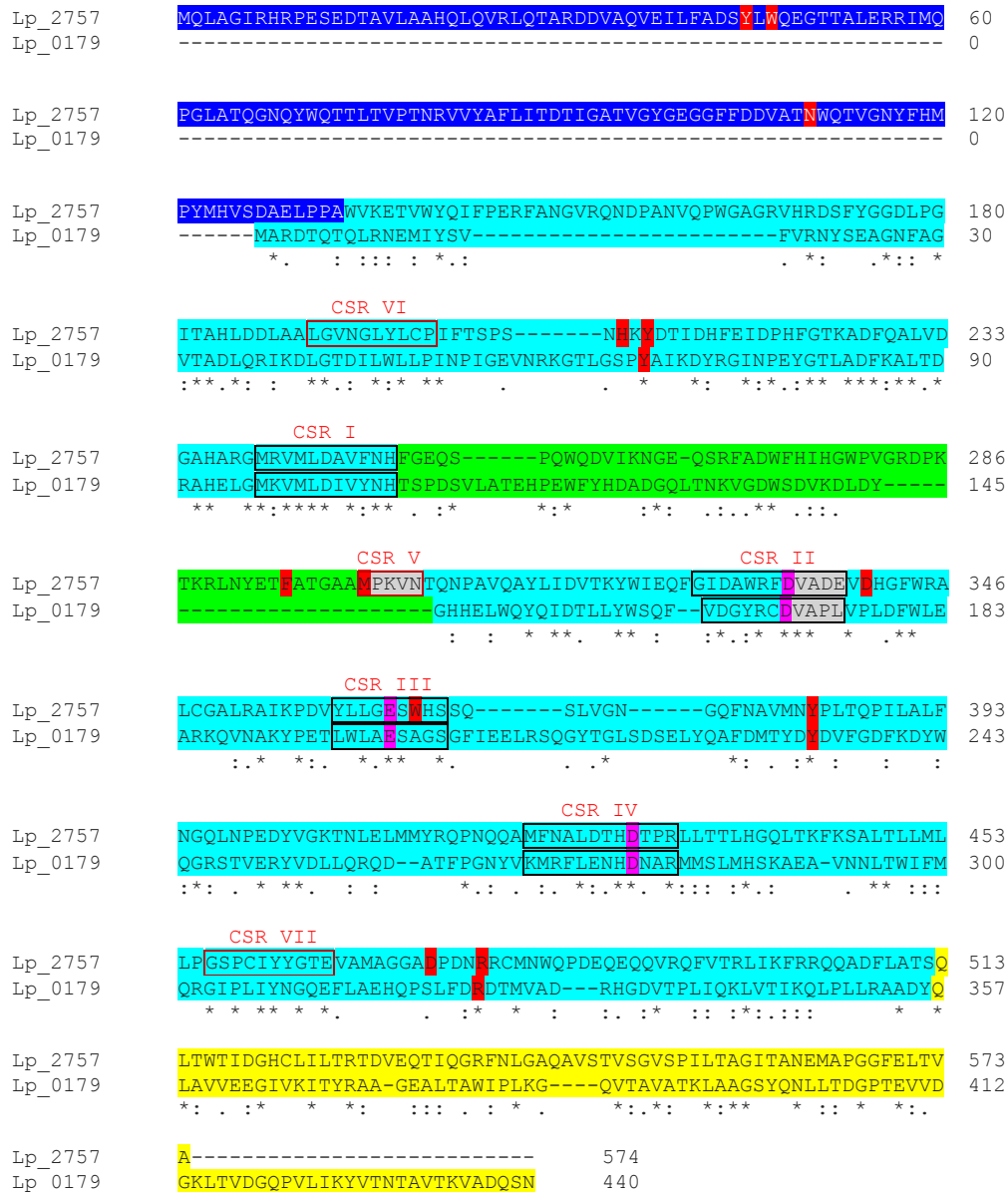


Figura 16. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las glicosidasas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757 de la familia GH13 de *L. plantarum* WCFS1. El alineamiento se realizó utilizando el programa *Clustal Omega*. (*) identidad entre aa, (:) cambio semiconservativo, (.) cambio conservativo y (-) espacios introducidos para maximizar similitudes. Los tres dominios típicos de la familia GH13 se encuentran sombreados en azul (dominio A), en verde (dominio B) y en amarillo (dominio C). El dominio N-terminal de Lp_2757 (CBM34) se indica en azul oscuro. Las siete regiones conservadas (CSR) en la subfamilia GH13_20 de α -amilasas se encuentran también señaladas. Los residuos de la triada catalítica de la familia GH13 (Asp 171, Glu 200 y Asp 227 en Lp_0179) se indican en rosa. Los residuos conservados en enzimas amilolíticas se muestran en rojo (Lee et al., 2002). Los motivos conservados VAnE y MpkIn en CSR II y V respectivamente aparecen señalados en gris.

Las α -amilasas de la subfamilia GH13_20 se pueden diferenciar fácilmente de otras amilasas en base a la conservación de los residuos de Trp-47 y Phe-295 (Lee et al., 2002). Por otra parte, el Glu-338 está conservado en la subfamilia GH13_20. A este residuo se le atribuye la función de aceptor de oligosacáridos (Park et al., 2000). El residuo Glu-338 forma parte de la región conservada VANE que se encuentra detrás del nucleófilo catalítico en el dominio RSC II (**Figura 16**). Además, la subfamilia GH13_20 se caracteriza por poseer el motivo de secuencia MpKIn en el dominio CSR V (Majzlová et al., 2013). A pesar de que las glicosil hidrolasas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1 se encuentran anotadas como α -amilasas que pertenecen a la familia GH13, su identidad de secuencia de aminoácidos es sólo del 26,4%, no encontrándose relacionadas en cuanto a su estructura.

En esta tesis se clonaron los genes *amy2* (*lp_0179*) y *lp_2757* que codifican las glicosil hidrolasas Amy2 (Lp_0179) y Lp_2757, respectivamente, de *L. plantarum* WCFS1 utilizando las parejas de oligonucleótidos y los vectores de clonaje que se muestran en la **Tabla 11**. Ambas proteínas se hiperprodujeron en *E. coli* BL21 (DE3), se purificaron mediante columnas de afinidad, y se dializaron tal y como se describe en los **apartados 3.6.1 y 5.1 de Materiales y Métodos**. Se obtuvieron 6,6 mg de proteína por litro de cultivo de la proteína Lp_0179 (Amy2) y 5,3 mg de proteína por litro de cultivo de la proteína Lp_2757 (**Tabla 11**).

La pureza de estas proteínas se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 17**), donde se puede observar que en las fracciones eluidas de las columnas de afinidad con imidazol, aparecen la proteína recombinante Lp_0179 (Amy2) con un tamaño de 49,9 kDa (440 aa) y la proteína recombinante Lp_2757 con un tamaño de 64,4 kDa (574 aa), ambas coinciden con sus masas moleculares teóricas esperadas (**Tabla 11**).

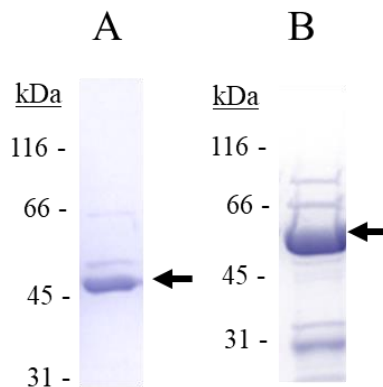


Figura 17. Hiperproducción y purificación de las proteínas recombinantes Lp_0179 (Amy2) (A) y Lp_2757 (B) de la familia GH13 de *L. plantarum* WFCS1. Las flechas indican las fracciones eluidas de las columnas de afinidad con imidazol 150mM y dializadas con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0. Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

Posteriormente, con las glicosil hidrolasas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757 se realizaron ensayos de actividad frente a carbohidratos derivados de *p*-NF, tal y como se muestra en el **apartado 1.2.** de este mismo capítulo. Ambas glicosil hidrolasas presentaron actividad α -D-maltosidasa; la capacidad para hidrolizar *p*-NF- α -D-maltopiranosido indica que ambas glicosidasas hidrolizan enlaces glucosídicos α -1,4. Sin embargo, sólo la proteína Lp_2757 mostró actividad α -D-maltopentaosidasa (86% de actividad relativa frente a la actividad α -D-maltosidasa) (**Figura 7**). En principio, este resultado contrasta con el obtenido previamente al estudiar la actividad de la proteína Lp_0179 (Amy2) frente a *p*-NF- α -D-maltopentaósido, en el que se describió que la proteína si fue capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1,4 del *p*-NF- α -D-maltopentaósido, liberando maltosa y *p*-NF- α -D-maltotriosa (Jeon et al., 2016). Este resultado es aparentemente contradictorio, sin embargo, hay que tener en cuenta que se trata de enlaces diferentes. Mientras que en esta tesis se observa la posible liberación de *p*-NF a partir del derivado nitrofenilo de la α -D-maltopentaosa, Jeon et al. (2016) observan la hidrólisis de un enlace glucosídico α -1,4 interno para liberar *p*-NF- α -D-maltotriosa y maltosa.

Como ambas α -amilasas hidrolizaron *p*-NF- α -D-maltopiranosido, se seleccionó este sustrato para caracterizar las glicosidasas Lp_0179 (Amy2) y

Lp_2757 de la familia GH13 de *L. plantarum* WCFS1. Ambas proteínas presentaron un comportamiento diferente en relación con su pH y temperatura óptimos para la actividad enzimática (**Figura 18**). La glicosidasa Lp_2757 presentó su actividad máxima a 30-37 °C, mientras que la proteína Lp_0179 (Amy2) mantuvo una actividad similar en todas las diferentes temperaturas ensayadas (**Figura 18A**). El pH óptimo fue de 4,0 a 7,0 en la proteína Lp_0179 (Amy2) y de 4,0 a 6,0 para la proteína Lp_2757 (**Figura 18B**). Una amilasa formadora de maltosa de la cepa *L. plantarum* S21, que está ausente en la cepa WCFS1, mostró un comportamiento similar a la proteína Lp_0179 (Amy2) (Majzlová et al., 2013). La amilasa de *L. plantarum* S21 mostró una actividad relativa superior al 80% a valores de pH que van de 5,0 a 6,5, y una temperatura óptima a todas las temperaturas ensayadas (Majzlová et al., 2013). Es interesante destacar que cuando se utiliza almidón soluble como sustrato, la proteína Lp_0179 (Amy2) mostró una temperatura óptima de 30 °C y un pH óptimo más ácido (pH 3,0) (Jeon et al., 2016). Como se ha explicado anteriormente, la razón de las diferencias observadas en pH y temperatura óptimos de la proteína Lp_0179 (Amy2) entre los resultados de esta tesis y el estudio realizado por Jeon et al. (2016) pueden deberse, en parte, al diferente enlace glucosídico hidrolizado en ambos estudios. En un estudio realizado con una α -amilasa de *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, 44% idéntica a la proteína Lp_2757, la temperatura óptima de reacción fue 55 °C (Oh et al., 2005), superior a la temperatura óptima observada tanto para la proteína Lp_0179 (Amy2), como para la proteína Lp_2757 en esta tesis. La α -amilasa de *L. gasseri* ATCC 33323 mostró su mayor actividad hidrolítica en tampón acetato sódico 50 mM pH 5,0, ya que las actividades enzimáticas no sólo dependen del pH, sino también del tipo de tampón utilizado (Oh et al., 2005). Las α -amilasas de *Alicyclobacillus* sp. y de la cepa *Bacillus subtilis* XL8 también mostraron una temperatura óptima elevada, 65 y 70 °C respectivamente, y un pH óptimo ácido (Zhang et al., 2018; Wang et al., 2019).

En relación con su termoestabilidad, ambas enzimas fueron termolábiles a una temperatura superior a 37 °C. Sin embargo, a 37 °C o temperaturas inferiores, la proteína Lp_0179 (Amy2) mostró más del 80% de actividad máxima después de 24 h de incubación, mientras que la proteína Lp_2757

mostró sólo un 60% de actividad relativa (**Figura 18C y 18D**). En una α -amilasa de *Corallocooccus* sp. se observó un comportamiento mesófilo, ya que casi toda la actividad hidrolítica se mantuvo después de que la enzima se incubase durante 60 min a temperaturas superiores a 40 °C; sin embargo, se produjo una importante pérdida de estabilidad enzimática a temperaturas superiores a 50 °C después de 30 min de incubación (Zhou et al., 2018). Se han descrito α -amilasas termoestables en *Arthrobacter agilis* (Kim et al., 2017) y *Alicyclobacillus* (Zhang et al., 2018) que fueron muy activas después de una incubación prolongada a 60 °C.

El efecto de algunos iones metálicos y aditivos sobre la actividad enzimática de las proteínas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1 se muestra en la **Figura 18E**. La actividad enzimática de la proteína Lp_0179 (Amy2) fue inhibida significativamente por el ión metálico Hg^{2+} , y moderadamente por PMSF. Ninguno de los aditivos utilizados aumentó significativamente la actividad hidrolítica de la proteína Lp_0179 (Amy2) de *L. plantarum* WCFS1. Cuando se utilizó el almidón como sustrato, los iones metálicos Co^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{3+} inhibieron completamente la actividad de la proteína Lp_0179 (Amy2) (Jeon et al., 2016). Contrariamente a lo ocurrido con la proteína Lp_0179 (Amy2), la adición de PMSF aumentó moderadamente la actividad de la proteína Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1. Los iones metálicos Cu^{2+} , Hg^{2+} y Ni^{2+} , inhibieron significativamente la hidrólisis de la proteína Lp_2757 sobre *p*-NF- α -D-maltopiranosido. Ambas α -amilasas de *L. plantarum* WCFS1, junto con las α -amilasas de *L. plantarum* S1 (Kanpiengjai et al., 2015) y *Corallocooccus* sp. (Zhou et al., 2018) se inhibieron por la presencia de Cu^{2+} .

Como la proteína Lp_2757 también mostró actividad frente a *p*-NF- α -D-maltopentaósido, también se llevó a cabo su caracterización frente a este sustrato (datos no mostrados). La proteína Lp_2757 mostró un comportamiento similar frente a ambos carbohidratos derivados de *p*-NF en relación con el pH óptimo y la temperatura, aunque presentó una mayor actividad a pH 7,0 para *p*-NF- α -D-maltopentaósido. De forma similar al *p*-NF- α -D-maltopiranosido, los iones metálicos Cu^{2+} , Hg^{2+} y Ni^{2+} también inhibieron significativamente la hidrólisis de *p*-NF- α -D-maltopentaósido con la proteína Lp_2757.

Resultados y discusión

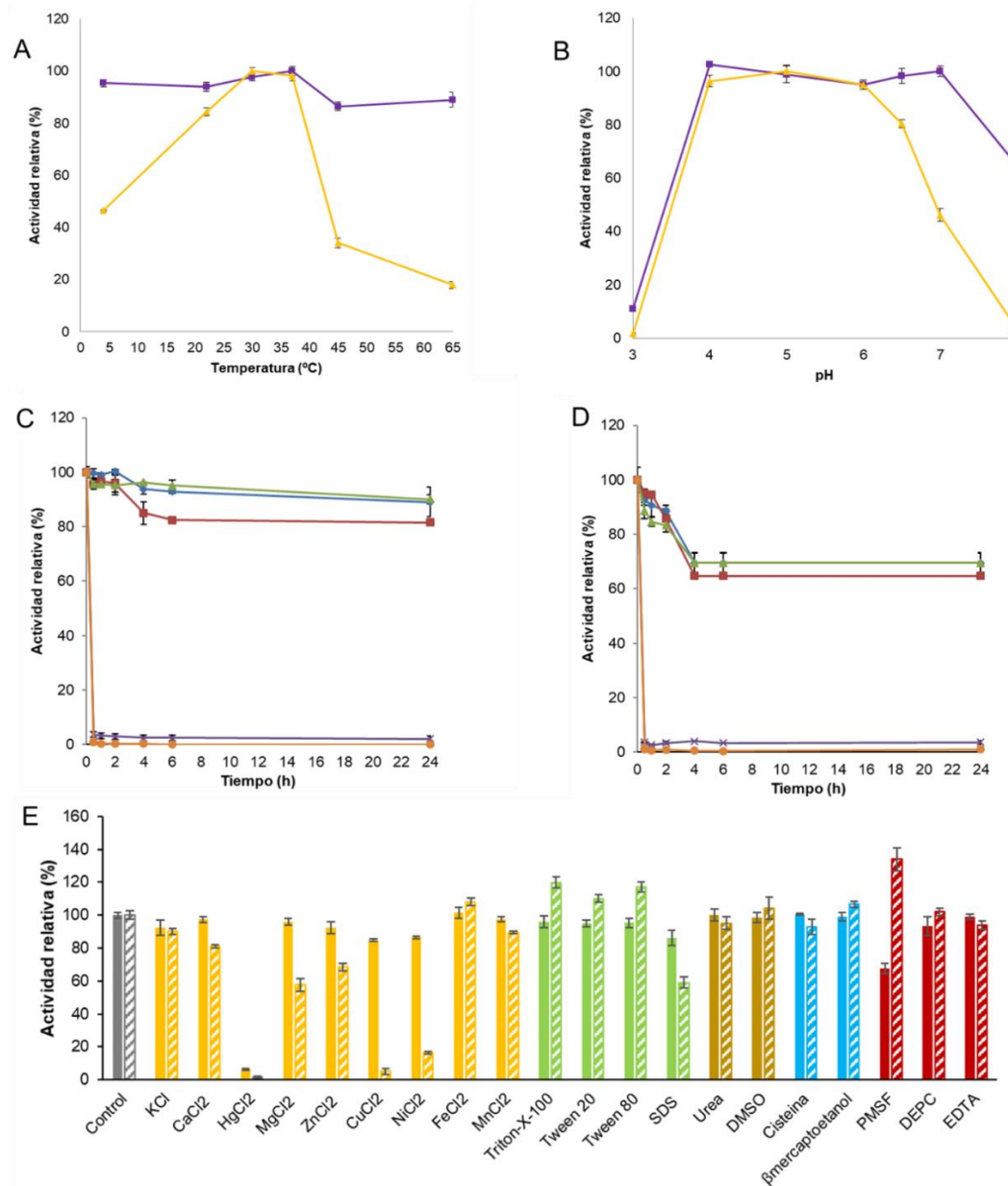


Figura 18. Caracterización de la α -amilasa Lp_0179 (Amy2) y la α -amilasa maltogénica Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática; Lp_0179 (cuadrado morado); Lp_2757 (triángulo amarillo). Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0. Lp_0179 (C) y Lp_2757 (D). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática: iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (E). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C, D y E el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo se consideraron respectivamente como el 100% de actividad.

Los parámetros cinéticos de las proteínas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757 que se muestran en la **Tabla 14** se calcularon utilizando *p*-NF- α -D-maltopiranosido como sustrato a diferentes concentraciones (**apartado 5.4. de Materiales y Métodos**).

Tabla 14. Parámetros cinéticos de las glicosidasas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1 como α -D-maltopiranosidasas (*) y Lp_2757 como α -D-maltopentaosidasa (**).

	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	E_{cat} (k_{cat}/K_M) (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Lp_0179 *	4,3±0,002	0,3±0,07	231,4±0,002	720±153
Lp_2757 *	3,9±0,001	0,6±0,1	294,9±0,001	480±97
Lp_2757 **	15,7±0,003	3,0±0,3	1008,2±0,003	334±33

A pesar de que ambas α -amilasas mostraron para el sustrato *p*-NF- α -D-maltopiranosido un valor de V_{max} similar, el valor de K_M para la proteína Lp_2757 fue aproximadamente el doble que el valor de K_M para la proteína Lp_0179 (Amy2). Por lo tanto, el valor de E_{cat} (k_{cat}/K_M) fue notablemente más alto para la proteína Lp_0179 (Amy2) que para Lp_2757 (**Tabla 14**). Los parámetros cinéticos de la proteína Lp_0179 (Amy2) se han analizado para varios sustratos, encontrándose que el mayor valor de E_{cat} fue para almidón soluble 2,06 (ml/mg) min⁻¹ (Jeon et al., 2016), al igual que para la amilasa maltogénica de *Corallococcus* sp. (16,91 (ml/mg) min⁻¹) (Zhou et al., 2018). Entre los polisacáridos, la eficiencia catalítica de la proteína Lp_0179 (Amy2) fue mayor en amilosa que en amilopectina, 1,44 y 0,45 (ml/mg) min⁻¹, respectivamente (Jeon et al., 2016). La eficiencia catalítica que mostró por maltosa la α -amilasa de *L. plantarum* S21 aunque fue más alta, pero siguió la misma preferencia en amilosa [3,26 (ml/mg) min⁻¹] y amilopectina [1,98 (ml/mg) min⁻¹] (Kanpiengjai et al., 2015).

Los parámetros cinéticos de la proteína Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1 frente al sustrato *p*-NF- α -D-maltopentaósido mostraron un valor de V_{max} superior al valor obtenido para la proteína LpMA de *L. plantarum* subsp. *plantarum* ST-III utilizando maltopentaosa (3,15±0,11 U mg⁻¹). Sin embargo, este valor fue inferior al del sustrato maltosil- β -ciclodextrina (30,09±3,24 U mg⁻¹)

¹⁾ (Jeon et al., 2016). La proteína Lp_2757 presentó una E_{cat} (k_{cat}/K_M) para el sustrato *p*-NF- α -D-maltopentaósido inferior al que se determinó para el sustrato *p*-NF- α -D-maltopiranosido para ambas proteínas. La proteína LpMA de *L. plantarum* subsp. *plantarum* ST-III (Jeon et al., 2016) presentó una E_{cat} de 8,03 $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ para el sustrato maltopentaosa y 117,58 $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ para el sustrato maltosil- β -ciclodextrina, por lo que LpMA resulta ser catalíticamente menos eficiente que la proteína Lp_2757 estudiada en esta tesis.

Ambas α -amilasas de *L. plantarum* WCFS1 mostraron claras diferencias tanto en su estructura, como en su caracterización y parámetros cinéticos, por lo que se realizó de forma complementaria un estudio de su actividad sobre carbohidratos específicos de α -amilasas para conocer su perfil de especificidad de sustrato. Se ha descrito que cepas de *L. plantarum*, *L. amylovorus*, *L. fermentum*, y *L. manihotivorans* aisladas de diversos alimentos poseen enzimas α -amilasas, capaces de catabolizar almidón, amilosa, amilopectina y glucógeno, pero no de degradar pululano o β -ciclodextrina (Oh et al., 2005). Para conocer la especificidad de sustrato de las α -amilasas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757 de *L. plantarum* WCFS1 se realizó un chequeo con doce carbohidratos relacionados con el metabolismo del almidón y las reacciones se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-RID) y cromatografía de gases (GC-FID) (**apartado 6.2 de Materiales y Métodos**). Los resultados se muestran en la **Tabla 15**. La proteína Lp_2757 fue capaz de hidrolizar acarbosa, oligosacáridos y polisacáridos no cíclicos como fécula de patata, amilosa o amilopectina, y también ciclodextrinas (α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina) lo que apoya su clasificación como una “amilasa maltogénica” (EC.3.2.1.133). Sin embargo, el comportamiento de la proteína Lp_0179 (Amy2) en la hidrólisis de carbohidratos relacionados con el almidón fue muy diferente al observado para la proteína Lp_2757, lo que está en línea con las diferencias encontradas en las características estructurales entre estas dos α -amilasas de *L. plantarum* WCFS1. Básicamente, la proteína Lp_0179 (Amy2) sólo hidrolizó maltopentaosa y dextrina, pero no hidrolizó, por ejemplo, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, que son sustratos esencialmente resistentes a la hidrólisis por las α -amilasas comunes, lo que corrobora que la proteína Lp_0179 (Amy2) es una “ α -amilasa” (EC.3.2.1.1).

Tabla 15. Hidrólisis de carbohidratos específicos de α -amilasas mediante Lp_0179 y Lp_2757 de la familia GH13 de *L. plantarum* WCFS1 analizado por GC-FID.

Carbohidratos	Lp_0179	Lp_2757
Almidón	-	+
Amilosa	-	+
Amilopectina	-	+
Pululano	-	+
α -Ciclodextrina	-	+
β -Ciclodextrina	-	+
γ -Ciclodextrina	-	+
Acarbosa	-	+
Panosa	-	+
Maltopentaosa	+	+
Dextrina	+	+

Por lo tanto, la caracterización bioquímica de las glicosidasas de la familia GH13 de *L. plantarum* WCFS1 realizada en esta tesis confirma bioquímicamente su anotación empírica en las bases de datos, quedando demostrado que Lp_2757 es una amilasa maltogénica y que Lp_0179 (Amy2) es una α -amilasa.

1.2.2.2. Lp_0263 y Lp_3220

En esta tesis se han producido 4 proteínas de *L. plantarum* WCFS1 incluidas en la familia GH13 (**Tabla 11**). En el apartado anterior se ha demostrado bioquímicamente la correcta anotación de las glicosidasas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757, como α -amilasa y amilasa maltogénica, respectivamente. Las otras dos proteínas de la familia GH13 son Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) que están anotadas como trehalosa-6-P-hidrolasas (EC. 3.2.1.93). La proteína Lp_3220 (Agl4) además está anotada como sacarosa-6-P-hidrolasa y α -glucosidasa (EC 3.2.1.20). Estas enzimas hidrolizan trehalosa-6-P liberando glucosa y glucosa-6-P, y se ha descrito que también pueden hidrolizar eficazmente *p*-NF- α -D-glucopiranosido. La trehalosa se hidroliza menos eficazmente que la trehalosa-6-P (Helfert et al., 1995). En un apartado anterior de esta tesis, utilizando carbohidratos derivados de *p*-NF, se ha demostrado que las dos glicosidasas de la familia GH13 anotadas como trehalosa-6-P-

hidrolasas [Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4)] son capaces de hidrolizar *p*-NF- α -D-glucopiranosido, aunque la hidrólisis obtenida con la proteína Lp_3220 (Agl4) fue muy superior a la producida por Lp_0263 (TreA).

El derivado *p*-NF- α -D-glucopiranosido es el compuesto utilizado como modelo para la identificación de enzimas con actividad α -glucosidasa. Estas enzimas, en comparación con otras glucosidasas, han sido poco estudiadas en el género *Lactobacillus* (Gänzle y Follador, 2012). Sin embargo, se han identificado actividades α -glucosidasa en células enteras y extractos libres de células de *Lactobacillus acidophilus* (Li y Chan, 1983), y se ha purificado y caracterizado una α -glucosidasa de una cepa de *Lactobacillus brevis* aislada de cerveza (De Cort et al., 1994). Posteriormente, se han caracterizado a nivel bioquímico y genético otras α -glucosidasas de *Lactobacillus johnsonii* (Kang et al., 2009) y *L. acidophilus* (Møller et al., 2012). Más recientemente, también se ha caracterizado bioquímicamente la α -1,6-glucosidasa MalL de la cepa *L. plantarum* LL441 (Delgado et al., 2017) que, sin embargo, se encuentra ausente en la cepa *L. plantarum* WCFS1. Esta α -1,6-glucosidasa MalL de *L. plantarum* LL441 presenta un 38,17% de identidad de secuencia con la α -glucosidasa Lp_3220 de *L. plantarum* WCFS1.

Las dos proteínas de *L. plantarum* WCFS1 hiperproducidas de forma recombinante en esta tesis y anotadas como trehalosa-6-P-hidrolasas, Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4), presentan un 38% de identidad entre ellas y poseen un tamaño similar, 547 y 555 aminoácidos las proteínas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4), respectivamente (**Tabla 11**). Aunque ambas proteínas pertenecen a la familia GH13, sin embargo, la glicosidasa Lp_0263 (TreA) está clasificada en la subfamilia GH13_29 mientras que Lp_3220 (Agl4) se incluye en la subfamilia GH13_31. Ambas proteínas presentan los siete dominios típicos de la familia GH13, la estructura catalítica de barril TIM (β/α)₈ (dominio A), un dominio B, además de una región C-terminal (dominio C) (**Figura 19**). La tríada catalítica de las proteínas incluidas en las subfamilias GH13_29 y GH13_31, en este caso consiste en Asp-196, Glu-249 y Asp-324 para la proteína Lp_0263 (TreA), y Asp-201, Glu-258 y Asp-332 para Lp_3220 (Agl4) (**Figura 19**). En estas dos subfamilias generalmente también están

conservados los residuos Asp-57, Tyr-60, His-100, Arg-194, His-322, y Arg-409 en Lp_0263 (TreA), y Asp-60, Tyr-63, His-103, Arg-199, His-331, y Arg-418 en Lp_3220 (Agl4) (Auiewiriyankul et al., 2018) como se observa en la **Figura 19**.

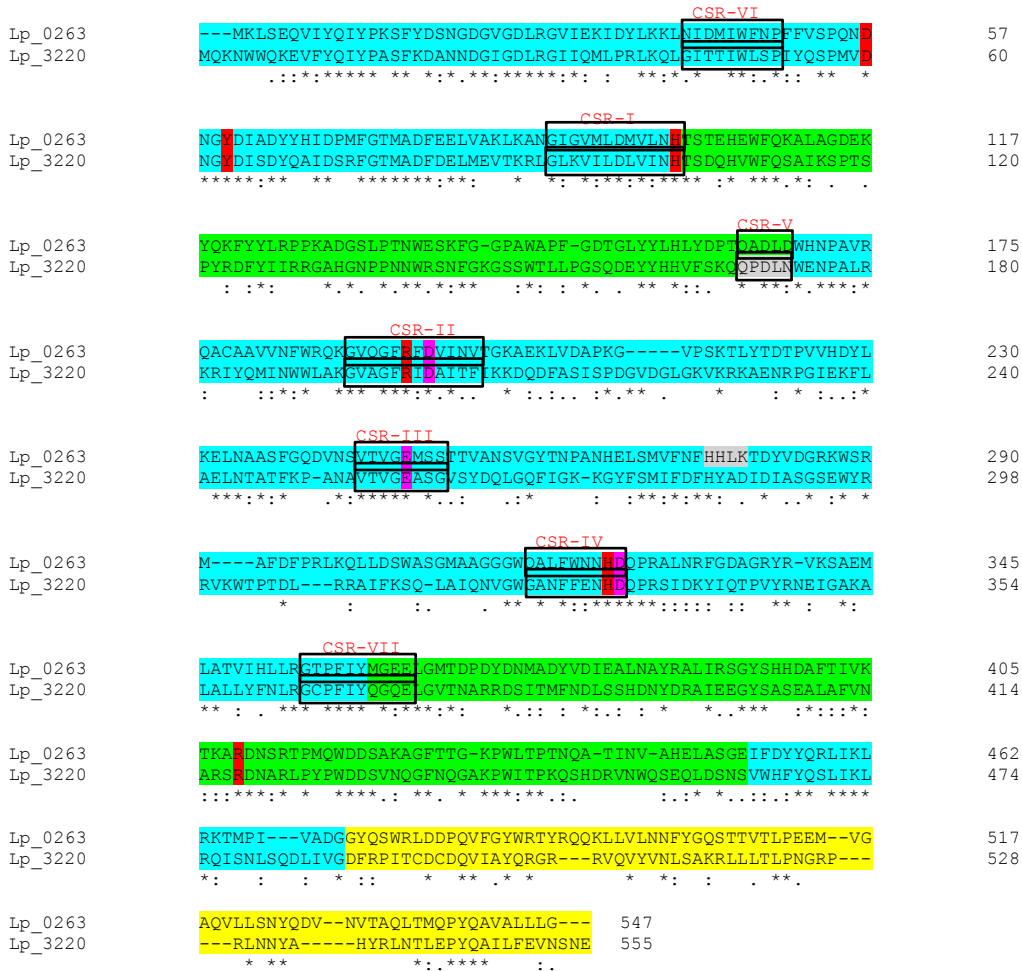


Figura 19. Comparación de las glicosidasas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) de la familia GH13 de *L. plantarum* WCFS1. El alineamiento se realizó utilizando el programa *Clustal Omega*. (*) identidad entre aminoácidos, (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo. Los guiones representan espacios introducidos para maximizar similitudes. Los tres dominios típicos de la familia GH13 se encuentran sombreados en azul (dominio A), en verde (dominio B) y en amarillo (dominio C). Las 7 regiones conservadas (CSR) en las subfamilias GH13_29 y 31 también se encuentran señaladas (Majzlová et al., 2013) Los residuos de la triada catalítica de las subfamilias GH13_29 y 31 [Asp-196, Glu-249 y Asp-324 para la proteína Lp_0263 (TreA), y Asp-201, Glu-258 y Asp-332 para Lp_3220 (Agl4)] se encuentran señalados en rosa. Los residuos conservados en α -glucosidasas de la familia GH13 se encuentran señalados en rojo (Auiewiriyankul et al., 2018). El motivo conservado QPDLN (CSR-V) (Delgado et al., 2017) y el dominio de unión a fosfato HHLK (Lin et al., 2016) en el dominio A se encuentran señalados en gris.

Dentro de la subfamilia GH13_29, en la trehalosa-6-P-hidrolasa *B/TreA* de *Bacillus licheniformis* se ha descrito el dominio típico de unión a fosfato HHLK presente en todos los miembros de esta subfamilia (Majzlovà et al., 2013; Lin et al., 2016). La glicosil hidrolasa Lp_0263 (TreA) de *L. plantarum* WCFS1 presenta este dominio HHLK de unión a fosfato (**Figura 19**), por lo que se confirma su pertenencia a la subfamilia GH13_29. Por otro lado, dentro de la subfamilia GH13_31, en la oligo- α -1,6-glucosidasa Mall de *L. plantarum* LL441 se ha descrito el motivo QPDLN en el dominio CSR-V que caracteriza a esta familia (Delgado et al., 2017). La proteína Lp_3220 (Agl4) de *L. plantarum* WCFS1 también presenta este motivo característico (**Figura 19**), lo que corrobora su correcta inclusión en la subfamilia GH13_31.

Como se ha comentado anteriormente, y con objeto de caracterizar bioquímicamente las dos proteínas anotadas como trehalosa-6-P-hidrolasa y pertenecientes a dos subfamilias distintas de la familia GH13, Lp_0263 (TreA) (subfamilia GH13_29) y Lp_3220 (Agl4) (subfamilia GH13_31), se clonaron los genes *treA* (*lp_0263*) y *agl4* (*lp_3220*) de *L. plantarum* WCFS1 utilizando las parejas de oligonucleótidos y los vectores de clonaje que se muestran en la **Tabla 11**. Mientras que Lp_0263, clonada en pURI2-Cter, se hiperprodujo en *E. coli* DH5 α F', Lp_3220, clonada en pURI3-Cter, se hiperprodujo en *E. coli* BL21 (DE3). Posteriormente, ambas proteínas se hiperprodujeron en *E. coli* BL21 (DE3), se purificaron mediante columnas de afinidad, y se dializaron tal y como se describe en los **apartados 3.6.1 y 5.1 de Materiales y Métodos**. Se obtuvieron 15,8 mg de proteína por litro de cultivo de la proteína Lp_0263 (TreA) y 14,7 mg de proteína por litro de cultivo de la proteína Lp_3220 (Agl4) (**Tabla 11**).

La pureza de estas proteínas se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 20**), en donde se puede observar que en las fracciones eluidas de las columnas de afinidad con imidazol, aparecen las proteínas recombinantes Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4), con tamaños de 62,0 kDa y 63,9 kDa, respectivamente, coincidiendo ambas con sus correspondientes masas moleculares teóricas esperadas (**Tabla 11**).

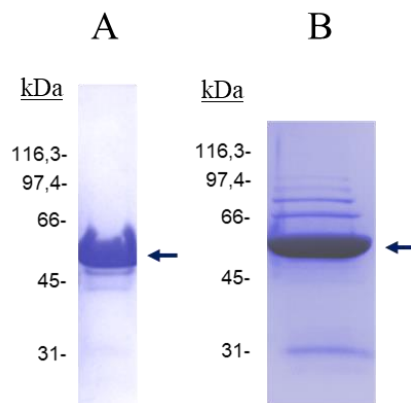


Figura 20. Hiperproducción y purificación de las glicosidasas Lp_0263 (TreA) (A) y Lp_3220 (Agl4) (B) de la familia GH13 de *L. plantarum* WFCS1. Las flechas indican las fracciones eluídas de las columnas de afinidad con imidazol 150mM y dializadas con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0. Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

Anteriormente se ha comentado que las glicosil hidrolasas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) se encuentran anotadas como trehalosa-6-P-hidrolasa, y aunque están relacionadas en su estructura (**Figura 19**) sin embargo, pertenecen a dos subfamilias distintas, lo que puede indicar una diferente especificidad de sustrato. Por ello se realizaron ensayos de actividad frente a carbohidratos derivados de *p*-NF, tal y como se muestra en el **apartado 1.2.** de este mismo capítulo. Debido a que ambas glicosidasas presentaron actividad α -D-glucosidasa (EC 3.2.1.20), se determinaron sus características fisicoquímicas más relevantes utilizando *p*-NF- α -D-glucopiranosido (**Figura 21**) como sustrato.

Ambas α -glucosidasas mostraron un comportamiento similar respecto a su temperatura óptima. Las proteínas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) presentaron su actividad máxima a 37 °C (**Figura 21A**). Por otro lado, la α -1,6-glucosidasa MalL de *L. plantarum* LL441 presentó una temperatura óptima de 30 °C (Delgado et al., 2017), mientras que a esa temperatura las proteínas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) mostraron un 70% de su actividad máxima. El pH óptimo para la actividad de las proteínas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) difirió ligeramente, puesto que el pH óptimo de la proteína Lp_0263 (TreA) fue de 6,0, mientras que la proteína Lp_3220 (Agl4) resultó tener sólo un

80% de actividad relativa a ese pH y un 100% de actividad a pH 5,0. (**Figura 21B**). De manera similar a las proteínas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4), la α -1,6-glucosidasa Mall de la cepa *L. plantarum* LL441, mostró un pH óptimo entre 5,0 y 6,0 (Delgado et al., 2017).

En relación con su termoestabilidad, ambas enzimas resultaron ser termolábiles a una temperatura superior a 45 °C. Sin embargo, la proteína Lp_0263 (TreA) es más termoestable que la proteína Lp_3220 (Agl4) tras 24 h de incubación a 30 y 37 °C, ya que mantuvo un 80% de su actividad máxima. Tras 24 h de incubación a 22 °C, la proteína Lp_3220 (Agl4) conservó el 80% de su máxima actividad. Estos resultados son similares a los que presentó la α -glucosidasa BLAG de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM1217 en incubaciones inferiores a 1 h a 55 °C (Kim, N.R et al., 2017).

El efecto de algunos iones metálicos y aditivos sobre la actividad enzimática de las proteínas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) de *L. plantarum* WCFS1 se muestra en la **Figura 21E**. El detergente SDS y el ión metálico Hg^{2+} inhibieron significativamente la actividad enzimática en ambas proteínas. Además, la actividad de proteína Lp_0263 (TreA) también se vio fuertemente inhibida por la presencia de los iones metálicos Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} , coincidiendo con los resultados que se obtuvieron en la α -glucosidasa BLAG de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM1217 para el caso del ion metálico Fe^{2+} (Kim, N.R et al., 2017). Por el contrario, la actividad de la proteína Lp_3220 (Agl4) aumentó ligeramente en presencia de ion Fe^{2+} . Estos efectos pueden deberse a que diferencias sutiles en las propiedades de los cationes pueden afectar a las interacciones y solubilidad de las proteínas (Matsarskaia et al., 2018). Por otro lado, el aditivo que sí ejerció un claro efecto potenciador de la actividad de ambas enzimas fue el inhibidor de proteasas PMSF, coincidiendo con que no se encuentran residuos de serina en la triada catalítica del centro activo de estas enzimas (Auiewiriyankul et al., 2018). Cabe destacar que el aditivo que ejerció un mayor efecto potenciador de la actividad de la proteína Lp_3220 (Agl4) fue el Tween 20. Este efecto potenciador se puede deber a cambios conformacionales, por secuestro de iones inhibitorios o a un efecto tensioactivo sobre la proteína (Otzen, 2011).

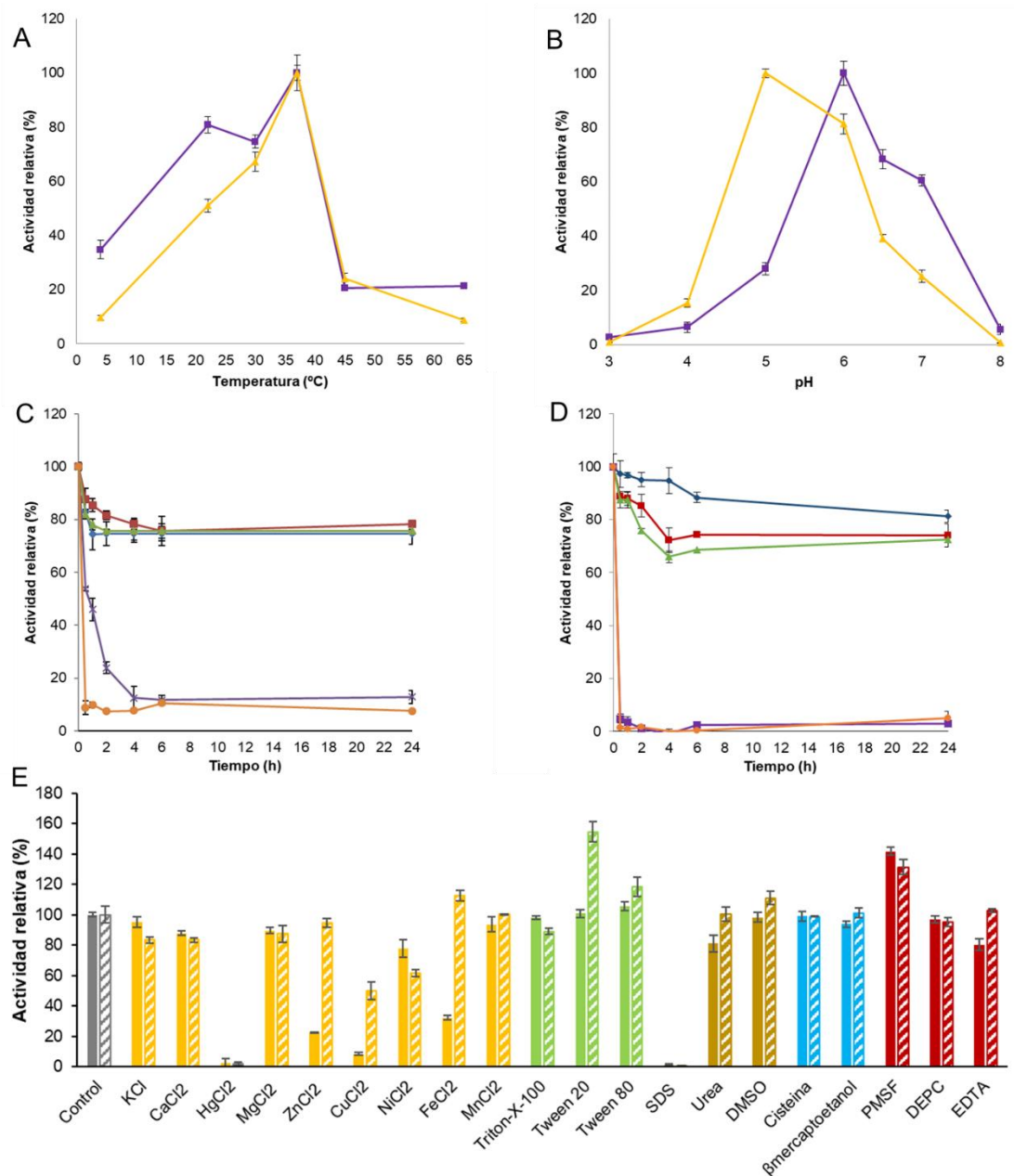


Figura 21. Caracterización de las α -glucosidasas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4) de la familia GH13 de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática; Lp_0263 (cuadrado morado); Lp_3220 (triángulo amarillo). Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0. Lp_0179 (C) y Lp_2757 (D). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática: iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (E). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C, D y E el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo se consideraron respectivamente como el 100% de actividad.

En este caso no se pudieron calcular parámetros cinéticos de ninguna de las dos glicosidasas de la familia GH13 de *L. plantarum* WCFS1 de este estudio ya que en las condiciones de ensayo no se alcanzaron concentraciones saturantes de sustrato. Entre las posibles causas, es posible que la enzima presente una baja afinidad por el sustrato *p*-NF- α -D-glucopiranosido o bien que la velocidad de hidrólisis de este sustrato sea muy baja.

Los ensayos de actividad frente a carbohidratos derivados de *p*-NF demostraron que ambas glicosidasas Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4), tal y como se muestra en el **apartado 1.2.** de este mismo capítulo, hidrolizaron *p*-NF- α -D-glucopiranosido. Este sustrato fue hidrolizado más eficazmente por Lp_3220 (Agl4) que a su vez hidrolizó parcialmente *p*-NF- α -L-arabinopiranosido y *p*-NF- β -D-galactopiranosido, lo que parece demostrar que las diferencias observadas en las estructuras de ambas proteínas pueden estar relacionadas con diferencias en su especificidad de sustrato. Para profundizar en el conocimiento de estas diferencias en cuanto a especificidad de sustrato se realizaron ensayos de su actividad hidrolítica sobre 17 carbohidratos naturales (**Tabla 7**). Los resultados obtenidos indicaron que la proteína Lp_0263 (TreA), que previamente sólo había hidrolizado *p*-NF- α -D-glucopiranosido, en esta ocasión únicamente hidrolizó de forma eficaz trehalosa (α -D-Glu-1,1- α -D-Glu) y sacarosa (α -D-Glu-1,2- β -D-Fruc) (**Figura 22**). Estos resultados sugieren que la proteína Lp_0263 (TreA) es capaz de hidrolizar específicamente enlaces (α , α -1,1) entre residuos de glucosa y enlaces (α , β -1,2) entre residuos de glucosa y fructosa. La capacidad para hidrolizar trehalosa, además de trehalosa-6-P, convierten a la glicosidasa Lp_0263 (TreA) en una trehalosa-6-P hidrolasa convencional, y que aparte de sacarosa no fue capaz de hidrolizar ninguno de los carbohidratos naturales ensayados.

1.2.3. Familia 32 (GH32): Lp_0187

Según la base de datos CAZy la familia GH32 incluye glicosidasas que catalizan diferentes reacciones enzimáticas, como sacarosas o β -fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26), endo-inulinasas (EC 3.2.1.7), β -2,6-fructano 6-levanbiohidrolasa (EC 3.2.1.64), endo-levanasa (EC 3.2.1.65), exo-inulinasas (EC 3.2.1.80), fructano β -(2,1)-fructosidasas/1-exohidrolasa (EC 3.2.1.153) y fructano β -(2,6)-fructosidasas/6-exohidrolasa (EC 3.2.1.154).

La glicosil hidrolasa Lp_0187 (SacA) de *L. plantarum* WCFS1 que pertenece a la familia GH32, se encuentra anotada como sacarosa-6-P-hidrolasa/ β -fructofuranosidasas y posee una estructura similar a la proteína CscA de *B. longum*, cuya estructura cristalográfica se ha resuelto (Bujacz et al., 2011). La estructura tridimensional de las glicosil hidrolasas de la familia GH32 se caracteriza por poseer un dominio N-terminal β y un dominio C-terminal, formado por dos láminas antiparalelas de seis cadenas β . El dominio N-terminal β consiste en una repetición quíntuple de hojas (I-V), cada una de las cuales contiene cuatro filamentos β antiparalelos (A-D) alrededor de una cavidad central. El sitio catalítico está localizado dentro del dominio N-terminal β y se caracteriza por la existencia de tres residuos ácidos altamente conservados en los motivos WMNDPNG, EC y RDP (Pons et al., 1998; Pons et al., 2004). Estos residuos se encuentran presentes en la proteína Lp_0187 (SacA) [Asp-47, Glu-222 y Asp-168 (Mendoza-Llerenas et al., 2016)] como se muestra en la **Figura 23**. Se ha descrito que el dominio N-terminal determina la especificidad de sustrato de la proteína. El papel del dominio C-terminal aún no está claro, pero es esencial para la estabilidad general de la proteína y no se puede excluir su papel en el reconocimiento del sustrato (Cimini et al., 2016). La familia GH32 presenta un mecanismo de acción de retención que implica un desplazamiento doble a través de un intermediario covalente donde el residuo Glu-222 actúa como nucleófilo y el residuo Asp-168 como un ácido o una base (Mendoza-Llerenas et al., 2016).

La glicosidasa Lp_0187 (SacA) de *L. plantarum* WCFS1 (SacA) posee 501 aminoácidos, un tamaño similar a la proteína CscA de *B. longum* (518 aminoácidos), existiendo un 23% de identidad entre ellas. Ambas proteínas

(Figura 23). Puesto que no se había realizado una caracterización de su especificidad de sustrato, ni con carbohidratos derivados de *p*-NF ni con carbohidratos naturales, y con objeto también de confirmar las características bioquímicas y parámetros cinéticos descritos, se decidió producir la proteína Lp_0187 (SacA) de *L. plantarum* WCFS1 de forma recombinante y realizar una caracterización bioquímica más completa, de forma similar a la realizada en otras proteínas incluidas en este estudio.

En esta tesis se ha clonado el gen *sacA* (*lp_0187*) que codifica la glicosil hidrolasa SacA (Lp_0187) de *L. plantarum* WCFS1 utilizando las parejas de oligonucleótidos y el vector de clonaje que se muestran en la **Tabla 11**. La proteína se hiperprodujo en *E. coli* BL21 (DE3), se purificó mediante una columna de afinidad a cobalto, y se dializó tal y como se describe en los **apartados 3.6.1 y 5.1 de Materiales y Métodos**. Finalmente, se obtuvieron 6,7 mg de proteína por litro de cultivo de la proteína Lp_0187 (SacA) (**Tabla 11**).

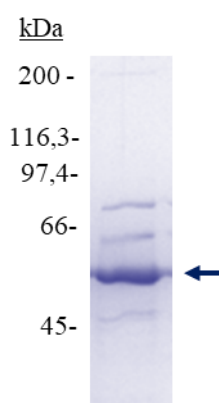


Figura 24. Hiperproducción y purificación de la glicosidasa Lp_0187 (SacA) de la familia GH32 de *L. plantarum* WCFS1. La flecha indica la fracción eluída de la columna de afinidad con imidazol 150mM y dializada con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0. Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

La pureza de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 24**), pudiéndose observar que en la fracción eluída de la columna de afinidad con imidazol, aparece la proteína recombinante Lp_0187 (SacA) con un tamaño

que coincide con la masa molecular teórica esperada, aproximadamente 56,7 kDa (**Tabla 11**).

Con la glicosidasa Lp_0187 (SacA) se realizaron ensayos de actividad frente a carbohidratos derivados de *p*-NF, tal y como se muestra en el **apartado 1.2.** de este mismo capítulo. De los 25 compuestos analizados, la glicosil hidrolasa Lp_0187 (SacA) sólo presentó actividad frente al sustrato *p*-NF- α -D-maltopiranosido, por lo que se determinaron sus características fisicoquímicas más relevantes utilizando este sustrato (**Figura 25**). Lp_0187 (SacA) presentó una temperatura óptima de 37 °C (**Figura 25A**) y un pH óptimo (**Figura 25B**) de 6,0 a 6,5, coincidiendo con los resultados descritos para la proteína SacA de *L. plantarum* ST-III (Chen et al., 2014) así como con los obtenidos por Mendoza-Llerenas et al. (2016) para SacA de *L. plantarum* WCFS1 utilizando 1-kestosa (α -D-Glu-(1-2)-(β -D-Fru)₂) y sacarosa como sustratos respectivamente.

En relación a los ensayos de termoestabilidad (**Figura 25C**), los resultados muestran que la proteína Lp_0187 (SacA) presentó una actividad enzimática residual del 60% tras 4 h de incubación a 22, 30 y 37 °C, siendo más termolábil que la proteína SacA de *L. plantarum* ST-III que mantuvo alrededor de un 90% de actividad residual tras 2 h de incubación a 30 °C (Chen et al., 2014). La presencia de la mutación Val-27 por Ala-27 pudiera ser responsable de la diferencia en la termoestabilidad observada.

Resultados y discusión

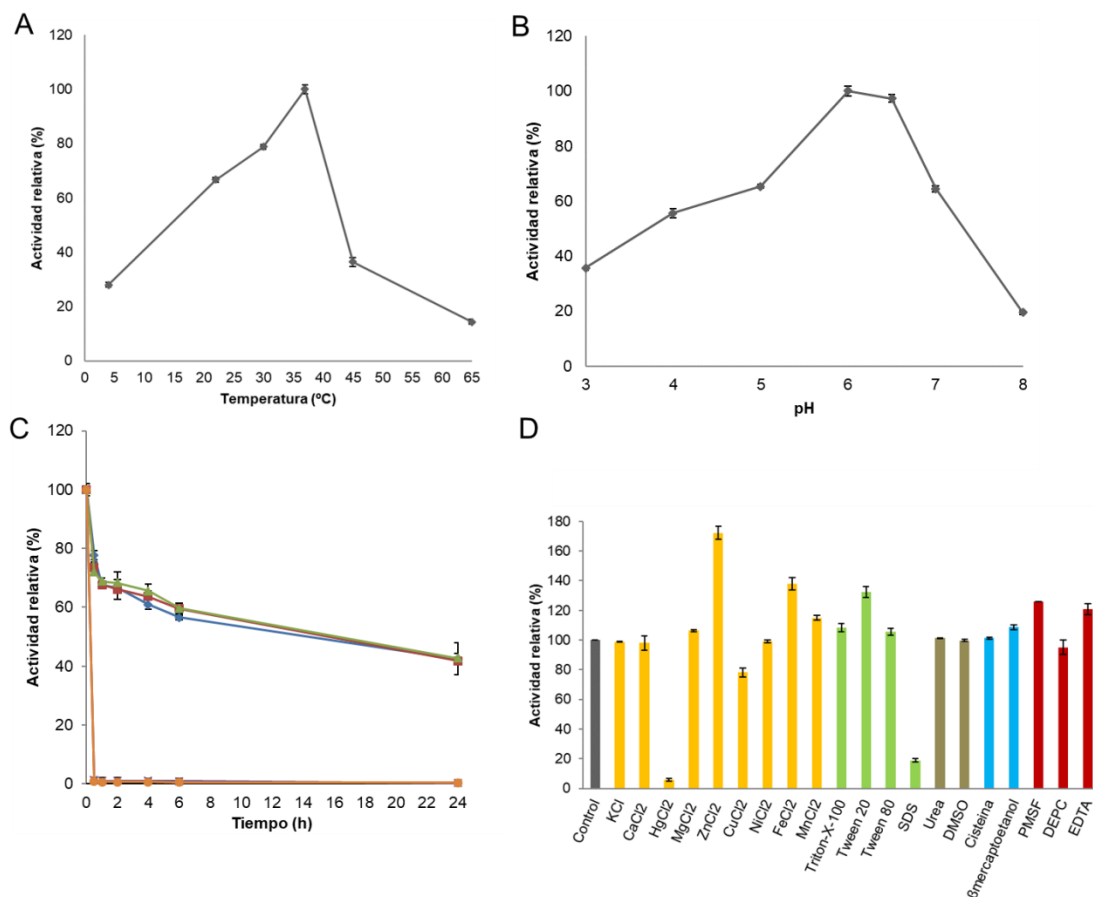


Figura 25. Caracterización de la α -D-maltosidasa recombinante Lp_0187 (SacA) de la familia GH32 de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática. Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 (C). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática: iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (D). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C y D, el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo se consideraron respectivamente como el 100% de actividad.

Por otro lado, la **Figura 25D** muestra el efecto de aditivos, observándose que el ión metálico Hg^{2+} y el detergente SDS ejercieron un efecto inhibitorio muy potente sobre la actividad de la enzima recombinante Lp_0187 (SacA), del mismo modo que en la proteína SacA de *L. plantarum* ST-III (Chen et al., 2014). Sin embargo, los iones metálicos Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} y los aditivos Tween

20, PMSF y EDTA actuaron como activadores aumentando la actividad de la proteína recombinante Lp_0187 (SacA) hasta valores de un 172% de actividad. Estos resultados son novedosos ya que Chen et al. (2014) no encontraron ningún efecto positivo del ión Mn^{2+} sobre la actividad de SacA, mientras que en este estudio se vio aumentada la actividad de la proteína Lp_0187 (SacA) en un 15%. Esta diferencia puede ser debida a que tanto el sustrato utilizado, 1-kestosa, como las condiciones de reacción (tampón fosfato sódico 50 mM, pH 6,0, a 37 °C durante 10 min), así como la detección de la fructosa liberada mediante un kit comercial, son diferentes a las realizadas en este trabajo. El efecto activador de los cationes divalentes mencionado en este trabajo puede ser debido a diferencias sutiles en las propiedades de los mismos que pueden afectar a las interacciones y a la solubilidad de las proteínas (Matsarskaia et al., 2018). Por otro lado, el efecto potenciador de detergentes e inhibidores puede estar producido por cambios conformacionales, por secuestro de iones inhibitorios o debido a un efecto tensioactivo sobre la proteína (Otzen, 2011).

En esta tesis, los parámetros cinéticos de la proteína Lp_0187 (SacA) se analizaron utilizando *p*-NF- α -D-maltopiranosido como sustrato a diferentes concentraciones (**apartado 5.4. de Materiales y Métodos**). Sin embargo, los parámetros cinéticos descritos por Mendoza-Llerenas et al. (2016) y los de la proteína SacA de la cepa *L. plantarum* ST-III (Chen et al., 2014) se calcularon utilizando sacarosa como sustrato.

Tabla 16. Parámetros cinéticos de la glicosil hidrolasa Lp_0187 (SacA) en varias cepas de *L. plantarum* obtenidos en esta tesis y en estudios previos.

	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	$E_{cat}(k_{cat}/K_M)$ (min ⁻¹ mM ⁻¹)
SacA <i>wcfs1</i> *	1,2±0,0002	0,3±0,06	65,6±0,0002	200±39
SacA <i>wcfs1</i> **	493	66	-	432
SacA <i>st-III</i> **	115,2±0,25	25,6±2,6	-	510±0,89

Sustrato utilizado: * *p*-NF- α -D-maltopiranosido, **sacarosa.

Los parámetros cinéticos de la proteína Lp_0187 (SacA) que se muestran en la **Tabla 16** se han obtenido utilizando diferentes sustratos, *p*-NF-

α -D-maltopiranosido [Lp_0187 (SacA) recombinante en este estudio] y sacarosa [en el estudio de Mendoza-Llerenas et al. (2016) y en el estudio de Chen et al. (2014)]. A pesar de que las proteínas SacA de *L. plantarum* ST-III (Chen et al., 2014) y de *L. plantarum* WCFS1 en el estudio de Mendoza-Llerenas et al. (2016) mostraron un valor de V_{max} superior al que se obtuvo en esta tesis para la proteína Lp_0187 (SacA) frente al derivado de *p*-NF, el valor de K_M obtenido en este trabajo para la proteína Lp_0187 (SacA) fue muy inferior al valor de K_M para las proteínas SacA tanto de *L. plantarum* ST-III (Chen et al., 2014) como para *L. plantarum* WCFS1 (Mendoza-Llerenas et al., 2016). De los valores obtenidos se observa que la eficiencia catalítica obtenida frente a los sustratos empleados en ambos estudios fue notablemente más alta que la obtenida frente al derivado de *p*-NF empleado en esta tesis.

En este trabajo se han realizado por primera vez ensayos de actividad de la glicosidasa Lp_0187 (SacA) frente a carbohidratos derivados de *p*-NF, tal y como se muestra en el **apartado 1.2.** de este mismo capítulo. De los 25 compuestos analizados, la glicosil hidrolasa Lp_0187 (SacA) sólo presentó actividad frente al sustrato *p*-NF- α -D-maltopiranosido, lo que parece indicar que es capaz de hidrolizar sólo enlaces glucosídicos α -1,4 (**Figura 7**). Para comprobar esta especificidad de hidrólisis, se ensayó su capacidad para hidrolizar 17 carbohidratos naturales los cuales presentan diferentes enlaces glucosídicos. De todos los compuestos analizados, Lp_0187 (SacA) sólo fue capaz de hidrolizar sacarosa (α -D-Glu-1,2- β -D-Fruc) y rafinosa (β -D-Gal-1,6- β -D-Glu-1,2- β -Fruc). Estos resultados sugieren que la proteína Lp_0187 (SacA) es capaz de hidrolizar de forma específica enlaces (α , β -1,2) y (β , β -1,2) entre residuos de glucosa y fructosa, pero no enlaces (α , α -1,4) entre residuos de glucosa. Estos resultados coinciden con los resultados descritos previamente en el trabajo de Mendoza-Llerenas et al. (2016) y los obtenidos con la proteína SacA de *L. plantarum* ST-III (Chen et al., 2014), en los que se demostró, mediante TLC, que SacA era capaz de hidrolizar sacarosa y, mediante un kit comercial de detección de fructosa, que SacA es capaz de hidrolizar 1-kestosa. Además, se ha descrito que la proteína Lp_0187 (SacA) desempeña un papel relevante en la utilización de fructooligosacáridos (FOS) por *L. plantarum* (Saulnier et al., 2007).

Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido verificar bioquímicamente la actividad de la glicosidasa Lp_0187 (SacA) de *L. plantarum* WCFS1 y confirmar su anotación como sacarasa o β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26), actividad incluida en la familia GH42 de glicosil hidrolasas.

1.2.4. Familia 36 (GH36): Lp_3485

Hasta el momento, según la base de datos CAZy, la familia GH36 incluye enzimas que presentan sólo actividad α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) o α -N-acetil-galactosaminidasa (EC 3.2.1.49).

La estructura tridimensional de las glicosil hidrolasas de la familia GH36 se caracteriza por poseer un largo dominio N-terminal formado por láminas β , un dominio A catalítico con estructura en forma de barril TIM (β/α)₈, y un dominio C-terminal formado por láminas β antiparalelas. Los residuos catalíticos Asp-482 y Asp-552, de la α -galactosidasa LaMel36A de *L. acidophilus* NCFM perteneciente a la familia GH36 y cristalizada por Fredslund et al. (2011), se encuentran localizados dentro del dominio A. Al igual que las glicosil hidrolasas de la familia GH1, la familia GH36 presenta un mecanismo de acción de retención. El mecanismo de retención implica un desplazamiento doble a través de un intermediario covalente donde el residuo Asp-482 actúa como nucleófilo y el residuo Asp-552 como un ácido o una base (Fredslund et al., 2011).

La comparación de la α -galactosidasa LaMel36A de *L. acidophilus* NCFM (732 aminoácidos) de la familia GH36, con la proteína Lp_3485 (Mela) de *L. plantarum* WCFS1 (738 aminoácidos) ha permitido conocer que ambas proteínas poseen un 53,6 % de identidad. Las dos proteínas presentan los dominios típicos de la familia GH36, el dominio N-terminal, el dominio A catalítico y el dominio C-terminal (**Figura 26**). Además, también están presentes en ambas proteínas, los motivos conservados DDGW, típico de la familia GH36, y el motivo CSGGGGR típico del subgrupo I de la familia GH36 (Fredslund et al., 2011) (**Figura 26**).

La glicosidasa Lp_3485 (MelA), se encuentra anotada en las bases de datos como una α -galactosidasa. Con objeto de confirmar la actividad bioquímica de la proteína Lp_3485 (MelA) se clonó el gen que la codifica, *melA* (*lp_3485*), utilizando para ello la pareja de oligonucleótidos y el vector de clonaje que se muestran en la **Tabla 11**. Esta proteína se hiperprodujo en *E. coli* BL21 (DE3), se purificó mediante una columna de afinidad, y se dializó según se describe en los **apartados 3.6.1 y 5.1 de Materiales y Métodos**. Se obtuvieron 13,5 mg de proteína por litro de cultivo de la proteína Lp_3485 (MelA) (**Tabla 11**).

La pureza de Lp_3485 (MelA) se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 27**), pudiéndose observar que en la fracción eluída de la columna de afinidad con imidazol, aparece la proteína recombinante Lp_3485 (MelA) con un tamaño de aproximadamente 83,6 kDa, lo que coincide con su masa molecular teórica esperada (**Tabla 11**).

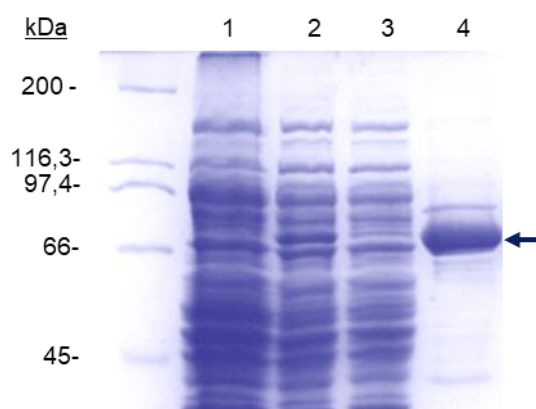


Figura 27. Hiperproducción y purificación de la glicosidasa Lp_3485 (MelA) de la familia GH36 de *L. plantarum* WFCS1. Se muestra el extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) inducidas con IPTG (1), extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-*lp_3485*) (2), fracción eluída no retenida en la resina de afinidad (3), y fracción eluída de la columna de afinidad con imidazol (150mM) y dializada con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0 (4). Gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

Se ha descrito que el genoma de la mayoría de lactobacilos posee genes que codifican α -galactosidasas (Gänzle y Follador, 2012), habiéndose caracterizado algunas de ellas, incluyendo alguna de *Lactobacillus plantarum* (Mital et al., 1973; Tamura y Matsushita, 1992; Garro et al., 1993). El gen *mela* de *L. plantarum* ATCC 8014 se expresó previamente en *E. coli* y se demostró la actividad α -galactosidasa de la proteína MelA hiperproducida (Silvestroni et al., 2002). Sin embargo, en este estudio previo la α -galactosidasa MelA de *L. plantarum* ATCC 8014 no se caracterizó bioquímicamente. *L. plantarum* WCFS1 posee una proteína MelA cuya secuencia de aminoácidos es un 99,9% idéntica a la proteína MelA de *L. plantarum* ATCC 8014. Ambas proteínas poseen 738 aminoácidos y son idénticas excepto en el residuo 672 donde apareció un cambio conservativo de Leu a Phe (Delgado-Fernández et al., 2019). Posteriormente, durante la elaboración de esta tesis, se ha descrito otro trabajo en el que la proteína MelA de *L. plantarum* WCFS1 se ha clonado, hiperproducido y caracterizado como α -galactosidasa (Panwar et al., 2020).

En esta tesis, la proteína Lp_3485 (MelA) se caracterizó fisicoquímicamente (**apartado 5.4 de Materiales y Métodos**) utilizando *p*-NF- α -D-galactopiranosido como sustrato puesto que, de los 25 carbohidratos derivados de *p*-NF ensayados, fue el único sustrato para el que presentó actividad (**Figura 7**) (**apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos**). La actividad presentada en este sustrato confirma la clasificación de Lp_3485 (MelA) como α -galactosidasa. En relación con la temperatura, la proteína MelA es activa a bajas temperaturas debido a que su actividad máxima se observó entre 4 y 22 °C (**Figura 28A**). Sin embargo, la proteína MelA estudiada por Panwar et al (2020) mostró su temperatura óptima a 37 °C, aunque sólo se estudió su actividad en un intervalo de temperatura de 30 a 45 °C, no a temperaturas más bajas. En nuestro estudio, cuando la temperatura de incubación se aumentó, la actividad de la proteína MelA disminuyó. A 30 y 37 °C, MelA presentó sólo el 75 y el 40% de su actividad máxima, respectivamente. Hasta la fecha nuestro estudio representa la primera descripción de una α -galactosidasa de bacterias lácticas que presenta su máxima actividad a temperaturas bajas. De hecho, *L. fermentum* posee una enzima MelA termoestable que mostró una temperatura óptima a 50 °C (Carrera-Silva et al., 2006). La secuencia de la proteína MelA

de *L. plantarum* es un 36,3% idéntica a la proteína MelA de *L. fermentum*; esta variabilidad de la secuencia de aminoácidos podría explicar el diferente comportamiento de ambas proteínas respecto a la temperatura. Otras bacterias lácticas poseen α -galactosidasas, por ejemplo *L. reuteri* (Wang et al., 2014) y *L. curvatus* (Yoon y Hwang, 2008) que presentaron temperaturas óptimas entre 30 y 37 °C.

La influencia del pH en la actividad de la proteína MelA de *L. plantarum* WCFS1 se estudió en condiciones estándar a 30 °C (**Figura 28B**). La enzima mostró su actividad máxima en el intervalo de pH de 4,0 a 6,5 que coincide con el pH óptimo descrito por Panwar et al. (2020) para esta misma proteína. Además, este pH coincide con el óptimo mostrado por otras α -galactosidasas de bacterias lácticas, cuyos pHs varían de un pH ácido a un pH cercano a la neutralidad. Por ejemplo, y de forma similar a la proteína MelA, la enzima α -galactosidasa de *Lactobacillus curvatus* mostró un pH óptimo en 6,5 (Yoon y Hwang, 2008). Sin embargo, el pH óptimo de las α -galactosidasas de *L. reuteri* y *L. fermentum* fueron más ácidos, estando alrededor de 4,8 (Carrera-Silva et al., 2006; Wang et al., 2014).

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la proteína MelA es una enzima termolábil debido a que cuando se preincubó a diferentes temperaturas, sólo a 22 °C se mantuvo su actividad relativa alrededor del 50% a lo largo de las 24 h de incubación (**Figura 28C**). Entre otras α -galactosidasas de bacterias lácticas, la α -galactosidasa de *L. curvatus* mantuvo una actividad relativa por encima del 65% después de su preincubación a 40 °C durante 3 h (Yoon y Hwang, 2008).

El efecto de varios iones metálicos, surfactantes, reductores e inhibidores sobre la actividad de la proteína MelA de *L. plantarum* WCFS1 se muestra en la **Figura 28D**. La actividad enzimática se incrementó en un 145% y 139% en presencia de los iones metálicos Mn^{2+} y Fe^{2+} , respectivamente. De manera similar a los resultados obtenidos en esta tesis, la presencia de estos dos iones metálicos también aumentó la actividad de la enzima α -galactosidasa de *L. reuteri* (Wang et al., 2014). Además, de estos iones metálicos, los inhibidores de proteasas DEPC y EDTA, y los detergentes Tween 20, Triton-X-

100 también aumentaron la actividad de la proteína MeIA alrededor de un 40%. Estos aditivos podrían activar la proteína MeIA debido a cambios en la conformación de la proteína, por un agotamiento de cationes inhibidores, o debido a un efecto surfactante (Otzen, 2011). Por el contrario, los iones metálicos Hg^{2+} y Cu^{2+} inhibieron en gran medida la actividad de la proteína MeIA disminuyendo su actividad a valores de 3 y 9%, respectivamente.

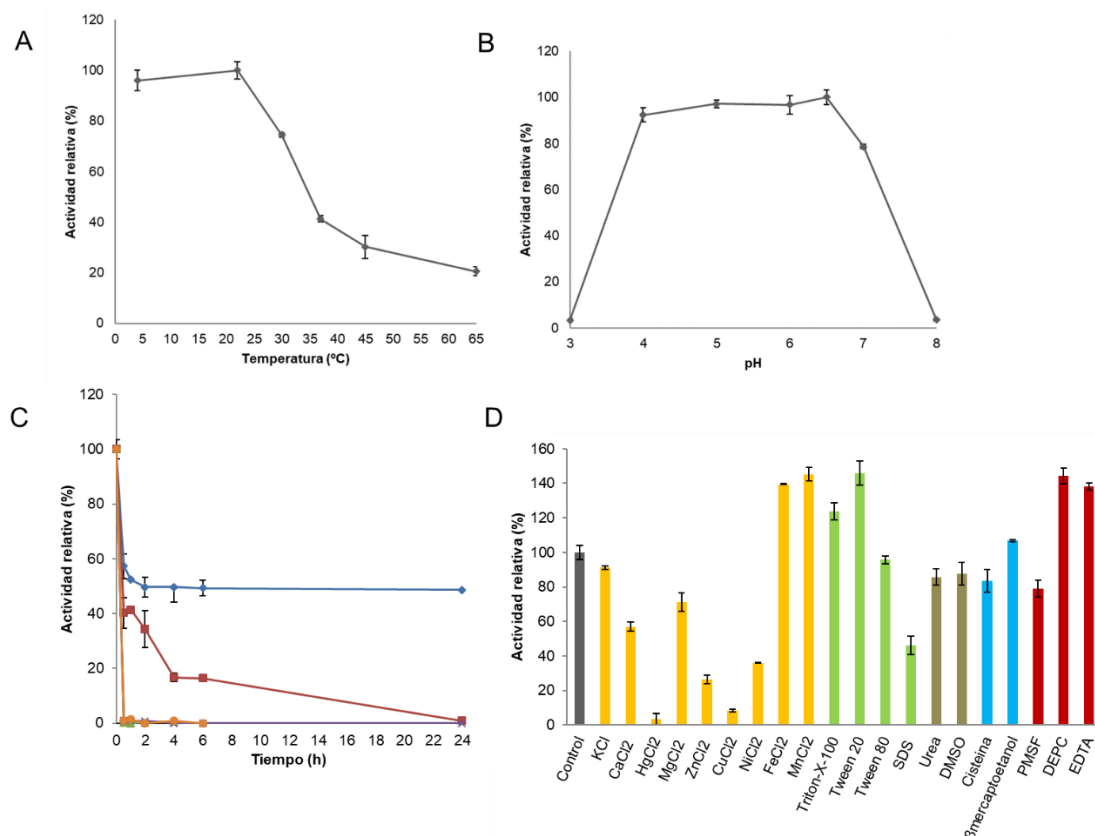


Figura 28. Caracterización de la α -galactosidasa recombinante Lp_3485 (MeIA) de la familia GH36 de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática. Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0 (C). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática: iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (D). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C y D, el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo se consideraron respectivamente como el 100% de actividad.

Los estudios cinéticos en la α -galactosidasa Lp_3485 (MelA) de *L. plantarum* WCFS1 se realizaron utilizando 0,2 μ g de proteína y *p*-NF- α -galactopiranosido como sustrato, en un intervalo de concentración de 0 a 20 mM (**apartado 5.4 de Materiales y Métodos**). Los resultados obtenidos son los que se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de la α -D-galactosidasa Lp_3485 (MelA).

	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	E_{cat} (k_{cat}/K_M) (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Lp_3485 ^a	624±0,0018	0,7±0,07	52.125±0,0018	80.328±8.405
Lp_3485 ^b	3077,4	0,9	-	724,5

^a este estudio; ^b Panwar et al., 2020

En comparación con α -galactosidasas de otras bacterias lácticas, la actividad específica que mostró la proteína MelA de *L. plantarum* WCFS1 fue notablemente mayor que la actividad exhibida por α -galactosidasas de *Carnobacterium piscicola* (2,3 U mg⁻¹) (Coombs y Brenchley, 2001), y *Lactobacillus curvatus* (5,7±0,4 U mg⁻¹) (Yoon y Hwang, 2008). Sin embargo, aunque el valor de K_M de la proteína MelA estudiada por Panwar et al. (2020) fue similar al valor obtenido en esta tesis para la misma proteína, en el estudio de Panwar et al. (2020) MelA resultó tener una actividad específica muy superior. La eficiencia catalítica de la proteína MelA de *L. plantarum* es baja en comparación con la α -galactosidasa de *Bacillus stearothermophilus* que tuvo una E_{cat} de $2,6 \times 10^5$ min⁻¹ mM⁻¹ (Gote et al., 2006), sin embargo, es superior a la E_{cat} calculada por Panwar et al (2020) para MelA de *L. plantarum* WCFS1.

Con objeto de confirmar la actividad α -galactosidasa de MelA obtenida mediante la utilización de 25 carbohidratos derivados de *p*-NF, la actividad hidrolítica de MelA también se ensayó sobre 17 carbohidratos naturales. De todos los sustratos ensayados, que representan un variado número de enlaces glicosídicos diferentes, el único disacárido hidrolizado fue melibiosa (Gal- α -(1,6)-Glu) (datos no mostrados). La melibiosa es el único disacárido de los ensayados que contiene α -D-Gal en su composición. Este resultado confirma la anotación de la proteína MelA de *L. plantarum* WCFS1 como α -galactosidasa

(EC 3.2.1.22) e implicada en la hidrólisis de melibiosa en galactosa y glucosa (Lambert et al., 2007). De los dos trisacáridos ensayados, el único que resultó hidrolizado por la proteína MelA fue la rafinosa (Gal- α -(1,6)-Glu- α -(1,2)- β -Fru). Por lo tanto, esta galactosidasa tiene la capacidad de hidrolizar eficientemente el enlace α (1,6) que une una unidad de galactosa, ubicada en el extremo no reductor, con glucosa, pero no con fructosa, ya que esta proteína es incapaz de hidrolizar 2'-fucosil-lactosa.

1.2.5. Familia 42 (GH42): Lp_3469

En la actualidad, y según la base de datos CAZy, la familia GH42 incluye glicosil hidrolasas que sólo poseen actividades β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) y α -L-arabinopiranosidasa (EC 3.2.1.-).

Según Viborg et al., (2017) la familia GH42 incluye la subfamilia A (GH42_A, actividad α -L-arabinosidasa) y la subfamilia G (GH42_G, actividad β -galactosidasa). De la subfamilia G se ha resuelto la estructura tridimensional de la β -galactosidasa BIGal42A de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 (Viborg et al., 2014). La estructura de esta β -galactosidasa de la familia GH42 se caracteriza por poseer tres dominios, un dominio A catalítico con estructura en forma de barril TIM (β/α)₈, un dominio B formado por siete láminas β y cinco hélices α , y un dominio C antiparalelo formado por láminas β . Los residuos catalíticos de la β -galactosidasa BIGal42A de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04, son los residuos Glu-324 (nucleófilo) y Glu-164 (ácido/base) que se encuentran localizados dentro del dominio A (**Figura 29**). La familia GH42 presenta un mecanismo de acción de retención que implica un desplazamiento doble a través de un intermediario covalente donde el residuo Glu-324 actúa como nucleófilo y el residuo Glu-164 como un ácido o una base (Viborg et al., 2014). En la β -galactosidasa BaBgal42A de *Bacillus* sp. KW1 los residuos catalíticos son Glu-155 y Glu-323 y en la β -galactosidasa Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 estos residuos catalíticos corresponden con Glu-141 y Glu-312.

Resultados y discusión

BlArap42B	-----MAYTDPILFGAAYYDEYIPRDLDRIDTDMEMMTRAGINVIIRIGE	46
BlGal42A	MSASTQHRHRWPPQLPGNDRKIWFADYNPDQWPE--DVQDEDIRLKMQAGVNIIVSLAI	58
BaBgal42A	-----MGKRYP-LVHPNVKGFHLGGDYNPDQWLHMPETIIDDFRLMKLAHCQTF SINI	52
Lp_3469	-----M-SNPLKTEFLHGGDYNPDQWLDQPEVIKQDFKAFKAAKLNTVTVLGI	47
	: . * . * : : : . * . : . * : . :	
BlArap42B	STWSTCEPQPGHFDWTHIDRALDAATNAGINVI VGTPTYAVPTWLVAMYPDVLATTPAGE	106
BlGal42A	FSWANIE TSDGNFEPDWLDRVIDKLYKAGIADLASATASPPMWLTSAPHEVLRRLDEQGH	118
BaBgal42A	FAWSKLEPKGEYDFAWLDDIMDRLLAAQGAHALLATPSGARPAWLSQTYPEVLRVNEANRQ	112
Lp_3469	FAWDKLEPAEGQYDFSWLDQIFDRAEAQGTKIILSTPSGARPRWLAEKYPEVLRVNEHGO	107
	: * . * * . : : : * : * * : : : : * * * : * : * * .	
BlArap42B	P-HYGARQIMNIVNPAYRLYGERVIRSLISHVAAQPCVIGYQVNDTK--YYDSVSHDMQ	163
BlGal42A	VIWPGARQHWRTSPTFRTYALRLCREMAEHYKDNPAIVSWHVGNIEYGCNHYFDYSDDAV	178
BaBgal42A	RNLHGLRHNCFTSPVYREKTNLNLRLAERYKDPALIMWHISNEYGGCHCDL--CO	169
Lp_3469	RNQGFRHNHCYTSVYREKVMINQKLAERYQORPSLLLWHISNEYGGACYCDL--CO	164
	* * : . . * : * : : : : : * : : : : : * * : .	
BlArap42B	VMFIKQLRHEFKNDLEALNEAYGLDYWSNRINAWEDFPDL--TG---SINESLRARFDR	217
BlGal42A	QAFREWCRDRYG-TIDKVNAAWGTNFWSQLNSFEEILPPRYVGGEGNFTNPRLLDFKH	237
BaBgal42A	EAFRDYLDKYNHDLLEALNQAAMWTFWSHTFTDWSQIESPAPHGE--HMIHGMNLDWKR	226
Lp_3469	QAFRHWVQKKYQ-TLNLNHAYCGAFWSHDYTSWDQVQAPSPLDG--TNVMGLNLDWHR	220
	* . : . : : : * * : : * * : : : . : . : . * . : . : .	
BlArap42B	FRRDQVAEYLAWQASIREYMRDQFITHNFDYEWGRHSYGLQPAVDHFRAARALDICGV	277
BlGal42A	FCSDALKEFFCAERDVLSEVTPNIP-LTTFNFMVSAQ-----NTLDYDDWAHEVDFVSN	290
BaBgal42A	FVTAQTINFYQNEIEPLRELTPHVP-VTTFMGDYPHM--RPFLGLDYHQFAKEVDVVISW	283
Lp_3469	FVTDRTIDFDNEIKPLRALTPNIP-VTANFMGGNPSSES-HVFDYLDYQKFAKHVDIVSW	278
	* : : : : : : : * * : : * * : : * : * : * .	
BlArap42B	DIYHPSE---DALTGKEIAFGGDMARSAGGGNYLVLETPAQGOHGLWLPY---PGQL	327
BlGal42A	DHYFT--PGSWHIDELAY---SASLVDSIRKKPWFLEQSTSAVNRREINPRKEPGEI	344
BaBgal42A	DSYPAWHSGRETTAELASNVAFVHDLYRSLKGGQPLVMESTPSLVNHEVNVKHKGMA	343
Lp_3469	DSYPNWSNGYESTAHLAMKTALMNDVMRSLSKH-DNYLIMESTPSQVNVHPYNAKREPMH	337
	* * . : . : . : . : . : . : . : . : . * .	
BlArap42B	RLQAYSHLAGSADGIMYWHHHSIHNSFETIYWRGLLSHD-FESNPTYEEAGRFGREIGDPR	386
BlGal42A	IRDSMLHLAMGADAIICYQWRQSRSGAKFHSAMLP-AGEHSQIYRDVICALGADLDTLS	403
BaBgal42A	HLSAMQAI AHGSDSVLYQWRQGRGASKFKHGAUVDSHSGHEHTRVQEVADLKGQLEQLQ	403
Lp_3469	EMGSLQVVAHGADSVLYQLHQLSGASLMEHGAVIANHRGNSRAFKDVKVQDQLQSLQ	397
	: : * * * . * : : : . . * : : : . . : . : . * : .	
BlArap42B	IGDTLSHLSKRNAVAILASNESLTALSWFHIE TGFPMGGTLTYNDVLRSIYDALFELNVE	446
BlGal42A	DAGILRSKLSKARVAIVQDIQS---EWAETEHTATPT-QHIREWTEPLDWFAAFANRQVT	458
BaBgal42A	PIA--GTS-VQPEVAIYDWEN---HWAIDDAQGLNNTNKRYVEACQTHYRSFWKKGIP	456
Lp_3469	AAH--GTTRTAAKVAIVFDYDN---MWGLDDARNYANETKKYWRTOEHYQVFWKHDI	451
	* * * : . : . * : : : : : : : : : : : : : .	
BlArap42B	VDFLPADASADQLAGYSLVIAPALYTTDQQTIDRLARYVKNGGHLATMRSFVADENVKV	506
BlGal42A	ADVPTI---HAQWDTYDAVVI PCVYLFSEEMAERLRTFVRNGGKAFVTTYALADEHDL	515
BaBgal42A	VDIVGM---EKDFLSYRVLVGPMLYMKPGVAEKIEAFVKEGGIFVATYWSGMVDENDLC	513
Lp_3469	VEI IAT---TDDLTAIDLVIDPMHFMSAQFATKLRAYVQQGGHLIGTYITGVVDHDFLA	508
	. : . : * : : * : . : : : * : * * . * : : * . .	
BlArap42B	WHDKAPHHLVDIFGMTYQFTRPMGVSLKCPDTLADLA----GASANDFIEMLSAP-APE	560
BlGal42A	HTEGWPLIGDVGVRIEEHC-PLGTL--FPGMLDHLVDSNGTVV--HDLADVDAIADD	570
BaBgal42A	FLGGFPGLRHVLGVWAEIN---TL--MPDEHVMLTGNRGTYHVQYCESIH--PES	565
Lp_3469	YQGDGLADLEATYGIKQVETD---TL--YQOQHNAIT-AYHQAYQVNDYCDVVE--TTT	559
	: * : : : . * : : : : : : : : : : : : : .	
BlArap42B	THVLAWYDHY---AWDSYAAITRHAFSGDAQVVGTLQADAWRTVLAELSNAGVHTPG	617
BlGal42A	TTVLATFEADPATGMDGRAAITVHPYHEGGVAYIAGKLGDRDGI SSQLPEICAAALGFELDA	630
BaBgal42A	ASVLGHFENG--CYEGQPALTVRPFPGKAYYMASENEQAFYDDFYEDLITGIGIQPIL	622
Lp_3469	AQVLGTYQKD---FYAGTPAVTVNLQGGAAYYLAARTDITDFLDAFYERLATSALALPAL	616
	: * * : : : * * : * . * : : : . .	
BlArap42B	ME---LAGTVCVRSNTAGDVTYLLNYSGSPI--TFRAPASGTFLLGHPTDDGEQAVT	672
BlGal42A	DPR---AGD-VLRVVR-EQEDGAI FEFLEFNRTNTVTADRPAQDMLICSLAT-----	677
BaBgal42A	SSSI-PEGV-SVQKRT-DGSQDFVFMNFTQQQNI SLDSE--SYENMLTGQ-----	670
Lp_3469	PVIKANAKV-SIQVRE-NATTRYVFINF SHRPTT VTLVPLRQIFENQV-----	664
	: : : : : : : : : : : : : : : : :	
BlArap42B	AETPVTVGDAVTLPRWGVDIIVGRQPTMN	701
BlGal42A	-----DSTDKVTLEPNGVLAFR-----	695
BaBgal42A	-----HTSQLLQLNPYE---YVILKK---	688
Lp_3469	-----VSGKQDLASYGVQVYMMNK-----	683
	*	

Figura 29. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la glicosil hidrolasa Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1, β -galactosidasa B/Gal42A y α -L-arabinosidasa B/Arap42B de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 y β -galactosidasa BaBgal42A de *Bacillus* sp. KW1 de la familia GH42. El alineamiento se realizó utilizando el programa *Clustal Omega*. (*) identidad entre aminoácidos, (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo. Los guiones representan espacios introducidos para maximizar similitudes. Los tres dominios típicos de la familia GH42 se encuentran sombreados en azul oscuro (dominio A), en azul (dominio B) y en amarillo (dominio C) (Viborg et al., 2014). El motivo conservado WHWHSIHNSFETYW de la subfamilia GH42_A grupo G1 y el motivo FQWRQSRGGAEKFH de la subfamilia GH42_G grupo G2, G3 y G4 se encuentran también señalados en gris (Viborg et al., 2017). Los residuos catalíticos de las proteínas B/Gal42A (E-164 y E-324), BaBgal42A (E-155 y E-323), Lp_3469 (LacA) (E-141 y E-312) y B/Arap42B (E-149 y E-306) de la familia GH42 se encuentran señalados en rosa. Los residuos conservados en la familia GH42 se encuentran señalados en rojo (Viborg et al., 2014).

Como ejemplo de la subfamilia A de las GH42 se encuentra la proteína B/Arap42B de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 cuyos residuos catalíticos son Glu-149 y Glu-306 (Viborg et al., 2017).

De las proteínas incluidas en el alineamiento de la **Figura 29**, la proteína Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 muestra un mayor grado de identidad con la β -galactosidasa BaBgal42A de *Bacillus* sp. KW1 (Lin et al., 2019) puesto que ambas presentan un 46,5% de identidad entre sus secuencias. Ambas proteínas poseen los dominios típicos de la familia GH42, el dominio A catalítico, el dominio B y el dominio C (**Figura 29**). En ambas proteínas, además de en B/Gal42B de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04, se encuentra presente el motivo FQWRQSRGGAEKFH del grupo G2, G3, y G4 típico de la subfamilia GH42_G (Viborg et al., 2017) (**Figura 29**). Estos resultados indican que Lp_3469 (LacA) sería una β -galactosidasa de la subfamilia GH42_G de glicosil hidrolasas. Por el contrario, la α -L-arabinosidasa B/Arap42B presenta el motivo conservado WHWHSIHNSFETYW encontrado en el grupo G1 de la subfamilia GH42_A de α -L-arabinosidasas (Viborg et al., 2017).

Tanto en *L. plantarum* como en otras bacterias lácticas se han caracterizado bioquímicamente algunas β -galactosidasas. Las β -galactosidasas más estudiadas han sido LacL y LacM (equivalentes a Lp_3483 y Lp_3484, respectivamente, en *L. plantarum* WCFS1) pertenecientes a la

familia GH2 las cuales se han caracterizado en varias cepas de *L. plantarum*. Iqbal et al., (2010) caracterizaron bioquímicamente ambas β -galactosidasas en la cepa *L. plantarum* WCFS1 utilizando α -NF- β -D-galactopiranosido como sustrato, y, además, determinaron sus parámetros cinéticos utilizando lactosa. Por otro lado, Schwab et al., (2010) caracterizaron bioquímicamente las β -galactosidasas LacL (Lp_3483) y LacM (Lp_3484) (GH2) de la cepa *L. plantarum* FUA3112, utilizando también lactosa como sustrato.

A pesar de que la proteína LacA de la cepa *L. plantarum* FMNP01 se ha utilizado para la construcción de una β -galactosidasa quimera (LacA-2) diseñada para la producción de oligosacáridos funcionales (Liao et al., 2017), la proteína LacA nativa sólo se ha caracterizado cinéticamente. Por ello, en esta tesis se ha producido de forma recombinante la β -galactosidasa Lp_3469 (LacA) de la cepa *L. plantarum* WCFS1, 100% idéntica a LacA de la cepa *L. plantarum* FMNP01, con objeto de llevar a cabo su caracterización bioquímica. El gen *lp_3469* (*lacA*) se clonó utilizando la pareja de oligonucleótidos y el vector de clonaje que se muestran en la **Tabla 11**. La proteína se hiperprodujo en *E. coli* BL21 (DE3), se purificó mediante una columna de afinidad, y se dializó tal y como se describe en los **apartados 3.6.1 y 5.1 de Materiales y Métodos**. La pureza de Lp_3469 (LacA) se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 30**), pudiéndose observar que la proteína recombinante presentó un tamaño que coincide con su masa molecular teórica esperada, 78,1 kDa (**Tabla 11**). Se obtuvieron 7,2 mg de proteína por litro de cultivo de la proteína Lp_3469 (LacA) (**Tabla 11**).

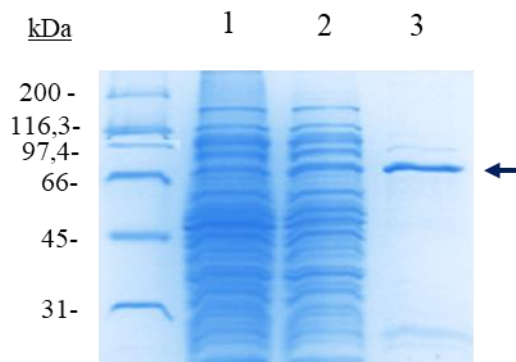


Figura 30. Hiperproducción y purificación de la proteína recombinante Lp_3469 (LacA) de la familia GH42 de *L. plantarum* WCFS1.1, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter) inducidas con IPTG; 2, extracto proteico soluble procedente de células de *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-*lp_3469*); 3, fracción eluída de la columna de afinidad con imidazol (150mM) y dializada con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0. Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

Una vez se dispuso de la proteína Lp_3469 (LacA) en estado puro se confirmó su actividad β -galactosidasa mediante la utilización de p -NF- β -D-galactopiranosido. Simultáneamente se estudió su actividad hidrolítica sobre los 25 carbohidratos derivados de p -NF disponibles. Los resultados revelaron que la enzima Lp_3469 (LacA) es activa frente a los sustratos p -NF- β -D-galactopiranosido (98%), p -NF- β -D-fucopiranosido (97%) y p -NF- α -L-arabinopiranosido (94%). Estos resultados confirman la actividad β -galactosidasa anotada para la proteína Lp_3469 (LacA) pero a la vez confirman una múltiple actividad hidrolítica presente en las proteínas LacA. La β -galactosidasa LacA de *L. acidophilus* FUA3191, 38,2% idéntica a Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1, no presentó actividad frente a los sustratos p -NF- α -L-arabinopiranosido ni p -NF- β -D-fucopiranosido, sin embargo, mostró actividad frente a los sustratos p -NF-manósido, p -NF-glucósido y p -NF-N-acetilglucosamina (Schwab et al., 2010). Esta actividad múltiple parece ser frecuente para proteínas de la familia GH42 puesto que la α -L-arabinosidasa *BI*Arap42B de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04, proteína 21,19% idéntica a Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1, presentó además una ligera actividad frente a los sustratos p -NF- β -D-galactopiranosido (0,13%) y p -NF- β -D-

fucopiranosido (2,4%) (Viborg et al., 2017). Por otro lado, la descripción de que Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 presenta elevada actividad β -D-fucosidasa (E.C 3.2.1.38) conduce a la necesidad de la inclusión de esta nueva actividad hidrolítica en la base de datos CAZy entre las glicosil hidrolasas de la familia GH42, puesto que en la actualidad sólo se incluyen hidrolasas con actividad β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.23) y α -L-arabinosidasa (E.C 3.2.1.-).

Debido a que la proteína Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 presenta alta actividad frente a los tres carbohidratos derivados de *p*-NF se decidió realizar su caracterización bioquímica utilizando cada uno de estos sustratos. Se utilizó *p*-NF- β -D-galactopiranosido para caracterizar la actividad β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.23) de Lp_3469 (LacA), *p*-NF- β -D-fucopiranosido para la actividad β -D-fucosidasa (E.C 3.2.1.38) y *p*-NF- α -L-arabinopiranosido para su actividad α -L-arabinosidasa (E.C 3.2.1.-) (**Figura 31**).

La **Figura 31A** representa la actividad de Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 respecto a la temperatura. Se puede comprobar que las gráficas obtenidas con los tres sustratos son muy similares, estando claramente la temperatura óptima comprendida entre 30 y 37 °C. Sin embargo, la proteína LacA de *L. acidophilus* FUA3191 (38,2% idéntica a Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1) presentó un intervalo de temperatura óptima más amplio, de 30 a 45 °C. La temperatura óptima mostrada por Lp_3469 (LacA) es similar a la descrita para otras β -galactosidasas de *L. plantarum*, como LacLM (Lp_3483/Lp_3484) de *L. plantarum* FUA3112 cuya temperatura óptima fue de 37 °C (Schwab et al., 2010). Curiosamente, esta misma β -galactosidasa LacLM en *L. plantarum* WCFS1 mostró una temperatura óptima de 55 °C (Iqbal et al., 2010). Esta discordancia entre ambos resultados puede deberse a los diferentes sustratos y condiciones de reacción utilizadas en ambos estudios.

Respecto al pH óptimo para la actividad, ocurre algo similar que, para la temperatura óptima, puesto que se obtienen gráficas muy similares para los tres sustratos ensayados, a excepción de la menor actividad α -L-arabinosidasa de Lp_3469 (LacA) a pH 7.0 (**Figura 31B**). Se puede observar que la proteína Lp_3469 (LacA) presenta un amplio intervalo de pH óptimo entre pH 4,0 y 7,0. De nuevo Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 presenta un

comportamiento diferente a la proteína equivalente en *L. acidophilus* FUA3191, la cual presenta un intervalo más estrecho de pH óptimo, entre 6,5 y 7,2 (Schwab et al., 2010). Este estrecho intervalo de pH óptimo es similar al descrito para las β -galactosidasas LacLM (Lp_3483/Lp_3484) de *L. plantarum* FUA3112 (pH 6,5-7,2) (Schwab et al., 2010) o LacLM (Lp_3483/Lp_3484) de *L. plantarum* WCFS1 (pH 7,5) (Iqbal et al., 2010). Entre todas estas β -galactosidasas, Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 es la única que presenta alta actividad a pH ácido (pH 4,0).

La **Figura 31C, D y E** muestra la actividad β -D-galactosidasa, β -D-fucosidasa y α -L-arabinosidasa de Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 después de su incubación a 22, 30, 37, 45 y 65 °C durante varios periodos de tiempo. Se puede observar que Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 es una glicosidasa termosensible puesto que sólo mantuvo alta actividad a bajas temperaturas de incubación (22, 30 y 37 °C) para los tres sustratos estudiados. La incubación durante 30 min a 45 y 65 °C conduce a la desaparición de la actividad enzimática. A 37 °C la actividad β -D-galactosidasa fue la que más se mantuvo, siendo superior al 90% de la actividad máxima después de 24 h de incubación, mientras que fue inferior al 70% para las actividades β -D-fucosidasa y α -L-arabinosidasa.

El efecto de aditivos sobre la actividad de Lp_3469 (LacA) se muestra en la **Figura 31F**. De nuevo, se puede observar un comportamiento similar de los aditivos ensayados sobre las tres actividades que presenta, es decir, sobre su actividad β -D-galactosidasa, β -D-fucosidasa y α -L-arabinosidasa. Ninguno de los aditivos ensayados fue capaz de aumentar significativamente la actividad de Lp_3469 (LacA). Por el contrario, los cationes divalentes Hg^{2+} y Cu^{2+} inhibieron casi completamente la actividad enzimática de Lp_3469 (LacA). También se puede señalar que los iones Zn^{2+} y Ni^{2+} ejercieron un mayor efecto inhibitorio sobre la actividad β -D-fucosidasa, que sobre las actividades β -D-galactosidasa y α -L-arabinosidasa.

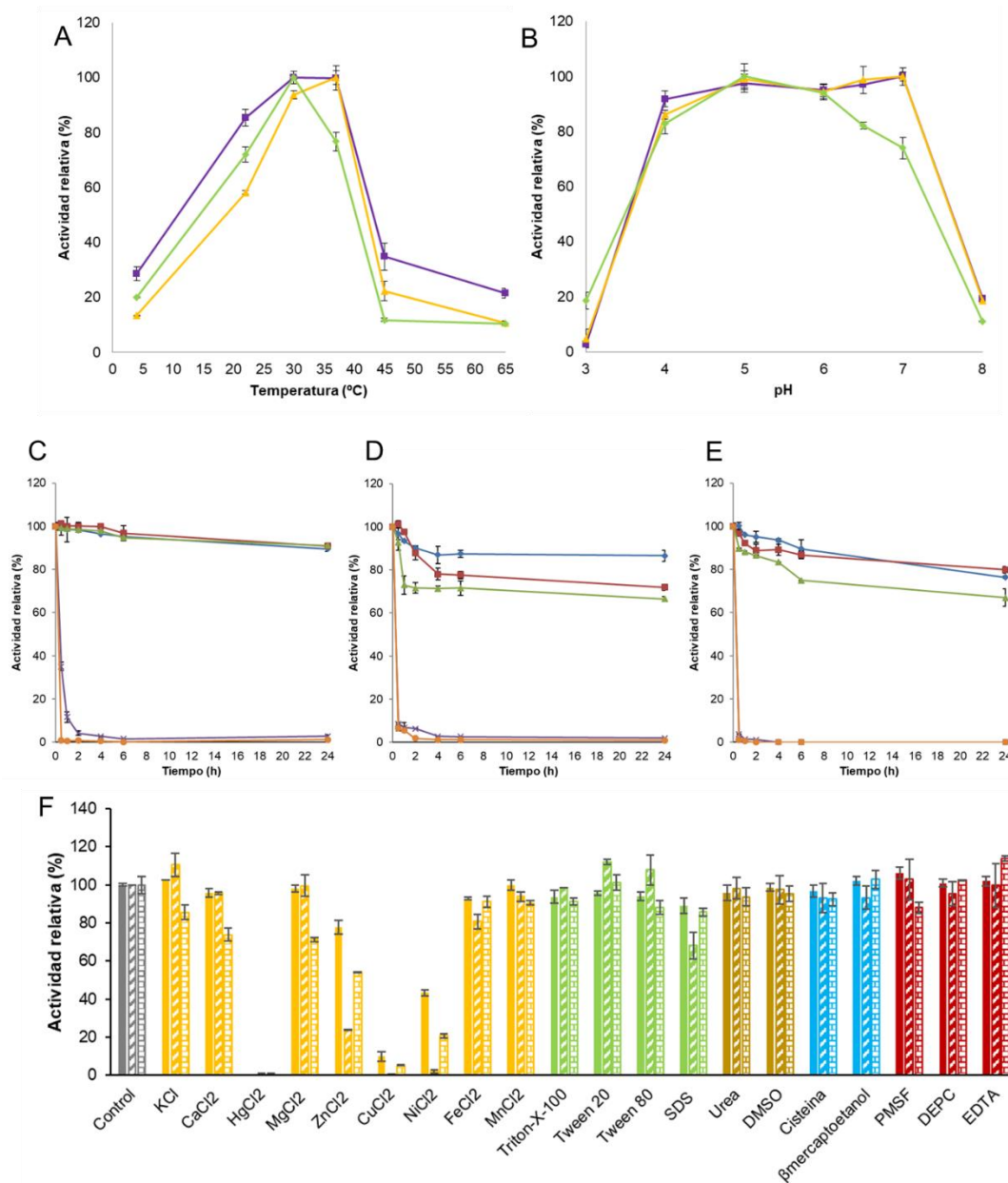


Figura 31. Caracterización de la β-galactosidasa recombinante Lp_3469 (LacA) de la familia GH42 de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática; actividad β-galactosidasa (cuadrado morado); actividad β-fucosidasa (triángulo amarillo); actividad α-L-arabinosidasa (diamante verde). Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0. Actividad β-galactosidasa (C); actividad β-fucosidasa (D); actividad α-L-arabinosidasa (E). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática; Actividad β-galactosidasa (liso); actividad β-fucosidasa (rayado); actividad α-L-arabinosidasa (ladrillo); iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (F). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C, D, E y F, el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo fueron considerados respectivamente como el 100% de actividad.

Al igual que en los estudios fisicoquímicos, en esta tesis se pretendió realizar los estudios cinéticos para cada uno de los sustratos hidrolizados por Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1. Sin embargo, no se pudieron calcular los parámetros cinéticos de Lp_3469 (LacA) para los sustratos *p*-NF- β -D-fucopiranosido y *p*-NF- α -L-arabinopiranosido, ya que no se alcanzaron concentraciones saturantes de sustrato en las condiciones ensayadas. Esto podría deberse, como se comentó anteriormente en el caso de Lp_0263 y Lp_3220, a una baja afinidad de la enzima por el sustrato utilizado, o bien a una baja velocidad de hidrólisis del mismo entre otras razones. Por todo ello, los estudios cinéticos sólo se pudieron realizar con *p*-NF- β -galactopiranosido como sustrato utilizando 1,5 μ g de Lp_3469 (LacA). Las reacciones se realizaron en condiciones estándar (**apartado 5.4 de Materiales y Métodos**) utilizando un intervalo de concentración de sustrato de 0 a 24 mM.

Como se ha comentado anteriormente la proteína LacA de la cepa *L. plantarum* FMNP01 se utilizó para la construcción de una β -galactosidasa quimera (LacA-2), y aunque LacA no se caracterizó bioquímicamente, si se caracterizó cinéticamente (Liao et al., 2017). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 18** al igual que los obtenidos en esta tesis para la proteína Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1. Se pueden observar las evidentes diferencias que existen en los parámetros cinéticos obtenidos para las dos proteínas. Es posible que parte de estas diferencias sean debidas al diferente sustrato utilizado en cada uno de los ensayos. Las constantes cinéticas de la proteína LacA de la cepa *L. plantarum* FMNP01 se calcularon utilizando *o*-NF- β -D-galactopiranosido como sustrato, mientras que en esta tesis en su lugar se ha utilizado *p*-NF- β -D-galactopiranosido. Las constantes cinéticas de la proteína LacA de la cepa *L. plantarum* FMNP01 se modificaron significativamente en la β -galactosidasa quimera (LacA-2) construida a partir de ella, obteniendo los valores que se muestran en la **Tabla 18** (Liao et al., 2017).

Tabla 18. Parámetros cinéticos de la β -D-galactosidasa Lp_3469 (LacA) de dos cepas de *L. plantarum* y de la β -galactosidasa quimera (LacA-2) de la cepa FMNP01.

	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	$E_{cat}(k_{cat}/K_M)$ (min ⁻¹ mM ⁻¹)
LacA WCFS1	4,4±0,002	19,1±2,4	343,6±0,002	17,9±2,3
LacA FMNP01	0,9	6,7	1.350	201,5
LacA-2 FMNP01	2,6	2,9	3.762	1.297,2

La actividad específica de la β -galactosidasa Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 obtenida en esta tesis (UE = 4,4±0,002 U mg⁻¹) fue muy superior a la actividad específica de la proteína LacA de la cepa *L. plantarum* FMNP01 (UE = 0,9 U mg⁻¹) (Liao et al., 2017). Aun así, la actividad específica de Lp_3469 (LacA) es inferior a la descrita para la proteína LacA de *L. acidophilus* FUA3191 (43,2 U mg⁻¹) (Schwab et al., 2010).

Con objeto de confirmar la actividad hidrolítica de Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 observada sobre los 25 carbohidratos derivados de *p*-NF, también se ensayó su actividad hidrolítica sobre 17 carbohidratos naturales. De todos los sustratos ensayados, que representan un amplio número de enlaces glicosídicos diferentes, sólo se observó la hidrólisis de D-lactosa (β -D-Gal-(1,4)- β -D-Glu) y lactulosa (β -D-Gal-(1,4)- β -D-Fruc). Estos resultados confirman la actividad β -D-galactosidasa de Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 puesto que tiene capacidad para hidrolizar eficientemente el enlace β (1,4) que une una unidad de galactosa, ubicada en el extremo no reductor, con glucosa o con fructosa.

En esta tesis no se ha estudiado la capacidad de Lp_3469 (LacA) de *L. plantarum* WCFS1 para catalizar reacciones de transgalactosilación. Sin embargo, la proteína quimera recombinante LacA-2 construida mediante la duplicación del dominio A de Lp_3469 (LacA) (aminoácidos 1 al 396) ha demostrado la capacidad para la síntesis de galactooligosacáridos (GOS) mediante reacciones de transgalactosilación (Liao et al., 2017). La β -galactosidasa quimera construida, en presencia de lactosa y fructosa mediante transgalactosilación, produce dos oligosacáridos, mientras que en presencia de lactosa y sacarosa produce cuatro GOS diferentes cuyas estructuras permanecen en la actualidad sin elucidar (Liao et al., 2017).

1.2.6. Familia 78 (GH78): Lp_3471 y Lp_3473

La familia GH78 de glicosil hidrolasas según la base de datos CAZy incluye proteínas que poseen actividad α -L-ramnosidasa (EC 3.2.1.40) o ramnogalacturonano- α -L-ramnohidrolasa (EC 3.2.1.174). En la cepa *L. plantarum* WCFS1 se han identificado dos glicosil hidrolasas incluídas en la familia GH78, Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) las cuales están anotadas como α -L-ramnosidasas (**Tabla 10**).

Se ha resuelto la estructura tridimensional de glicosil hidrolasas de la familia GH78, como la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* GL1, y se ha observado que esta familia se caracteriza por la posesión de cinco dominios: dominio N-terminal, dominio D1, dominio D2, dominio A catalítico y dominio C-terminal. Se ha postulado que los dos residuos Trp-684 y Glu-841 de la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* GL1 son los posibles residuos catalíticos (Cui et al., 2007). En la **Figura 32** los residuos conservados en α -L-ramnosidasas de la familia GH78 (Cui et al., 2007; O'Neill et al., 2015) se encuentran señalados en rojo. Las glicosil hidrolasas de la familia GH78 actúan mediante un mecanismo de inversión en el que intervienen dos residuos que actúan como un ácido y una base, posiblemente en la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp GL1 correspondan a los residuos Glu-841 y Trp-684 (Cui et al., 2007). En este mecanismo de inversión se produce una protonación del oxígeno nucleósídico por parte del ácido y un ataque nucleófilo por parte de una molécula de agua que previamente es desprotonada por la base.

Como muestra la **Figura 32** se ha utilizado la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp. GL1 como modelo estructural para la comparación de las glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 de la familia GH78. Sin embargo, estas dos proteínas de *L. plantarum*, Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2), sólo presentan un 22 y 21% de identidad en su secuencia, respectivamente, con la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp. GL1. La longitud de la secuencia de estas proteínas es muy diferente, 956 aminoácidos (α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp. GL1), 652 aminoácidos Lp_3471(Ram1) y 525 aminoácidos Lp_3473 (Ram2). Señalar también que las dos glicosidasas de *L. plantarum* WCFS1 tan sólo presentan a su vez un 28% de identidad entre ellas.

Figura 32. Comparación de las glicosil hidrolasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) de *L. plantarum* WCFS1 y la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp. GL1 de la familia GH78. El alineamiento se realizó utilizando el programa *Clustal Omega*. (*) identidad entre aminoácidos, (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo. Los guiones representan espacios introducidos para maximizar similitudes. Los cinco dominios típicos de la familia GH78 se encuentran sombreados dominio N-terminal (azul), dominio D1 (turquesa) dominio D2 (verde), dominio A (morado) y dominio C-terminal (amarillo). Los dos posibles residuos catalíticos de la familia GH78 (Trp-684 y Glu-841 en la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp. GL1) se encuentran señalados en rosa. Los residuos conservados en α -L-ramnosidasas (Cui et al., 2007; O'Neill et al., 2015) se encuentran señalados en rojo.

A pesar de esta baja identidad, ambas proteínas poseen los cinco dominios típicos de la familia GH78 descritos anteriormente (**Figura 32**). En ambas glicosil hidrolasas están presentes los dos posibles residuos catalíticos de la familia GH78, equivalentes a los residuos Trp-684 y Glu-841 de la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp. GL1., al igual que otros residuos conservados en α -L-ramnosidasas (Cui et al., 2007; O'Neill et al., 2015; Li et al., 2019) los cuales se encuentran señalados en rojo en la **Figura 32**.

Las glicosil hidrolasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) de *L. plantarum* WCFS1 se encuentran anotadas en las bases de datos como α -L-ramnosidasas (EC 3.2.1.40). Este tipo de glicosidasas catalizan la hidrólisis de residuos de ramnosa en el extremo no reductor de algunos polisacáridos y ramnósidos, y poseen múltiples aplicaciones en la industria de alimentos, entre las que se incluyen la reducción del amargor de zumos de cítricos, la liberación de aromas en mosto y vinos, y la producción de precursores para la fabricación de edulcorantes, entre otras (Ávila et al., 2009). También presentan especial relevancia en la industria farmacéutica para su uso como precursores en la preparación de distintos fármacos (Yadav et al., 2010).

Al comienzo de esta tesis se habían caracterizado, en mayor o menor profundidad, proteínas equivalentes a Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) de otras cepas de *L. plantarum*, de la cepa *L. plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009) y de la cepa *L. plantarum* DSM 20205 (Beekwilder et al., 2009). Puesto que existían algunas discordancias entre los resultados obtenidos entre ambos estudios, en esta tesis se decidió caracterizar las glicosidasas Lp_3471 (Ram1)

y Lp_3473 (Ram2) de la cepa *L. plantarum* WCFS1 con objeto de poder verificar algunos de los resultados publicados previamente.

Es necesario señalar que algunas de las diferencias observadas en las propiedades bioquímicas de estas proteínas pueden ser debidas a pequeñas diferencias en su secuencia de aminoácidos. La proteína Lp_3471 (Ram1) de *L. plantarum* WCFS1, de 652 aminoácidos, presenta sólo el cambio en el residuo Gly-146 por Val-146 respecto a la secuencia de las proteínas RhaB1 de *L. plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009) y Ram1_{Lp} de *L. plantarum* DSM 20205 (Beekwilder et al., 2009). Por su parte, la proteína Lp_3473 (Ram2) de *L. plantarum* WCFS1, de 525 aminoácidos, presenta ocho cambios respecto a la proteína RhaB2 de *L. plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009). Los cambios entre ambas proteínas son Gln-14-Lys, Lys-36-Gln, Arg-45-Leu, Val-195-Ala, Lys-315-Asn, Glu-222-Ala, Val-430-Ala, y Val-479-Thr (datos no mostrados). Y, por otro lado, la proteína Lp_3473 (Ram2), presenta siete cambios respecto a la proteína Ram2_{Lp} de *L. plantarum* DSM20205 (Beekwilder et al., 2009). Los cambios entre ambas proteínas son Gln-14-Arg, Lys-34-Gln, Val-195-Ala, Lys-315-Asn, Glu-322-Ala, Val-430-Ala, y Val-479-Ile (datos no mostrados).

Con objeto de caracterizar bioquímicamente las α -L-ramnosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) de *L. plantarum* WCFS1, se clonaron los genes que las codifican utilizando las parejas de oligonucleótidos y los vectores de clonaje que se muestran en la **Tabla 11**. Ambas proteínas se hiperprodujeron en *E. coli* BL21 (DE3), se purificaron mediante columnas de afinidad, y se dializaron tal y como se describe en los **apartados 3.6.1 y 5.1 de Materiales y Métodos**. Se obtuvieron 2,7 y 31,8 mg de proteína por litro de cultivo de las proteínas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) respectivamente (**Tabla 11**). La pureza de estas proteínas se analizó mediante SDS-PAGE (**Figura 33**), pudiéndose observar que las proteínas recombinantes Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) producidas poseen un tamaño de 74,8 kDa y 59,7 kDa respectivamente, coincidiendo con las masas moleculares teóricas esperadas (**Tabla 11**).

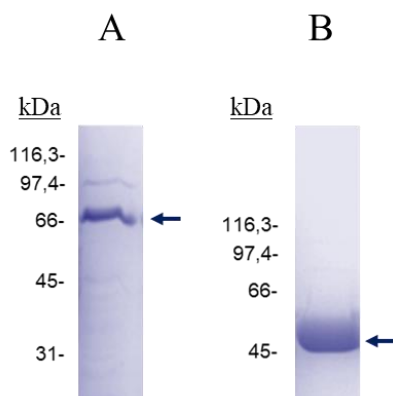


Figura 33. Hiperproducción y purificación de las proteínas recombinantes Lp_3471 (Ram1) (A) y Lp_3473 (Ram2) (B) de la familia GH78 de *L. plantarum* WFCS1. Las flechas indican las fracciones eluidas de las columnas de afinidad con imidazol 150mM y dializadas con tampón fosfato sódico 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0. Gel SDS-PAGE 10% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad) aparece a la izquierda.

Una vez purificadas las α -L-ramnosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2), se decidió estudiar su actividad hidrolítica frente a 25 carbohidratos derivados de *p*-NF (**apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos**) puesto que en los estudios realizados previamente en Ram1_{Lp} y Ram2_{Lp} de *L. plantarum* DSM 20205 (Beekwilder et al., 2009) o en RhaB1 y RhaB2 de *L. plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009) no se había realizado un estudio tan exhaustivo sobre este tipo de sustratos. Los resultados obtenidos y que se muestran en la **Figura 7**, indican que, de todos los sustratos analizados, las glicosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) hidrolizaron exclusivamente el sustrato *p*-NF- α -L-ramnopiranosido. A pesar de que ambas proteínas fueron capaces de hidrolizar este sustrato, Lp_3471 (Ram1) produjo una mayor hidrólisis que Lp_3473 (Ram2) (**Figura 7**), ya que la cantidad de μ mol de *p*-NF liberado en las mismas condiciones de reacción fue mayor en el caso de la glicosidasa Lp_3471 (Ram1) (5,9 μ moles de *p*-NF en Lp_3471 frente a 0,08 μ moles en Lp_3473). En el estudio realizado por Beekwilder et al. (2009) en Ram1_{Lp} y Ram2_{Lp} de *L. plantarum* DSM 20205 se obtuvo un resultado idéntico, puesto que de los cuatro carbohidratos derivados de *p*-NF ensayados (*p*-NF- α -L-ramnopiranosido, *p*-NF- β -D-glucopiranosido, *p*-NF- α -D-galactopiranosido y *p*-NF- β -D-

glucurónido) sólo fueron capaces de hidrolizar *p*-NF- α -L-ramnopiranosido, confirmando así su actividad α -L-ramnosidasa.

Los estudios previos realizados con las proteínas equivalentes a Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) en las cepas de *L. plantarum* DSM 20205 (Beekwilder et al., 2009) o *L. plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009) estuvieron encaminados fundamentalmente a conocer la capacidad hidrolítica de estas enzimas sobre sustratos vegetales en los que frecuentemente aparecen residuos de ramnosa conjugados a compuestos fenólicos. Por ello, en estos estudios se analizó la capacidad hidrolítica de estas α -L-ramnosidasas sobre sustratos que contienen L-ramnosa, principalmente flavonoides de origen vegetal, como naringina, rutina, hesperidina, entre otros, en los que la ramnosa está unida por diversos enlaces a diferentes estructuras. En el estudio realizado en las proteínas Ram1_{Lp} y Ram2_{Lp} de *L. plantarum* DSM 20205 se analizó su actividad hidrolítica sobre flavonoides ramnosilados (Beekwilder et al., 2009). Las α -L-ramnosidasas Ram1_{Lp} y Ram2_{Lp} (equivalentes a Lp_3471 y Lp_3473) hidrolizaron eficazmente rutina, nicotiflorina y narirutina; sin embargo, ninguna de las dos α -L-ramnosidasas fue capaz de desglicosilar naringina. En el estudio realizado por Ávila et al. (2009) ambas proteínas, RhaB1 (equivalente a Lp_3471) y RhaB2 (equivalente a Lp_3473), liberaron L-ramnosa a partir de hesperidina, rutina y proscilaridina A. Tampoco se detectó actividad de RhaB1 y RhaB2 sobre naringina ni otros sustratos ensayados. De manera que las dos α -L-ramnosidasas hidrolizan el enlace α -1,6 de la L-ramnosa con β -D-glucosa, siendo rutina y hesperidina los mejores sustratos, mientras que por el contrario no presentan actividad sobre los enlaces α -1,2 presentes en la naringina (Ávila et al., 2009). Los resultados obtenidos sugieren que las actividades α -L-ramnosidasas de RhaB1 (Ram1_{Lp} o Lp_3471) y RhaB2 (Ram2_{Lp} o Lp_3473) dependen tanto del tipo de enlace de la L-ramnosa al sustrato como de su estructura (Ávila et al., 2009).

Una vez demostrada la actividad α -L-ramnosidasa de Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) de *L. plantarum* WCFS1 se determinaron las características fisicoquímicas de ambas proteínas utilizando *p*-NF- α -L-ramnopiranosido como sustrato. En el estudio realizado en esta tesis, la proteína Lp_3471 (Ram1) de

L. plantarum WCFS1 presentó una temperatura óptima entre 30 y 45 °C (**Figura 34A**) mostrando una actividad relativa superior al 80% a 65 °C. Este resultado es similar al descrito para las proteínas equivalentes en las otras cepas de *L. plantarum*, RhaB1 de *L. plantarum* NCC245, cuya temperatura óptima fue de 50°C (Ávila et al., 2009) y Ram1_{Lp} de *L. plantarum* DSM 20205 con una temperatura óptima entre 37 y 45°C (Beekwilder et al., 2009). Por su parte, la proteína Lp_3473 (Ram2) presentó una temperatura óptima de 65 °C, similar a los 60 °C descritos para la proteína equivalente RhaB2 de *L. plantarum* NCC245 (Avila et al., 2009). La temperatura óptima para la proteína Ram2_{Lp} de *L. plantarum* DSM 20205 no se determinó puesto que resultó ser una proteína muy inestable durante su almacenamiento (Beekwilder et al., 2009).

Respecto al pH óptimo de estas α -L-ramnosidasas, en la **Figura 34B** se puede observar que la proteína Lp_3471 (Ram1) presentó un pH óptimo próximo a 6,0 mostrando una actividad relativa del 75% a pH entre 4,0 y 7,0, mientras que a pH 3,0 y 8,0 no presentó actividad. De nuevo estos resultados son coincidentes con los descritos para las proteínas equivalentes en otras cepas de *L. plantarum*. La proteína RhaB1 de *L. plantarum* NCC245 presentó un pH óptimo a 7.0 (Ávila et al., 2009) y Ram1_{Lp} presentó actividad óptima entre pH 4,5 y 8,0 (Beekwilder et al., 2009), destacando que por debajo de pH 4.0 la enzima pierde su actividad. Por su parte, la proteína Lp_3473 (Ram2) presentó un pH óptimo de 3,0, manteniendo alrededor de un 50% de actividad relativa entre los pH 4,0 y 7,0. El pH óptimo descrito para la proteína equivalente RhaB2 de *L. plantarum* NCC245 fue de 5.0 (Ávila et al., 2009).

Como se muestra en la **Figura 34C**, los ensayos de estabilidad térmica de la proteína Lp_3471 (Ram1) mostraron que en incubaciones entre 22 y 45°C durante 6 h la enzima mantiene una actividad relativa superior al 70%, mientras que la proteína Lp_3473 (Ram2) mantuvo un 90% de su actividad máxima tras incubaciones de 2 h entre 22 y 45 °C. Estos datos coinciden con los descritos para las proteínas equivalentes de *L. plantarum* NCC245 (RhaB1 y RhaB2) que mantuvieron una actividad superior al 70% después de una incubación durante 6h a temperaturas inferiores a 45 °C (Ávila et al., 2009).

Respecto al efecto de distintos aditivos sobre la actividad de las α -L-ramnosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) señalar que alguno de los aditivos utilizados fue capaz de aumentar la actividad de Lp_3471 (Ram1), como por ejemplo Tween-80, EDTA, urea, PMSF y DEPC. Sin embargo, ninguno aumentó la actividad de Lp_3473 (Ram2) (**Figura 34D**). Tween 80 fue el aditivo que más potenció la actividad enzimática de la proteína Lp_3471 (Ram1) aumentando hasta un 157% su actividad. El Tween 80 es un agente tensioactivo que dificulta el desplegamiento de la proteína por lo que podría estar actuando como un estabilizador. Además, este aditivo es capaz de interaccionar con la parte hidrofóbica de la proteína que tiende a la agregación evitando así una autoasociación de la misma (Jones et al., 2018). El EDTA aumentó la actividad de Lp_3471 (Ram1) (145%), al igual que en la proteína RhaB1 de *L. plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009). El EDTA es un agente quelante de iones divalentes lo que parece indicar que Lp_3471 (Ram1) no requiere de cofactores metálicos para la catálisis. Otros aditivos que consiguieron estabilizar o incluso potenciar la actividad enzimática de la α -L-ramnosidasa Lp_3471 (Ram1) fueron los agentes caotrópicos UREA y DMSO aumentando su actividad en un 138 y 123% respectivamente. El PMSF aumenta la actividad de Lp_3471 (Ram1) (130%), al tratarse de un inhibidor de proteasas capaz de unirse específicamente a la serina del sitio activo de algunas enzimas, el no tener efecto inhibitor sobre la proteína Lp_3471 (Ram1) parece indicar que no existen residuos de serina en su centro activo.

Resultados y discusión

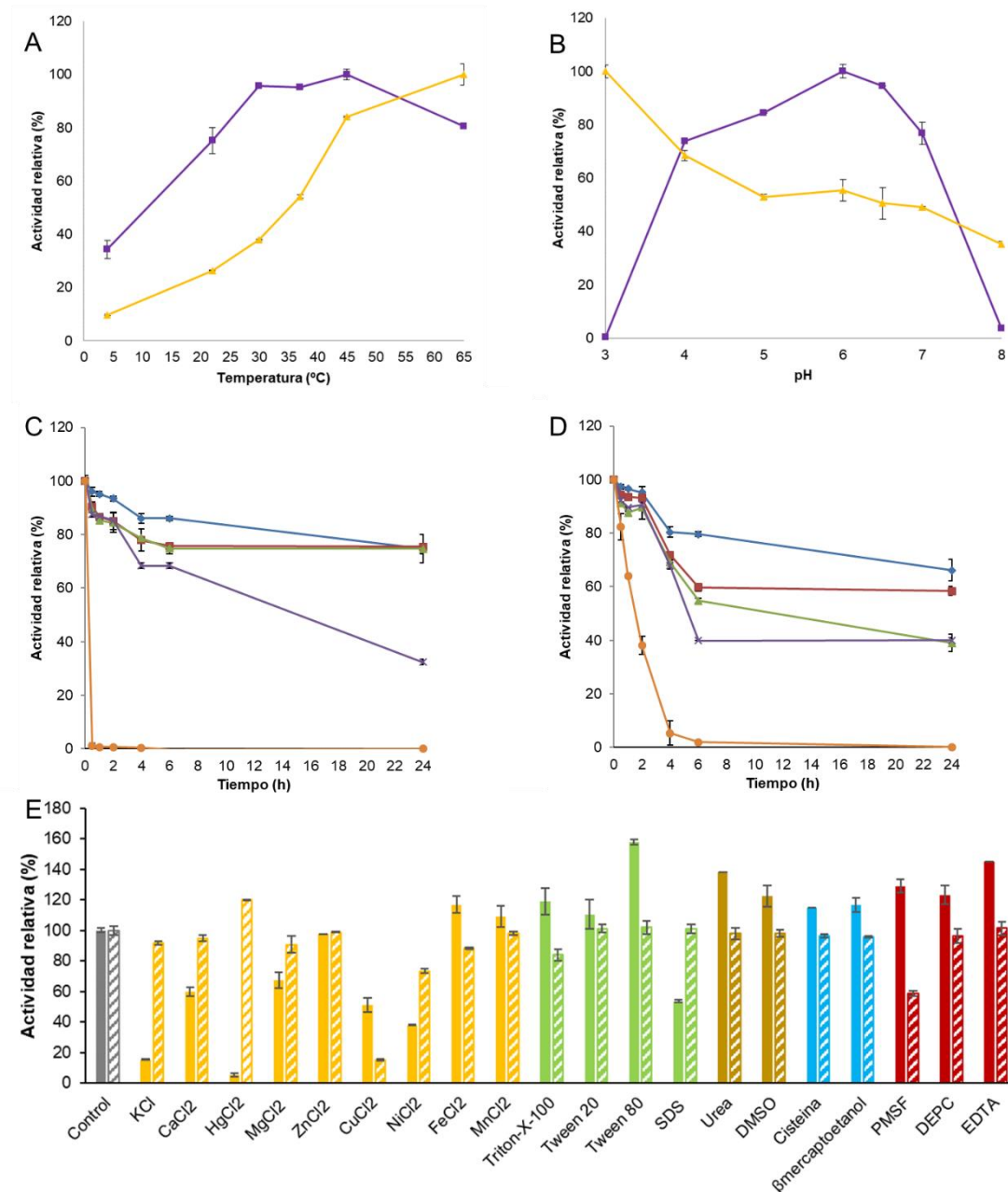


Figura 34. Caracterización de las α -L-ramnosidasas recombinantes Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) de la familia GH78 de *L. plantarum* WCFS1. Efecto de la temperatura (A) y del pH (B) en la actividad enzimática; Lp_3471 (cuadrado azul); Lp_3473 (triángulo amarillo). Estabilidad térmica; la enzima se incubó a 22 °C (diamante azul), 30 °C (cuadrado granate), 37 °C (triángulo verde), 45 °C (aspa morada) y 65 °C (círculo naranja) en tampón MOPS 50 mM, NaCl 20 mM, DTT 1 mM pH 7,0. Lp_3471 (C); Lp_3473 (D). Efecto de distintos aditivos (concentración final 1mM) en la actividad enzimática: iones metálicos (representados en amarillo), detergentes (verde), agentes caotrópicos (marrón), agentes reductores (azul) e inhibidores de proteasas, de ARNasa y agente quelante de iones divalentes (granate) (F). Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. En las figuras A y B la máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad. En las figuras C, D y E el control sin incubación de la enzima y el control sin aditivo se consideraron respectivamente como el 100% de actividad.

Algunos de los aditivos ensayados presentaron un efecto inhibitorio de la actividad de estas α -L-ramnosidasas. El efecto inhibitorio más potente sobre la proteína Lp_3471 (Ram1) lo mostraron los iones metálicos K^+ y Hg^{2+} , lo que coincide con lo observado en las ramnosidasas RhaB1 y RhaB2 de *L. plantarum* NCC245 (Ávila et al., 2009) y también para la α -L-ramnosidasa de *Bacillus* sp. GL1, donde se obtuvo a una actividad residual del 0,23% (Hashimoto et al., 2003). Los iones metálicos Ca^{2+} y Mg^{2+} actuaron como inhibidores de la proteína Lp_3471 (Ram1) disminuyendo su actividad al 60 y 68% respectivamente, coincidiendo con los resultados descritos previamente para la proteína Ram1_{Lp} de *L. plantarum* DSM 20205 (Beekwilder et al., 2009). Respecto a los detergentes ensayados, el SDS fue el único que disminuyó la actividad relativa de la proteína Lp_3471 (Rma1) hasta un 54%.

El estudio cinético se realizó en condiciones estándar con 4 μ g de proteína Lp_3471 (Ram1) y utilizando *p*-NP- α -L-ramnopiranosido como sustrato, llevando a cabo las reacciones en condiciones estándar (**apartado 5.4 de Materiales y Métodos**). Los resultados obtenidos con la proteína Lp_3471 (Ram1) de *L. plantarum* WCFS1 frente al sustrato *p*-NP- α -L-ramnopiranosido se muestran en la **Tabla 19**. La actividad específica de la proteína Lp_3471 (Ram1) de *L. plantarum* WCFS1 como α -L-ramnosidasa es superior a la que se obtuvo en Ram1_{Lp} de *L. plantarum* DSM20205 (Beekwilder et al., 2009). A partir de los valores de K_M y V_{max} , se calcularon los valores de k_{cat} y la E_{cat} (k_{cat}/K_M). Según estos resultados, la proteína Lp_3471 (Ram1) de *L. plantarum* WCFS1 es catalíticamente más eficiente que las α -L-ramnosidasas RhaB1 ($133,3 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), RhaB2 ($1,9 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) de *L. plantarum* NCC245 estudiadas por Ávila et al. (2009) y Ram1_{Lp} ($0,06 \pm 1 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) estudiada por Beekwilder et al. (2009). En el caso de la proteína Lp_3473 (Ram2) de *L. plantarum* WCFS1 no se pudieron calcular los parámetros cinéticos utilizando como sustrato *p*-NF- α -L-ramnopiranosido, ya que no se alcanzaron concentraciones saturantes del mismo en las condiciones del ensayo. De nuevo esto podría deberse a una baja afinidad de la enzima por el sustrato o a una baja velocidad de hidrólisis.

Tabla 19. Parámetros cinéticos de las α -L-ramnosidasas en distintas cepas de *L. plantarum*.

	V_{max} (U mg ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	E_{cat} (k_{cat}/K_M) (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Lp_3471 WCFS1	6,0±0,0009	1,6±0,3	411,1±0,0009	284,6±47,7
RhaB1 NCC245	76	0,57	-	133,3
RhaB2 NCC245	1,0	0,51	-	1,9
Ram1 DSM 20205	0,02±0,005	6,3±3,1	3.840	0,06±1x10 ⁻⁵

Los resultados obtenidos en la caracterización de las α -L-ramnosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) de *L. plantarum* WCFS1 coinciden con los descritos previamente en las proteínas equivalentes de otras cepas de *L. plantarum* (Ávila et al., 2009; Beekwilder et al., 2009). Las características descritas tanto en esta tesis como en los estudios anteriores para las α -L-ramnosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) hacen que sean proteínas de interés para el desarrollo de aplicaciones industriales, en dónde la temperatura y el pH pueden variar a lo largo del proceso. Estas enzimas pueden aplicarse para mejorar la biodisponibilidad de compuestos fenólicos beneficiosos para la salud.

2. Relevancia funcional de las glicosil hidrolasas analizadas en el fenotipo de *L. plantarum* WCFS1

Una vez realizada la caracterización bioquímica de las 20 glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 hiperproducidas de forma recombinante en esta tesis, se decidió estudiar la implicación funcional de algunas de ellas en el fenotipo mostrado por *L. plantarum* WCFS1 en el **apartado 1.1**. Para ello se planificó construir cepas mutadas de *L. plantarum* WCFS1 en las que el gen que codifica una glicosil hidrolasa determinada estuviera interrumpido y, por lo tanto, la correspondiente cepa de *L. plantarum* mutada no posea dicha actividad enzimática, y de esta manera fuera posible asociar una determinada actividad glicosídica con una glicosil hidrolasa específica. Sin embargo, también puede ocurrir que varias proteínas fuesen capaces de hidrolizar un mismo carbohidrato derivado de *p*-NF, por lo que la interrupción de uno de los genes

no ocasione ningún cambio en el perfil de hidrólisis de estos carbohidratos derivados de *p*-NF en la cepa de *L. plantarum* mutada. En este caso, el efecto de la interrupción puede quedar enmascarado por la actividad de otras enzimas que posean la misma capacidad de hidrolizar ese mismo sustrato. A pesar de ello, es posible que en algunas ocasiones si se pueda encontrar la asociación de la interrupción de un determinado gen con la desaparición de una actividad glicosídica específica en la correspondiente cepa mutada de *L. plantarum* WCFS1.

Los resultados obtenidos con las 20 glicosil hidrolasas en la hidrólisis de carbohidratos derivados de *p*-NF indican que *L. plantarum* WCFS1 posee glicosil hidrolasas que presentan actividad α -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.22) [Lp_3485 (MeIA)], α -D-glucosidasa (E.C 3.2.1.20) [Lp_0263 (TreA) y Lp_3220 (Agl4)], α -L-arabinosidasa (E.C 3.2.1.-) [Lp_3469, (LacA)], α -L-ramnosidasa (E.C 3.2.1.40) [Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2)], β -D-fucosidasa (E.C 3.2.1.38) (Lp_3469, LacA), β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.23) [Lp_3469, (LacA)], 6-P- β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.85) [Lp_3525 (Pbg9)], 6-P- β -D-glucosidasa (E.C 3.2.1.86) [Lp_0440 (Pbg1), Lp_0906 (Pbg2), Lp_1401 (Pbg3), Lp_2777 (Pbg4), Lp_2778 (Pbg5), Lp_3011 (Pbg6), Lp_3132 (Pbg7), Lp_3512 (Pbg8), Lp_3525 (Pbg9), Lp_3526 (Pbg10), y Lp_3629 (Bgl)], α -D-maltopentaosidasa (E.C 3.2.1.133) (Lp_2757) y α -D-maltosidasa (E.C 3.2.1.1) [Lp_0179 (Amy2), Lp_0187 (SacA) y Lp_2757], consiguiéndose así identificar un total de diez actividades glicosil hidrolíticas distintas.

En este trabajo se abordó la construcción de cepas de *L. plantarum* WCFS1 mutantes para cada una de las proteínas caracterizadas fisicoquímicamente en esta tesis. Hasta el momento se han conseguido obtener siete cepas mutadas de *L. plantarum* WCFS1 en genes que codifican glicosidasas con actividad α -D-maltosidasa [*lp_0187* (*sacA*)], α -D-glucosidasa [*lp_0263* (*treA*)], 6-fosfo- β -D-glucosidasa [*lp_0906* (*pbg2*), *lp_2777* (*pbg4*), *lp_3629* (*bgl*)], β -D-galactosidasa [*lp_3469* (*lacA*)], y α -L-ramnosidasa [*lp_3471* (*ram1*)] como se ha demostrado en apartados anteriores de esta tesis.

Para la construcción de estas cepas de *L. plantarum* WCFS1 mutantes se amplificaron fragmentos de los genes que codifican las glicosil hidrolasas a

interrumpir y se clonaron en el plásmido pUCE191 (**apartado 3.3 de Materiales y Métodos**). Tal y como se muestra en la **Tabla 5**, para amplificar fragmentos internos de los genes se utilizaron los oligonucleótidos 1857 y 1858 [*lp_0187 (sacA)*], 1601 y 1602 [*lp_0263 (treA)*], 1859 y 1860 [*lp_0906 (pbg2)*], 1593 y 1594 [*lp_2777 (pbg4)*], 1832 y 1833 [*lp_3469 (lacA)*], 1830 y 1831 [*lp_3471 (ram1)*] y 1597 y 1598 [*lp_3629 (bgl)*]. Una vez clonados los fragmentos de los genes de interés en el vector pUCE191, tal y como se describe en el **apartado 3.6.2. de Materiales y Métodos**, se llevó a cabo la transformación de las células competentes de *L. plantarum* WCFS1 y se seleccionaron las cepas mutantes por su resistencia a eritromicina y/o lincomicina (**apartado 4.2. de Materiales y Métodos**). Para evitar la selección de mutantes espontáneos resistentes a eritromicina y lincomicina, se comprobó la presencia del gen que confiere resistencia a eritromicina mediante su amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos 697 y 698 (**Tabla 5**). Además, se verificó la interrupción de los distintos genes de *L. plantarum* WCFS1 mediante amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido complementario al plásmido pUCE191 (oligonucleótidos 1224 o 1233) y un oligonucleótido complementario a una región externa al fragmento del gen interrumpido, en este caso, se utilizaron los mismos cebadores que se emplearon para amplificar cada gen para su clonaje (**Tabla 5**).

La **Figura 35** muestra, como ejemplo, la verificación de la correcta inserción del plásmido pUCE191 en el mutante *L. plantarum* WCFS1 Δ 3471. En el mutante se puede observar la amplificación del gen que confiere resistencia a eritromicina (**Figura 35, carril 4**), los fragmentos amplificados correspondientes a una región del gen *lp_3471 (ram1)* unida a un fragmento del plásmido pUCE191 (**Figura 35, carriles 1 y 2**), así como la ausencia de la amplificación correspondiente al gen *lp_3471* completo (**Figura 35, carril 3**).

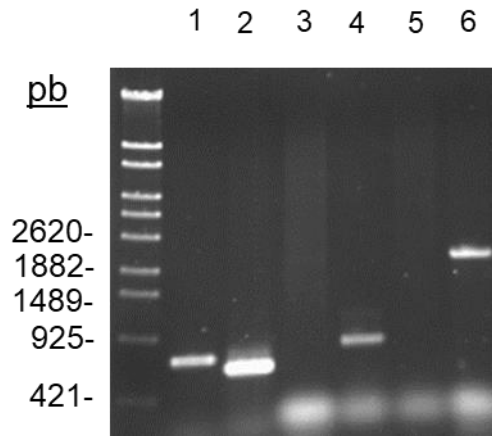


Figura 35. Verificación de la interrupción del gen *lp_3471* (*ram1*) por inserción del plásmido pUCE191_3471 vía recombinación homóloga en *L. plantarum* WCFS1. (1) Fragmento “inicio gen *lp_3471*-plásmido pUCE191” amplificado con los oligonucleótidos 1224+1706. (2) Fragmento “final plásmido pUCE191-gen *lp_3471*” amplificado con los oligonucleótidos 1705+1233. (3) Amplificación del gen completo *lp_3471* con los oligonucleótidos 1705+1706. (4) Amplificación de un fragmento del gen que confiere resistencia a eritromicina con los oligonucleótidos 697+698. (5) Control negativo, ausencia del gen que confiere resistencia a eritromicina en ADN de *L. plantarum* WCFS1 con los oligonucleótidos 697+698. (6) Control positivo, presencia del gen *lp_3471* (*ram1*) en el ADN de *L. plantarum* WCFS1 con los oligonucleótidos 1705+1706. El marcador de pares de bases λ -EcoT14 I (*Takara*) aparece a la izquierda.

Con objeto de conocer la implicación funcional de cada una de las glicosil hidrolasas en el fenotipo mostrado por *L. plantarum* WCFS1 se estudió el perfil de utilización de los 24 carbohidratos derivados de *p*-NF de las siete cepas mutantes obtenidas y los perfiles obtenidos se compararon con el perfil mostrado por la cepa silvestre *L. plantarum* WCFS1. Como se puede comprobar en la **Figura 36** la interrupción de estos genes provocó múltiples cambios en el perfil de hidrólisis de algunos de los *p*-NF ensayados. Cada una de las cepas mutantes de *L. plantarum* WCFS1 ensayadas presenta un perfil de hidrólisis de *p*-NF diferente al mostrado por los otros mutantes o por la cepa silvestre.

	<i>p</i> -NF- α -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Manopiranosido	<i>p</i> -NF- α -D-Xilopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Arabinofuranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Arabinopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF- α -L-Ramnopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Galactopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF-6-P- β -D-Glucopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Glucurónido	<i>p</i> -NF- β -D-Manopiranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Ribofuranosido	<i>p</i> -NF- β -D-Xilopiranosido	<i>p</i> -NF- β -L-Fucopiranosido	<i>p</i> -NF-NA- α -D-Glucosaminido	<i>p</i> -NF-NA- β -D-Glucosaminido	<i>p</i> -NF- α -D-Maltósido **	<i>p</i> -NF- β -D-Celobiosa **	<i>p</i> -NF- β -D-Lactopiranosido **	<i>p</i> -NF- β -D-Maltósido **
CÉLULAS DURMIENTES																								
WCFS1																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _0187																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _0263																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _0906																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _2777																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _3469																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _3471																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _3629																								
EXTRACTOS PROTEICOS																								
WCFS1																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _0187																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _0263																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _0906																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _2777																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _3469																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _3471																								
WCFS1 Δ <i>lp</i> _3629																								

Figura 36. Hidrólisis de carbohidratos derivados de *p*-NF mediante células durmientes y extractos proteicos de *L. plantarum* WCFS1 y de sus mutantes. Las intensidades de color reflejan un diferente grado de hidrólisis valorado a 420 nm, <0,1 (blanco), 0,1-1,0 (color intermedio) y >1,0 (color oscuro). *, disacáridos.

Como se puede observar en la **Figura 36**, las variaciones son muy numerosas y diversas lo que dificulta su interpretación. Respecto a los resultados obtenidos en células durmientes, el único carbohidrato derivado de *p*-NF que no mostró variación en su hidrólisis fue el β -D-ribofuranosido. Los resultados también muestran que la interrupción del gen *lp*_3469 (*lacA*), que codifica la β -D-galactosidasa Lp_3469 (LacA), ocasiona la pérdida total de la capacidad de *L. plantarum* WCFS1 para hidrolizar *p*-NF- α -D-galactopiranosido. De manera similar la ausencia de α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) o β -D-

galactosidasa Lp_3469 (LacA) originan la pérdida de la capacidad para hidrolizar *p*-NF- β -D-glucopiranosido. Sorprende, y está en contra de lo esperado, que la interrupción de cada uno de los siete genes aumente la capacidad hidrolítica de *L. plantarum* WCFS1 sobre α -D-glucopiranosido, α -L-arabinopiranosido y β -D-fucopiranosido. También se observa la aparición de nuevas capacidades hidrolíticas en células durmientes, como por ejemplo la capacidad para hidrolizar *p*-NF-N-acetil- β -D-glucosamínido en mutantes carentes de α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA), 6-P- β -D-glucosidasa Lp_0906 (Pbg2) o α -L-ramnosidasa Lp_3471 (Ram1). En los resultados obtenidos con extractos proteicos también se observa una amplia variedad de efectos. El único sustrato hidrolizado por *L. plantarum* WCFS1 cuya hidrólisis no se vio afectada en ninguno de los mutantes analizados fue el *p*-NF- β -D-galactopiranosido. Por el contrario, todos los mutantes analizados afectaron a la capacidad hidrolítica de *L. plantarum* WCFS1 sobre *p*-NF- β -D-xilopiranosido. Además, en extractos proteicos se confirman algunos de los resultados obtenidos con células durmientes, como por ejemplo la pérdida de la capacidad para hidrolizar *p*-NF- β -D-glucopiranosido en ausencia de α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) o β -D-galactosidasa Lp_3469 (LacA). Es destacable que la ausencia de la β -D-galactosidasa Lp_3469 (LacA) origina en *L. plantarum* WCFS1 la incapacidad para hidrolizar múltiples sustratos, *p*-NF- α -D-glucopiranosido, *p*-NF-6-fosfo- β -D-glucopiranosido y *p*-NF- β -D-xilopiranosido, además de *p*-NF- β -D-glucopiranosido descrito anteriormente. Esto puede estar relacionado con la múltiple actividad hidrolítica que presenta la glicosidasa Lp_3469 (LacA), puesto que presenta actividad β -D-galactosidasa, β -D-fucosidasa y α -L-arabinosidasa, según se ha descrito en un apartado anterior de esta tesis. La difícil interpretación de estos resultados refleja la compleja red metabólica interrelacionada que posee *L. plantarum* WCFS1 para el metabolismo de carbohidratos. En este estudio se ha constatado la dificultad para relacionar la interrupción de un gen con la pérdida de una única actividad hidrolítica determinada en *L. plantarum* WCFS1, posiblemente debido a la existencia de diversas glicosidasas capaces de catalizar una misma actividad hidrolítica. Sin embargo, también es necesario considerar que muchos de los genes interrumpidos forman parte de complejos operones, en los que la

interrupción de un gen puede ocasionar efectos en los genes adyacentes, afectando así al perfil de utilización de múltiples carbohidratos.

La primera aproximación basada en el perfil de hidrólisis de carbohidratos derivados de *p*-NF para asociar la interrupción de una glicosidasa específica con el fenotipo mostrado por *L. plantarum* WCFS1 no ha permitido encontrar ninguna asociación evidente. Paralelamente, y con el mismo objetivo, en esta tesis se utilizó una segunda estrategia experimental. Esta segunda estrategia está basada en el estudio en las cepas mutantes de *L. plantarum* WCFS1 de los cambios producidos en el perfil de utilización de fuentes de carbono mediante el sistema *Phenotype Microarray* (*Biolog*, USA).

Como ya se ha comentado anteriormente, en el caso de que varias proteínas presenten la misma actividad glicosídica, es posible que la interrupción de uno de los genes no ocasione ningún cambio en el fenotipo de la cepa mutante. El efecto de la interrupción de una de las proteínas puede quedar enmascarado por la actividad de las otras. Sin embargo, se puede encontrar algún caso en el que se asocie la interrupción de un determinado gen con la desaparición de una actividad glicosídica específica en la cepa *L. plantarum* WCFS1.

Las diferencias en la actividad celular respiratoria de los mutantes y de la cepa silvestre *L. plantarum* WCFS1 se evaluaron utilizando el perfil de utilización de carbohidratos de alta resolución *Phenotype MicroArray System* (*Biolog*, USA) mediante medidas de crecimiento a 48 h utilizando un lector de microplacas a 590 nm. Se tomó una DO₅₉₀ de 0,1 como valor para atribuir incremento del crecimiento a la fuente de carbono ensayada. El grupo de fenotipos analizados se examinó utilizando las placas PM1 y PM2A las cuales permiten el ensayo de hasta 190 fuentes de carbono diferentes (**Figura 37**).

Como ya se ha comentado anteriormente en el **apartado 1.** de este mismo capítulo, *L. plantarum* WCFS1 fue capaz de utilizar 29 de las 190 fuentes de carbono incluidas en las micromatrices analizadas. La interrupción de algunos genes que codifican glicosil hidrolasas provocó la inducción de diversos cambios fenotípicos en la utilización de las fuentes de carbono ensayadas. Los resultados (**Figura 37**) muestran que 21 de las fuentes de

carbono ensayadas se utilizaron con una eficiencia similar tanto por los mutantes como por la cepa silvestre, incluyendo, algunos monosacáridos y polisacáridos tales como N-acetil-D-glucosamina, α -D-glucosa, D-galactosa, D-trehalosa, D-sorbitol, D-celobiosa, D-melibiosa, D-ribosa, sacarosa, β -metil glucosa, maltotriosa; polisacáridos de origen vegetal como laminarina y pectina; algunos ácidos orgánicos como ácido acetoacético; principal cuerpo cetónico que interviene en el metabolismo de lípidos, y ácido oxomálico, de origen vegetal y alimentario; amigdalina, arbutina, gentiobiosa, D-melezitosa, salicina, y dihidroxiacetona (**Figura 37**). Este resultado indica que ninguna de las mutaciones afecta notablemente a la capacidad de utilización de estas fuentes de carbono. Además, se han encontrado otras similitudes en la huella metabólica de los mutantes estudiados. Aunque la cepa silvestre *L. plantarum* WCFS1 es capaz de utilizar L-fucosa para crecer (aunque a bajo nivel) todos los mutantes han perdido completamente esta capacidad. Otra similitud en los mutantes, excepto en *L. plantarum* WCFS1 Δ 3629, fue la pérdida total de cierta capacidad de la cepa silvestre para utilizar D-glucosa 1-P, un producto de la degradación del glucógeno (**Figura 37**). Finalmente, cabe destacar que todas las mutaciones eliminaron o redujeron la utilización de α - metil-D-galactosa, un compuesto modelo de polisacáridos que incluyen unidades α -galactosil como por ejemplo los galactomananos, presente en nichos vegetales.

Por otro lado, los resultados muestran que cada mutante presenta un perfil de utilización de carbohidratos único y diferente al mostrado por los otros mutantes o por la cepa silvestre *L. plantarum* WCFS1 (no mutada), mostrándose así una huella metabólica única para cada mutante. Entre estas variaciones algunas eran previsibles y respondían a una posible correlación con la función del gen mutado. Por ejemplo, aunque todos los mutantes adquirieron la capacidad para fermentar lactulosa, el mutante *L. plantarum* WCFS1 Δ 3629 fue incapaz de utilizar este sustrato (**Figura 37**) el cual es eficientemente utilizado por la proteína pura Lp_3629 (Bgl).

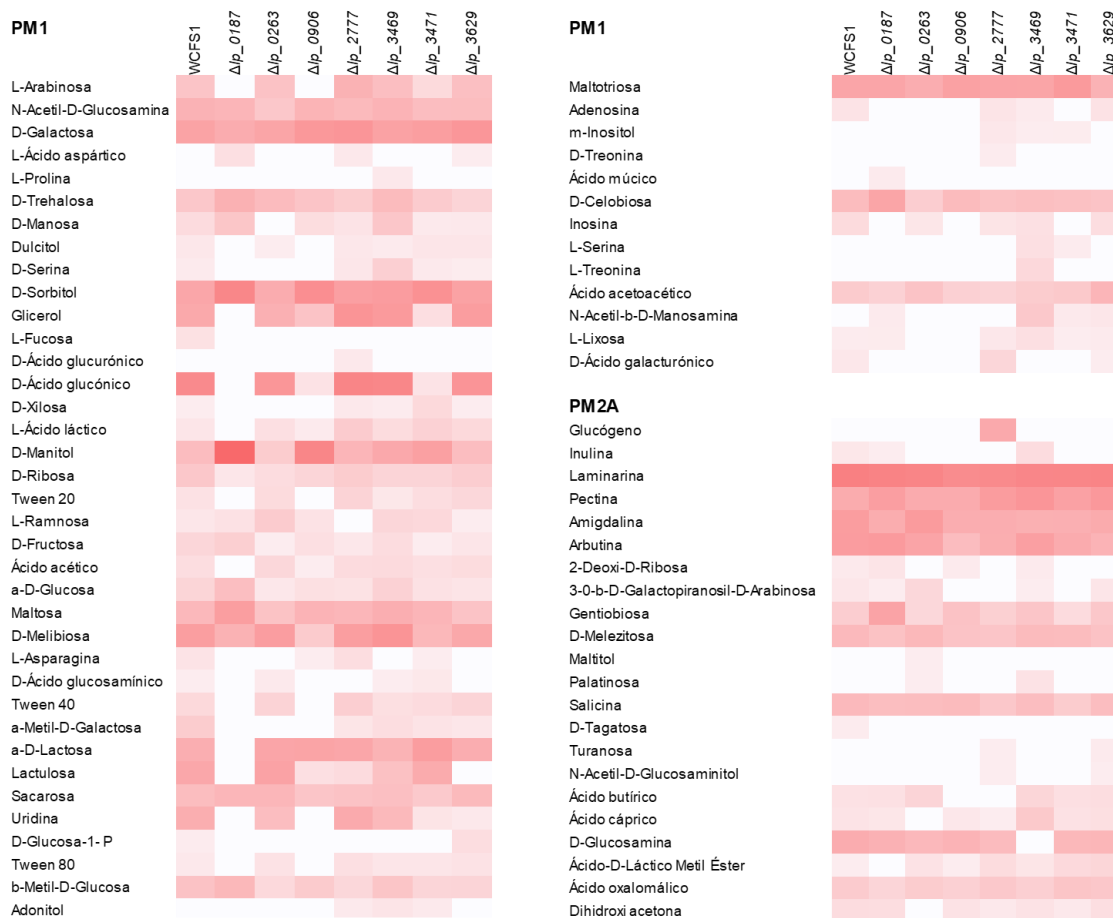


Figura 37. Perfil de utilización de carbohidratos de *L. plantarum* WCFS1 y de sus mutantes mediante el uso de micromatrices fenotípicas. Se ha establecido un formato condicional en función de los valores de absorbancia medida a 590 nm.

En primer lugar, en relación al perfil de utilización de monosacáridos, éste refleja que el conjunto de sustratos afectados por la ausencia de las glicosil hidrolasas estudiadas es amplio. Incluso los mutantes en las 6-P- β -glucosidasas asociadas a sistemas de transporte PEP-PTS [(Lp_0906 (Pbg2) y Lp_2777 (Pbg4)] presentan un perfil de utilización de monosacáridos diferente en sus respectivas huellas metabólicas, lo que implicaría que no son simplemente sistemas redundantes, sino que posiblemente son específicas para diferentes β -glucósidos (Michlmayr y Kneifel, 2014). La utilización de monosacáridos en el resto de mutantes afectó principalmente a la utilización de xilosa, fructosa, ramnosa, arabinosa, manosa, ribosa y lixosa (**Figura 37**), tratándose en su mayoría de carbohidratos de origen vegetal. Aunque el estudio molecular detallado del efecto de cada mutación en el perfil metabólico

de cada uno de los mutantes está fuera del objetivo de esta tesis, la utilización dispar por los diferentes mutantes de estos y otros monosacáridos se debe probablemente a la utilización jerárquica de las fuentes de carbono en *L. plantarum* la cual podría estar controlada por el fenómeno de regulación por catabolito, como ocurre en la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA) (*L. plantarum* WCFS1 Δ 0187) (Chen et al., 2018).

Además de en la utilización de monosacáridos también se ha observado que determinadas mutaciones afectan a la utilización de ciertos disacáridos y polisacáridos. La mutación que más afecta a la utilización de disacáridos es en el gen *lp_0187* (*sacA*) que codifica la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA). Sin embargo, las mutaciones en la α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) y en las 6-P- β -D-glucosidasas Lp_0906 (Pbg2) y Lp_3629 (Bgl) también afectaron a la capacidad de utilización de disacáridos y polisacáridos. Estos resultados podrían indicar que la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA) está implicada en la utilización preferentemente de disacáridos, mientras que, la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_0906 (Pbg2) está implicada en la utilización de polisacáridos. El mutante en la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_3629 (Bgl) (WCFS1 Δ 3629) que ha perdido la capacidad para usar lactulosa o el mutante en la α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) (WCFS1 Δ 0263) que ha perdido la capacidad para utilizar inulina, parece indicar que la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_3629 (Bgl) y la α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) también pueden estar implicados en la utilización de estos polisacáridos concretos.

Todos los mutantes analizados, excepto el mutante en la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_3629 (Bgl) (*L. plantarum* WCFS1 Δ 3629), modificaron su capacidad para utilizar alguno de los azúcares alcohólicos ensayados en las micromatrices fenotípicas. Esta variación es un indicador más de la importancia que tienen las glicosil hidrolasas en el metabolismo de carbohidratos en *L. plantarum*. Los azúcares alcohólicos, entre los que se incluye el glicerol, constituyen una fuente de energía que utilizan, sola o junto con otros carbohidratos, diversas especies de *Lactobacillus* (Veiga da Cunha y Foster, 1992; De Fátima Alvarez et al., 2004). El mutante en la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA) (*L. plantarum* WCFS1 Δ 0187) fue incapaz de utilizar glicerol,

aunque aumentó notablemente su capacidad para utilizar sorbitol y especialmente manitol. El mutante en la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_0906 (Pbg2) (*L. plantarum* WCFS1 Δ 0906) perdió la capacidad de utilizar dulcitol, pero aumentó su capacidad, de forma similar al mutante en la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA), para utilizar sorbitol y manitol. El mutante en la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_2777 (Pbg4) redujo notablemente su capacidad para utilizar glicerol, aunque ganó capacidad para utilizar adonitol, una característica que no tiene la cepa silvestre. Los mutantes en la β -D-galactosidasa Lp_3469 (LacA) y en la α -L-ramnosidasa Lp_3471 (Ram1) también adquirieron la capacidad de usar adonitol y aumentaron el uso de manitol respecto a la cepa silvestre (**Figura 37**). La variación observada en la utilización de estos polioles en los mutantes señala la importancia de las glicosil hidrolasas en la utilización de estos compuestos, algunos de los cuales se utilizan como edulcorantes hipocalóricos en alimentación y nutrición. Este conocimiento puede servir para modular mejor nuestra microbiota intestinal ya que algunos de estos polioles como el sorbitol actúan como prebióticos enriqueciendo selectivamente a algunos *Lactobacillus* en el intestino (Sarmiento-Rubiano et al., 2007). Además, debido a que la fermentación de estos compuestos produce ácidos grasos de cadena corta (SCFA), principalmente butirato, que tiene potenciales efectos preventivos en el cáncer de colón, el aumento de la fermentación de estos polioles puede ayudar al diseño de estrategias que conduzcan a un aumento en la producción de estos SCFA beneficiosos para la salud.

Por otro lado, la mutación de alguna de las glicosil hidrolasas estudiadas provocó cambios en la eficiencia de uso de ciertos ácidos orgánicos. Como se puede observar en el perfil fenotípico, *L. plantarum* WCFS1 es capaz de utilizar ácido glucónico, constituyendo una de las fuentes de energía más eficientes entre las 190 diferentes fuentes de carbono examinadas (**Figura 37**). Entre los mutantes ensayados el mutante en la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA) perdió su capacidad y los mutantes en la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_0906 (Pbg2) y en la α -L-ramnosidasa Lp_3471 (Ram1) redujeron notablemente la capacidad para utilizar este carbohidrato por lo que cabe especular que estas glicosil hidrolasas están implicadas en su uso. Estos dos últimos mutantes, *L. plantarum* WCFS1 Δ 0906 y *L. plantarum* WCFS1 Δ 3471 también tuvieron un

comportamiento similar en el uso del ácido galacturónico y junto con los mutantes en las α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA), α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA), β -D-galactosidasa Lp_3469 (LacA) y α -L-ramnosidasa Lp_3471 (Ram1), perdieron la capacidad que tiene la cepa silvestre para usar este componente mayoritario de las pectinas (**Figura 37**).

Los mutantes también mostraron huellas metabólicas con un perfil claro respecto a la utilización de nucleósidos. Las mutaciones en las α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA), 6-P- β -D-glucosidasa Lp_0906 (Pbg2) y α -L-ramnosidasa Lp_3471 (Ram1) disminuyeron o bien suprimieron (*lp_0187*) la utilización de los nucleósidos adenina, uridina e inosina (**Figura 37**). Estos resultados pueden indicar que la actividad nucleosidásica de *L. plantarum* WCFS1 puede estar directa o indirectamente afectada por las mencionadas mutaciones.

Finalmente, el consumo de Tween (la principal fuente de ácidos grasos en medios de laboratorio) y por consiguiente el metabolismo de ácidos grasos en *L. plantarum* WCFS1 también resultó afectado por las mutaciones en las glicosil hidrolasas estudiadas, aunque con efecto diferente. Mientras que en los mutantes en la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA) y 6-P- β -D-glucosidasa Lp_0906 (Pbg2) el consumo de Tween (20, 40 y 80) disminuyó notablemente respecto a la cepa silvestre, en los mutantes en la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_2777 (Pbg4), α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) y 6-P- β -D-glucosidasa Lp_3629 (Bgl) en los que, además, se observó un ligero aumento en la utilización de estos ácidos grasos (**Figura 37**). Este resultado podría ser esperable dada la interconexión del metabolismo de ácidos grasos y de carbohidratos en *L. plantarum* (Esteban-Torres et al., 2017) y podría estar causado por las distintas mutaciones en la síntesis de metabolitos implicados en la intersección de ambas rutas metabólicas.

Entre todos los mutantes ensayados la huella metabólica del mutante en la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA) (*L. plantarum* WCFS1 Δ 0187) es la que presenta un mayor número de capacidades metabólicas afectadas respecto a la cepa silvestre. Este mutante es el que presenta un número más elevado de alteraciones en las capacidades de utilización de monosacáridos, es el único que ha perdido la capacidad para utilizar el azúcar alcohólico glicerol e

incrementó su crecimiento en presencia de L-aspártico, una capacidad que no se observa en la cepa silvestre (**Figura 37**). Es destacable que este mutante es el único en el que se observó un aumento en la utilización de disacáridos constituyentes de polisacáridos vegetales (**Figura 37**). El amplio efecto observado como consecuencia de esta mutación puede ser debido a un efecto polar, pues adyacente al gen *lp_0187* se encuentra *lp_0188* un gen que se co-transcribe con *lp_0187* y que codifica un represor de la familia Lacl altamente similar al regulador global CcpA, lo que sugiere que la mutación, además de efectos locales, puede tener efectos más amplios sobre el metabolismo de *L. plantarum* (Chen et al., 2018). Se ha sugerido que en presencia de fructooligosacáridos (FOS) el regulador Lp_0188 (ScrR) mantiene su expresión a cierto nivel para ajustar la utilización de carbohidratos a su capacidad metabólica (Francke et al., 2008; Teixeira et al., 2013).

Para el mutante en la α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) de *L. plantarum* (WCFS1 Δ 0263), la proteína Lp_0263 (TreA) pura hidroliza trehalosa (disacárido de glucosa) y sacarosa (disacárido de glucosa y fructosa). El mutante presenta una capacidad disminuida para utilizar α -D-glucosa y D-fructosa, sin embargo, utiliza trehalosa con una eficiencia similar a la cepa silvestre. Es posible que otras proteínas similares presentes en el genoma de *L. plantarum* WCFS1, como por ejemplo la codificada por la proteína Lp_0193 (anotada en NCBI como trehalasa o exo alfa-1,4-glucosidasa), puedan presentar una actividad hidrolítica similar, explicando su capacidad para utilizar este disacárido. En cuanto a la sacarosa, la α -D-maltosidasa Lp_0187 (SacA) presenta actividad sacarasa y puede explicar el crecimiento del mutante en este sustrato. Este mutante fue el único capaz de utilizar maltitol, aunque con baja eficiencia (**Figura 37**).

En la huella metabólica del mutante en la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_2777 (Pbg4) (*L. plantarum* WCFS1 Δ 2777) destaca una característica única, su capacidad para utilizar glucógeno como fuente de carbono y además con alta eficiencia (**Figura 37**). Es posible que la pérdida de la actividad Lp_2777 (Pbg4) afecte a la eficacia para obtener glucosa y galactosa de polisacáridos vegetales, ya que la 6-P- β -D-glucosidasa Lp_2777 (Pbg4) presenta alta

actividad hacia los sustratos *p*-NF- β -D-glucopiranosido-6-P, *p*-NF- β -D-galactopiranosido-6-P y lactulosa (**Figura 36**) por lo que es posible que haya activado, por un mecanismo todavía desconocido, la capacidad de utilizar polímeros de mayor tamaño como el glucógeno para obtener monosacáridos.

El mutante en la β -D-glucosidasa Lp_3469 (LacA) (*L. plantarum* WCFS1 Δ 3469) mostró una capacidad alta para usar L-treonina y L-prolina, siendo el único mutante capaz de usar estos aminoácidos para mostrar crecimiento. En bacterias lácticas el metabolismo de carbohidratos y del nitrógeno están interrelacionados, al menos por el control del regulador global CcpA (Zomer et al., 2007). Es posible que la mutación en la β -D-glucosidasa Lp_3469 (LacA) afecte a este proceso de regulación, por mecanismos todavía desconocidos, y permita incrementar el crecimiento por asimilación de estos aminoácidos desde el medio. Como característica única en la huella metabólica de este mutante destaca su incapacidad para utilizar D-glucosamina, un comportamiento diferente al resto de mutantes y a cepa silvestre que sí pudieron utilizar eficazmente este monosacárido (**Figura 37**).

En resumen, este primer estudio fenotípico comparativo de mutantes que afectan a diferentes glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 revela las implicaciones que tienen estas actividades en el perfil de utilización de un amplio número de fuentes de carbono en este microorganismo. Cada mutante afecta a la utilización de diferentes monosacáridos generando su propia huella metabólica. Esto indica la importancia de las glicosil hidrolasas en la utilización de estos y otros monosacáridos observados que pueden proceder tanto de nichos vegetales como alimentarios. Estos perfiles fenotípicos reflejan asimismo la importancia de estas enzimas en la adaptación a varios nichos ecológicos entre los cuales *L. plantarum* migra frecuentemente (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). Por último, es importante destacar que la red regulatoria por la cual la actividad glicosídica de las enzimas estudiadas (mutadas) está interconectada e influye en el metabolismo del nitrógeno, el metabolismo de ácidos grasos y el metabolismo de carbohidratos permanece fuera del alcance de este primer estudio fenotípico comparativo, el cual sin embargo proporciona la base para conducir nuevas investigaciones ómicas.

3. Análisis *in silico* de la presencia o ausencia de glicosil hidrolasas en distintas cepas de *L. plantarum* y de otras especies incluidas en el grupo *plantarum*.

Los resultados obtenidos en apartados anteriores de esta tesis demuestran que *L. plantarum* WCFS1 presenta, al menos, once actividades glicosil hidrolíticas distintas. Estas actividades son α -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.22), α -D-glucosidasa (E.C 3.2.1.20), α -L-arabinosidasa (E.C 3.2.1.-), α -L-ramnosidasa (E.C 3.2.1.40), β -D-fucosidasa (E.C 3.2.1.38), β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.23), 6-fosfo- β -D-galactosidasa (E.C 3.2.1.85), 6-fosfo- β -D-glucosidasa (E.C 3.2.1.86), α -D-maltopentaosidasa (E.C 3.2.1.133), α -D-maltosidasa (E.C 3.2.1.1) y 6-fosfo- β -D-tioglucohidrolasa (E.C 3.2.1.147). Las glicosil hidrolasas que presentan estas actividades hidrolíticas se han caracterizado bioquímicamente en apartados anteriores de esta tesis.

L. plantarum es una especie de bacteria láctica que se encuentra en una amplia variedad de nichos, fundamentalmente aquellos con alto contenido en carbohidratos (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011), además de formar parte de manera natural de la microbiota del tracto gastrointestinal (Ahrné et al., 1998). Entre las distintas cepas de *L. plantarum* se ha observado una alta diversidad genética, por lo que en esta tesis se pretende conocer la presencia de las glicosil hidrolasas descritas en este trabajo en las diferentes cepas de *L. plantarum* y del grupo “*plantarum*” (*L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. fabifermentans* y *L. apodemi*) (Devi et al., 2016).

En el año 2003 se publicó por primera vez la secuencia completa del genoma de una cepa de *L. plantarum*, y fue el genoma de la cepa WCFS1 (Kleerebezem et al., 2003). Desde entonces se han secuenciado completamente los genomas de otras cuatro cepas, las cepas ZJ316 (Li, X. et al., 2013), 16 (Crowley et al., 2013), DSM 16365 (Bringel, 2005), DSM 10667 (Curk et al., 1996) y se dispone de la secuencia parcial de otras once cepas de *L. plantarum*, las cepas WJL (Kim, E et al., 2013), EGD-AQ4 (Qureshi et al., 2014), AY01 (Li X.R. et al., 2013), KCA1 (Anukam et al., 2013), MP-10

(Abriouel et al., 2016), IG1 (Maldonado-Barragan et al., 2011), ATCC 14917, DSM 20314, T30PCM01, DSM 21115 y DSM 16634.

El análisis de la presencia de las glicosil hidrolasas estudiadas en este trabajo en las cepas de *L. plantarum* y del grupo *plantarum* secuenciadas se muestra en la **Figura 38**. Destaca la ausencia en la cepa *L. apodemi* DSM 16634 de todas las glicosidasas estudiadas, a excepción de la 6-fosfo- β -D-glucosidasa Lp_3526 (Pbg10), a pesar de que en esta cepa se ha secuenciado ya la mitad de su genoma. En cambio, otras cepas en las que también se ha secuenciado sólo la mitad del genoma poseen 15 de las 20 glicosil hidrolasas estudiadas (*L. fabifermentans* T30PCM01 y *L. fabifermentans* DSM 21115) o bien poseen todas, a excepción de las 6-fosfo- β -D-glucosidasa Lp_0906 (Pbg2), como ocurre en la cepa *L. plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917^T. En la **Figura 38** se puede comprobar también que existen tres glicosidasas que están presentes en todas las cepas secuenciadas total o parcialmente, a excepción de *L. apodemi* DSM 16634. Estas glicosidasas son todas ellas 6-fosfo- β -D-glucosidasas, Lp_2777 (Pbg4), Lp_2778 (Pbg5) y Lp_3011 (Pbg6). Existen también cuatro glicosidasas que están presentes en todas las cepas analizadas, a excepción de la cepa *L. plantarum* WJL de la que sólo se dispone del 25% de su genoma, y son las α -D-maltosidasas Lp_0179 (Amy2) y Lp_2757, la α -D-glucosidasa Lp_0263 (TreA) y la α -L-arabinosidasa Lp_3469 (LacA). Ninguna de las dos cepas de *L. plantarum* cuyo genoma se ha secuenciado completamente, *L. plantarum* ZJ316 y *L. plantarum* 16, posee todas las glicosidasas estudiadas en esta tesis, las 6-fosfo- β -D-glucosidasas Lp_0906 (Pbg2), Lp_3132 (Pbg7) y Lp_3629 (Bgl), y la β -D-galactosidasa Lp_3469 (LacA) no están presentes en estas cepas. De manera similar, la cepa *L. paraplantarum* DSM 10667 secuenciada completamente carece de las α -L-ramnosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2) y de la 6-fosfo- β -D-glucosidasa Lp_3629 (Bgl). En la cepa *L. pentosus* DSM 20314 cuyo genoma se ha secuenciado completamente se encuentran ausentes las 6-fosfo- β -D-glucosidasas Lp_0906 (Pbg2), Lp_1401 (Pbg3), Lp_3132 (Pbg7), y Lp_3512 (Pbg8), la α -D-glucosidasa Lp_3220 (Agl4), y las α -L-ramnosidasas Lp_3471 (Ram1) y Lp_3473 (Ram2).

Varios estudios previos han descrito la alta diversidad genética existente entre las cepas de *L. plantarum* mediante diferentes enfoques fenotípicos (Cai et al., 2009; Siezen et al., 2010) y genotípicos, como polimorfismos en fragmentos amplificados (AFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Bringel et al., 1996; Torriani et al., 2001; Kleerebezem et al., 2003; Oh et al., 2010; Siezen et al., 2010; Siezen et al., 2011; Frese et al., 2011; Sun et al., 2015), tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Curk et al., 1996; De las Rivas et al., 2006; Makarova et al., 2006; Smokvina et al., 2013; Kafsi et al., 2014; Sun et al., 2015), e hibridación comparativa del genoma basado en micromatrices (CGH) (Torriani et al., 2001; Molenaar et al., 2005; Siezen et al., 2010). Estos enfoques permitieron la diferenciación de *L. plantarum* tanto a nivel inter- como intraespecífico y evidenciaron una posible relación entre el genoma y la adaptación o adecuación a varios nichos ecológicos (De las Rivas et al., 2005; Molenaar et al., 2005; De Vuyst et al., 2009; Siezen et al., 2010; Frese et al., 2011; Dutilh et al., 2013; Smokvina et al., 2013). El proceso de adaptación bacteriana a un nuevo hábitat se ha asociado con cambios tanto en el contenido, como en la regulación del genoma (Kleerebezem et al., 2003; Molenaar et al., 2005; Klarin et al., 2008; Cai et al., 2009; Siezen et al., 2010; Siezen et al., 2011).

Los resultados reflejados en la **Figura 38** confirman la enorme variabilidad genética encontrada entre las cepas de *L. plantarum* y también entre las especies incluidas en el grupo “*plantarum*” (*L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. fabifermentans* y *L. apodemii*). *L. plantarum* WCFS1 posee numerosas proteínas implicadas tanto en el transporte como en la utilización de carbohidratos, además de las correspondientes proteínas acompañantes regulatorias. Ello le permite crecer en numerosas fuentes de carbono (Martino et al., 2016).

A pesar del elevado número de especies incluidas en el género *Lactobacillus*, sólo unas pocas, entre ellas *L. plantarum*, incluyen cepas aisladas tanto de alimentos fermentados como del TGI humano (De Vries et al., 2006). La especie *L. plantarum* es una bacteria láctica muy versátil que se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos, (Kleerebezem et al.,

2003). Esta versatilidad es debida a la presencia de una alta capacidad metabólica para poder adaptarse a las diferentes condiciones de crecimiento en los diferentes sustratos. Esta alta capacidad de adaptación de la especie *L. plantarum* se refleja a su vez en una alta variabilidad intraespecífica, en ocasiones asociada a la capacidad para crecer en determinados hábitats ecológicos lo que genera diferencias en su metabolismo, como, por ejemplo, en el metabolismo de carbohidratos.

La disponibilidad desde el año 2003 de la secuencia completa del genoma de *L. plantarum* WCFS1 convierte a esta cepa en el modelo más adecuado para conocer los mecanismos moleculares que determinan la respuesta frente a los carbohidratos presentes en el medio, tanto en la fermentación de alimentos vegetales como en el TGI humano, permitiendo inferir así, en último término, los efectos beneficiosos que puede ejercer en la salud (Douillard y de Vos, 2014).

Cepas		%secuenciado	Lp_0179	Lp_0187	Lp_0263	Lp_0440	Lp_0906	Lp_1401	Lp_2757	Lp_2777	Lp_2778	Lp_3011	Lp_3132	Lp_3220	Lp_3469	Lp_3471	Lp_3473	Lp_3485	Lp_3512	Lp_3525	Lp_3526	Lp_3629	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	WCFS1	●																					
	ZJ316	●																					
	16	●																					
	subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917	◐																					
	subsp. <i>argentoratensis</i> DSM 16365	●																					
	WJL	◐																					
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	EGD-AQ4	◐																					
	AY01	◐																					
	DSM 10667	●																					
<i>Lactobacillus pentosus</i>	KCA1	◐																					
	DSM 20314	●																					
	MP-10	◐																					
	IG1	●																					
<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	T30PCM01	◐																					
	DSM 21115	◐																					
<i>Lactobacillus apodemi</i>	DSM 16634	◐																					
Total de cepas		16	14	12	14	9	4	8	14	15	15	15	6	7	12	4	4	12	10	14	15	8	

Figura 38. Presencia de las glicosil hidrolasas estudiadas en esta tesis en los genomas de algunas cepas de *L. plantarum* y grupo *plantarum* secuenciadas.

El análisis de la secuencia del genoma de la cepa *L. plantarum* WCFS1 permitió identificar 55 proteínas anotadas como “glicosil hidrolasas” (GH) y que posiblemente estaban implicadas en el metabolismo de carbohidratos, tanto en la síntesis como en la rotura de enlaces glicosídicos. Sin embargo, la mayoría de las proteínas presentes en las bases de datos no se han caracterizado experimentalmente. A pesar de que las estrategias de secuenciación se han ido perfeccionando en los últimos años, la práctica más común para asignar una función a una proteína continúa siendo su grado de homología con otras proteínas. Está admitido que las bases de datos contienen anotaciones erróneas en familias de enzimas que catalizan diferentes reacciones y que estos errores tienden a propagarse como consecuencia del rápido aumento de las secuencias depositadas en las bases de datos (Nielsen y Krogh, 2005; Vieites et al., 2009).

A la dificultad para predecir la función de una proteína, hay que añadir la enorme capacidad de las enzimas para adaptarse a nuevas funciones y catalizar muchas reacciones diferentes. Las proteínas tienen un enorme potencial para evolucionar, y pequeños cambios en su estructura pueden ocasionar importantes consecuencias catalíticas (White, 2006).

En esta tesis se ha realizado la caracterización fisicoquímica de un elevado número de las proteínas anotadas como glicosil hidrolasas en *L. plantarum* WCFS1 con objeto de conocer su actividad hidrolítica sobre enlaces glicosídicos específicos. Esta actividad hidrolítica en ocasiones ha coincidido con la actividad anotada, pero en otras ocasiones se ha comprobado que existía una anotación errónea o incompleta.

La identificación de la actividad bioquímica de estas glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 se ha intentado relacionar con el metabolismo de carbohidratos o con el crecimiento en diversas fuentes de carbono mostrado por esta cepa. Sin embargo, aunque se han construido cepas mutantes carentes de una determinada glicosil hidrolasa específica, ninguna de las mutaciones afectó notablemente a la capacidad de utilización de las fuentes de carbono metabolizadas por *L. plantarum* WCFS1. Por el contrario, las mutaciones si afectaron al perfil de utilización de algunos carbohidratos

(monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), carbohidratos alcohólicos, ácidos orgánicos, nucleósidos y ácidos grasos, entre otros.

Los variados perfiles fenotípicos observados en las cepas mutantes de *L. plantarum* WCFS1 reflejan la importancia de las glicosil hidrolasas en la adaptación a diversos y variados nichos ecológicos entre los cuales se puede encontrar *L. plantarum* frecuentemente (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011). Como ha quedado demostrado en este estudio, *L. plantarum* puede conseguir adaptarse a los diferentes hábitats mediante la ausencia y/o presencia en su genoma de determinados genes que codifican estas glicosil hidrolasas y que le confieren la capacidad para crecer en unas determinadas fuentes de carbono.

La realización de esta tesis ha contribuido a demostrar la compleja y variada batería de enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos que posee *L. plantarum* WCFS1 y la compleja red regulatoria por la cual la actividad glicosídica de las enzimas está interconectada e influye en el metabolismo de otros compuestos (nitrógeno, ácidos grasos, etc). Este estudio proporciona la base para estudios posteriores encaminados a completar la caracterización de las glicosil hidrolasas y su relevancia funcional en el metabolismo de *L. plantarum*.

Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

VII. ANEXOS

1. El estudio de utilización de posibles fuentes de carbono ha revelado que la cepa *L. plantarum* WCFS1 es capaz de utilizar 29 de las 190 fuentes de carbono ensayadas. Este perfil metabólico de *L. plantarum* es diferente a otros perfiles obtenidos en otras cepas de esta misma especie, lo que sugiere que *L. plantarum* es una especie que presenta una alta diversidad metabólica posiblemente originada por una alta diversidad genética.
2. Según la base de datos CAZy, *L. plantarum* WCFS1 posee 55 glicosil hidrolasas incluidas en 18 familias. En esta tesis se han conseguido hiperproducir de forma recombinante y en estado soluble 20 de esas proteínas que pertenecen a 6 familias: familia GH1, GH13, GH32, GH36, GH42 y GH78.
3. Los resultados obtenidos en esta tesis corroboran que las asignaciones de actividad en función de la secuencia de las proteínas deben ser verificadas experimentalmente. En este estudio se ha demostrado que la proteína Lp_3629 es una 6-P- β -glucosidasa y Lp_3525 además de presentar actividad 6-P- β -glucosidasa también tiene actividad 6-P- β -galactosidasa.
4. En esta tesis se ha comprobado que en ocasiones existe una anotación incompleta en lo que se refiere a las actividades hidrolíticas asignadas a las diferentes familias de glicosidasas en la base de datos CAZy. Así en la familia GH42 se debería incluir además la actividad β -D-fucosidasa que presenta Lp_3469.
5. Mediante el uso de carbohidratos derivados de *p*-NF, en este trabajo se han identificado 11 actividades glicosil hidrolasas distintas entre las 20 proteínas producidas (α -D-maltosidasa, α -D-glucosidasa, 6-P- β -D-glucosidasa, α -D-maltopentaosidasa, β -D-galactosidasa, β -D-fucosidasa, α -L-arabinosidasa, α -L-ramnosidasa, α -D-galactosidasa, 6-P- β -D-galactosidasa y 6-P- β -D-tioglucohidrolasa).

Conclusiones

6. El estudio de especificidad de sustrato, así como la caracterización fisicoquímica de las 20 glicosil hidrolasas analizadas demuestran que la existencia de una aparente redundancia bioquímica no implica necesariamente una redundancia funcional puesto que enzimas que presentan una misma actividad hidrolítica poseen un comportamiento fisicoquímico diferente. Además, no se pueden excluir diferencias en su expresión génica.

7. Los mutantes en diferentes glicosidasas de *L. plantarum* obtenidos en este estudio revelan la dificultad para relacionar la interrupción de un gen con la pérdida de una única actividad hidrolítica. Sin embargo, el hecho de que cada mutante presente una huella metabólica única sugiere la importancia de estas enzimas en la adaptación de *L. plantarum* a los diferentes nichos ecológicos.

Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

VII. ANEXOS

- Abriouel, H., Pérez Montoro, B., Casado Muñoz, M. del C., Lavilla Lerma, L., Hidalgo Pestaña, M., Caballero Gómez, N., Franz, C.M.A.P., Gálvez, A., Benomar, N., 2016. Complete genome sequence of a potential probiotic, *Lactobacillus pentosus* MP-10, isolated from fermented Alorea table olives. *Genome Announc.* 4. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00854-16>
- Acebrón, I., Curiel, J.A., de las Rivas, B., Muñoz, R., Mancheño, J.M., 2009. Cloning, production, purification and preliminary crystallographic analysis of a glycosidase from the food lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *Protein Expr. Purif.* 68, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.07.006>
- Acebrón, I., Plaza-Vinuesa, L., de las Rivas, B., Muñoz, R., Cumella, J., Sánchez-Sancho, F., Mancheño, J.M., 2017. Structural basis of the substrate specificity and instability in solution of a glycosidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1865, 1227–1236. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.07.007>
- Adams, M.R, Moss, M.O., 1997. *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, S. A. ISBN 978-84-200-0830-1
- Ahrné, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A.E., Molin, G., 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J. Appl. Microbiol.* 85, 88–94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00480.x>
- Alais, C., Linden, G., 1989. *Bioquímica de los alimentos*. Editorial Masson. ISBN 10: 0747600619 / ISBN 13: 9780747600619
- Andersson, U., Levander, F., Rådström, P., 2001. Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 276, 42707–42713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108279200>
- Anukam, K.C., Macklaim, J.M., Gloor, G.B., Reid, G., Boekhorst, J., Renckens, B., van Hijum, S.A.F.T., Siezen, R.J., 2013. Genome sequence of *Lactobacillus pentosus* KCA1: vaginal isolate from a healthy premenopausal woman. *PLoS ONE* 8, e59239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059239>
- Anzaldúa-Morales, A., 1994. *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Editorial Acribia. ISBN 978-84-200-0767-0

- Aparicio Vizueté, A., Ortega Anta, R.M., 2015. Efectos del consumo del beta-glucano de la avena sobre el colesterol sanguíneo: una revisión. *Rev. Esp. Nutr. Humana Dietética* 20, 127. <https://doi.org/10.14306/renhyd.20.2.183>
- Armisen, P., Mateo, C., Cortés, E., Barredo, J.L., Salto, F., Diez, B., Rodés, L., García, J.L., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 1999. Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. *J. Chromatogr. A* 848, 61–70. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00489-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00489-6)
- Arrecubieta, C., Garcia, E., López, R., 1995. Sequence and transcriptional analysis of a DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene* 167, 1–7. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00657-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00657-5)
- Auiewiriyankul, W., Saburi, W., Kato, K., Yao, M., Mori, H., 2018. Function and structure of GH13_31 α -glucosidase with high α -(1→4)-glucosidic linkage specificity and transglucosylation activity. *FEBS Lett.* 592, 2268–2281. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13126>
- Aukrust, T., Blom, H., 1992. Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Res. Int.* 25, 253–261. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90121-K](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90121-K)
- Ávila, M., Jaquet, M., Moine, D., Requena, T., Peláez, C., Arigoni, F., Jankovic, I., 2009. Physiological and biochemical characterization of the two α -L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245. *Microbiology* 155, 2739–2749. <https://doi.org/10.1099/mic.0.027789-0>
- Bachmann, H., Molenaar, D., Branco dos Santos, F., Teusink, B., 2017. Experimental evolution and the adjustment of metabolic strategies in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S201–S219. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux024>
- Beekwilder, J., Marcozzi, D., Vecchi, S., de Vos, R., Janssen, P., Francke, C., van Hylckama Vlieg, J., Hall, R.D., 2009. Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3447–3454. <https://doi.org/10.1128/AEM.02675-08>
- Belitz, H.D., Grosch, W., 1997. *Química de los alimentos*. 2ª ed. Editorial Acribia. ISBN 10: 8420011622 / ISBN 13: 9788420011622

- Bello Gutiérrez, J., 2000. Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos. Editorial Díaz de Santos. ISBN 10: 8479784474/ ISBN 13: 9788479784478
- Benavente, R., Pessela, B., Curiel, J., de las Rivas, B., Muñoz, R., Guisán, J., Mancheño, J., Cardelle-Cobas, A., Ruiz-Matute, A., Corzo, N., 2015. Improving properties of a novel β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* by covalent immobilization. *Molecules* 20, 7874–7889. <http://doi.org/10.3390/molecules20057874>
- Benthin, S., Nielsen, J., Villadsen, J., 1993. Two uptake systems for fructose in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 produce glycolytic and gluconeogenic fructose phosphates and induce oscillations in growth and lactic acid formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3206–3211
- Bojarová, P., Křen, V., 2009. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends Biotechnol.* 27, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.12.003>
- Bourgeois, C.M, Mésclé, J.F., Zueca, J., 1994. Microbiología alimentaria. Vol. 1. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Editorial Acribia. ISBN 978-84-200-0771-7
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bringel, F., 2005. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1629–1634. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63333-0>
- Bringel, F., Curk, M.C., Hubert, J.C., 1996. Characterization of lactobacilli by southern-type hybridization with a *Lactobacillus plantarum* pyrDFE probe. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 588–594. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-588>
- Bringel, F., Quénéé, P., Tailliez, P., 2001. Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 561–571. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00061>

- Brobst M.K., Lott E.C, 1966. Determination of some components in corn syrup by gas-liquid chromatography of the trimethylsilyl derivatives. *Cereal Chem* 43:35 - 42
- Brown, K.K., Hampton, M.B., 2011. Biological targets of isothiocyanates. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1810, 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.004>
- Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzynia, I., Bujacz, G., 2011. Crystal structures of the apo form of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose: crystal structure of *B. longum* β -fructofuranosidase. *FEBS J.* 278, 1728–1744. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08098.x>
- Bull, A.T., 2007. Sugar transport and metabolism in gram-positive bacteria edited by J. Reizer and A. Peterkofsky, Ellis Horwood, Chichester, 1987. pp. 441. ISBN 0-7458-0024-6. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 45, 164–165. <https://doi.org/10.1002/jctb.280450211>
- Burmeister, W.P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., Henrissat, B., 2000. High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J. Biol. Chem.* 275, 39385–39393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006796200>
- Buron-Moles, G., Chailyan, A., Dolejs, I., Forster, J., Mikš, M.H., 2019. Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 3135–3152. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09701-6>
- Cai, H., Thompson, R., Budinich, M.F., Broadbent, J.R., Steele, J.L., 2009. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome. Biol. Evol.* 1, 239–257. <https://doi.org/10.1093/gbe/evp019>
- Capaldo, A., Walker, M.E., Ford, C.M., Jiranek, V., 2011. β -Glucoside metabolism in *Oenococcus oeni*: cloning and characterisation of the phospho- β -glucosidase bgID. *Food Chem.* 125, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.036>
- Carrera-Silva, E.A., Silvestroni, A., LeBlanc, J.G., Piard, J.-C., de Giori, G.S., Sesma, F., 2006. A thermostable α -galactosidase from *Lactobacillus*

- fermentum* CRL722: genetic characterization and main properties. *Curr. Microbiol.* 53, 374–378. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0442-y>
- Ceapa, C., Lambert, J., van Limpt, K., Wels, M., Smokvina, T., Knol, J., Kleerebezem, M., 2015. Correlation of *Lactobacillus rhamnosus*: genotypes and carbohydrate utilization signatures determined by phenotype profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 5458–5470. <https://doi.org/10.1128/AEM.00851-15>
- Cheftel, J.C., Cheftel, H., 1999. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos Vols. 1 y 2, 3ª ed. Editorial Acribia. ISBN 978-84-200-0444-0
- Chen, C., Lu, Y., Wang, L., Yu, H., Tian, H., 2018. CcpA-dependent carbon catabolite repression regulates fructooligosaccharides metabolism in *Lactobacillus plantarum*. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01114>
- Chen, C., Zhou, F., Ren, J., Ai, L., Dong, Y., Wu, Z., Liu, Z., Chen, W., Guo, B., 2014. Cloning, expression and functional validation of a β -fructofuranosidase from *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochem.* 49, 758–767. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.02.013>
- Cimini, S., Di Paola, L., Giuliani, A., Ridolfi, A., De Gara, L., 2016. GH32 family activity: a topological approach through protein contact networks. *Plant Mol. Biol.* 92, 401–410. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0515-2>
- Coombs, J., Brenchley, J.E., 2001. Characterization of two new glycosyl hydrolases from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* strain BA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5094–5099. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5094-5099.2001>
- Crow, V.L., Thomas, T.D., 1984. Properties of a *Streptococcus lactis* strain that ferments lactose slowly. *J. Bacteriol.* 157, 28–34
- Crowley, S., Bottacini, F., Mahony, J., van Sinderen, D., 2013. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strain 16, a broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacterium. *Genome Announc.* 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00533-13>
- Cui, Z., Maruyama, Y., Mikami, B., Hashimoto, W., Murata, K., 2007. Crystal structure of glycoside hydrolase family 78 alpha-L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. GL1. *J. Mol. Biol.* 374, 384–398. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.003>

- Curiel, J.A., de las Rivas, B., Mancheño, J.M., Muñoz, R., 2011. The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expr. Purif.* 76, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.10.013>
- Curk, M.C., Hubert, J.C., Bringel, F., 1996. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 595–598. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-595>
- Davies, G., Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- De Cort, S., Kumara, H.M., Verachtert, H., 1994. Localization and characterization of alpha-glucosidase activity in *Lactobacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3074–3078
- De Fátima Alvarez, M., Medina, R., Pasteris, S.E., Strasser de Saad, A.M., Sesma, F., 2004. Glycerol metabolism of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469: cloning and expression of two glycerol kinase genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 170–181. <https://doi.org/10.1159/000079826>
- De las Rivas, B., Curiel, J.A., Mancheño, J.M., Muñoz, R., 2007. Expression vectors for enzyme restriction and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnol. Prog.* 23, 680–686. <https://doi.org/10.1021/bp060318g>
- De las Rivas, B., Marcobal, Á., Muñoz, R., 2006. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology* 152, 85–93. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28482-0>
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., 2006. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy. J.* 16, 1018–1028. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.003>
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S., 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough

- microbiota. *Food Microbiol.* 26, 666–675.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.012>
- Delgado, S., Flórez, A.B., Guadamuro, L., Mayo, B., 2017. Genetic and biochemical characterization of an oligo- α -1,6-glucosidase from *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 246, 32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.01.021>
- Delgado-Fernández, P., Plaza-Vinuesa, L., Hernández-Hernández, O., de las Rivas, B., Corzo, N., Muñoz, R., Moreno, F.J., 2019. Unravelling the carbohydrate specificity of MelA from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: an α -galactosidase displaying regioselective transgalactosylation. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.237>
- Derache, J., 1990. Toxicología y seguridad de los alimentos. Editorial Omega. ISBN: 9788428208536
- Devi, S.M., Aishwarya, S., Halami, P.M., 2016. Discrimination and divergence among *Lactobacillus plantarum*-group (LPG) isolates with reference to their probiotic functionalities from vegetable origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2016.09.005>
- Di Cagno, R., Minervini, G., Sgarbi, E., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., Gobetti, M., 2010. Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 246–253.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.018>
- Díez-Municio, M., Herrero, M., Olano, A., Moreno, F.J., 2014. Synthesis of novel bioactive lactose-derived oligosaccharides by microbial glycoside hydrolases. *Microb. Biotechnol.* 7, 315–331. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12124>
- Douillard, F.P., de Vos, W.M., 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell. Fact.* 13, S8.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S8>
- Dupin, H., Cuq J.L., Malewiak M.I., Leynaud-Rouaud, C., Berthier A-M., 1997 La alimentación humana. Editorial Bellaterra. ISBN-10: 8472900886/ISBN-13: 978-8472900882

- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., Gibbs, R.A., Csörgő, B., Pósfai, G., Weinstock, G.M., Blattner, F.R., 2008. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* 190, 2597–2606. <https://doi.org/10.1128/JB.01695-07>
- Dutilh, B.E., Backus, L., Edwards, R.A., Wels, M., Bayjanov, J.R., van Hijum, S.A.F.T., 2013. Explaining microbial phenotypes on a genomic scale: GWAS for microbes. *Brief. Funct. Genomics.* 12, 366–380. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elt008>
- Eley, R., 1994. Intoxicaciones alimentarias de etiología alimentaria. Editorial Acribia. ISBN 978-84-200-0762-5
- Esteban-Torres, M., Reverón, I., Plaza-Vinuesa, L., de las Rivas, B., Muñoz, R., López de Felipe, F., 2017. Transcriptional reprogramming at genome-scale of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in response to olive oil challenge. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00244>
- Evanovich, E., de Souza Mendonça Mattos, P.J., Guerreiro, J.F., 2019. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: an overview. *Int. J. Genomics* 2019, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/4973214>
- Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K.K., Talalay, P., Lozniewski, A., 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7610–7615. <https://doi.org/10.1073/pnas.112203099>
- Fahey, J.W., Wade, K.L., Wehage, S.L., Holtzclaw, W.D., Liu, H., Talalay, P., Fuchs, E., Stephenson, K.K., 2017. Stabilized sulforaphane for clinical use: phytochemical delivery efficiency. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1600766. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600766>
- Fath, M.J., Kolter, R., 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995–1017
- Fennema, O.R., 1993. Química de los alimentos. Editorial Acribia. ISBN 978-84-200-1142-4

- Fernández, M., Margolles, A., Suárez, J.E., Mayo, B., 1999. Duplication of the β -galactosidase gene in some *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 48, 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00031-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00031-8)
- Francke, C., Kerkhoven, R., Wels, M., Siezen, R.J., 2008. A generic approach to identify transcription factor-specific operator motifs; Inferences for LacI-family mediated regulation in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *BMC Genomics* 9, 145. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-145>
- Fredslund, F., Abou Hachem, M., Jonsgaard Larsen, R., Gerd Sørensen, P., Coutinho, P.M., Lo Leggio, L., Svensson, B., 2011. Crystal structure of α -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: insight into tetramer formation and substrate binding. *J. Mol. Biol.* 412, 466–480. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.057>
- Freer, S.N., 1993. Purification and characterization of the extracellular α -amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1398–1402
- Frese, S.A., Benson, A.K., Tannock, G.W., Loach, D.M., Kim, J., Zhang, M., Oh, P.L., Heng, N.C.K., Patil, P.B., Juge, N., MacKenzie, D.A., Pearson, B.M., Lapidus, A., Dalin, E., Tice, H., Goltsman, E., Land, M., Hauser, L., Ivanova, N., Kyrpides, N.C., Walter, J., 2011. The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. *PLoS Genet* 7, e1001314. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001314>
- Gänzle, M.G., Follador, R., 2012. Metabolism of oligosaccharides and starch in *lactobacilli*: a review. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00340>
- Garro, M.S., de Giori, G.S., de Valdez, G.F., Oliver, G., 1993. Characterization of α -galactosidase from *Lactobacillus fermentum*. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 485–488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02805.x>
- Giraud, E., Champailier, A., Raimbault, M., 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4319–4323
- Gloster, T.M., Turkenburg, J.P., Potts, J.R., Henrissat, B., Davies, G.J., 2008. Divergence of catalytic mechanism within a glycosidase family provides insight into evolution of carbohydrate metabolism by human gut flora.

- Chem. Biol. 15, 1058–1067.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.09.005>
- Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R., 2015. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 6, 137–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015706>
- Gote, M.M., Khan, M.I., Gokhale, D.V., Bastawde, K.B., Khire, J.M., 2006. Purification, characterization and substrate specificity of thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* (NCIM-5146). *Process Biochem.* 41, 1311–1317. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.003>
- Hanssen, M., Marsden, J., 1984. "E" para aditivos. Guía completa de números "E". Editorial Edaf
- Hammes, W., Schleifer, K.H., Kandler, O., 1973. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 116, 1029–1053
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hashimoto, W., Miyake, O., Nankai, H., Murata, K., 2003. Molecular identification of an α -L-rhamnosidase from *Bacillus* sp. strain GL1 as an enzyme involved in complete metabolism of gellan. *Arch. Biochem. Biophys.* 415, 235–244. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00231-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00231-5)
- Helfert, C., Gotsche, S., Dahl, M.K., 1995. Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalysed by a phospho-alpha-(1-1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. *Mol. Microbiol.* 16, 111–120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02396.x>
- Henrissat, B., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280, 309–316. <https://doi.org/10.1042/bj2800309>
- Henrissat, B., Bairoch, A., 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293, 781–788. <https://doi.org/10.1042/bj2930781>
- Henrissat, B., Bairoch, A., 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316, 695–696. <https://doi.org/10.1042/bj3160695>

- Hernández, M., Sastre, A., 1999. Tratado de nutrición. Editorial Díaz de Santos. ISBN-10: 8479783877/ISBN-13: 978-8479783877
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D., Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 342, 1007–1011. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92876-U](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92876-U)
- Holzapfel, W.H.N., Wood, B.J.B., 1995. The genera of lactic acid bacteria, the lactic acid bacteria. Springer US
- Honda, H., Nagaoka, S., Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Kitazawa, H., Saito, T., 2012. Purification and characterization of two phospho- β -galactosidases, LacG1 and LacG2, from *Lactobacillus gasseri* ATCC33323^T. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58, 11–17. <http://doi.org/10.2323/jgam.58.11>
- Hung, M.N., Xia, Z., Hu, N.T., Lee, B.H., 2001. Molecular and biochemical analysis of two β -galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4256–4263. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4256-4263.2001>
- Inouye, S., Inouye, M., 1985. Up-promoter mutations in the *lpp* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 13, 3101–3110. <https://doi.org/10.1093/nar/13.9.3101>
- Iqbal, S., Nguyen, T.H., Nguyen, T.T., Maischberger, T., Haltrich, D., 2010. β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, Special issue: selected papers from the 15th European carbohydrate symposium, Vienna 2009 345, 1408–1416. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.03.028>
- Jancarik, J., Kim, S.H., 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409–411. <https://doi.org/10.1107/S0021889891004430>
- Janeček, Š., Svensson, B., MacGregor, E.A., 2014. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1149–1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>
- Jeon, H., Lee, H., Byun, D., Choi, H., Shim, J.-H., 2015. Molecular cloning, characterization, and application of a novel thermostable α -glucosidase

- from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum* strain IM2. *Food Sci. Biotechnol.* 24, 175–182. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0024-0>
- Jeon, H.Y., Kim, N.R., Lee, H.W., Choi, H.J., Choung, W.J., Koo, Y.S., Ko, D.S., Shim, J.H., 2016. Characterization of a novel maltose-forming α -amylase from *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ST-III. *J. Agric. Food Chem.* 64, 2307–2314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05892>
- Jones, M.T., Mahler, H.C., Yadav, S., Bindra, D., Corvari, V., Fesinmeyer, R.M., Gupta, K., Harmon, A.M., Hinds, K.D., Koulov, A., Liu, W., Maloney, K., Wang, J., Yeh, P.Y., Singh, S.K., 2018. Considerations for the use of polysorbates in biopharmaceuticals. *Pharm. Res.* 35. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2430-5>
- Kafsi, H., Binesse, J., Loux, V., Buratti, J., Boudebouze, S., Dervyn, R., Kennedy, S., Galleron, N., Quinquis, B., Batto, J.-M., Moumen, B., Maguin, E., van de Guchte, M., 2014. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. *BMC Genomics* 15, 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-407>
- Kang, M.S., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A., 2009. The first alpha-1,3-glucosidase from bacterial origin belonging to glycoside hydrolase family 31. *Biochimie* 91, 1434–1442. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.07.018>
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Nguyen, T.H., Haltrich, D., Khanongnuch, C., 2015. Characterization of a maltose-forming α -amylase from an amylolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 120, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.010>
- Kim, E.K., Park, Y.M., Lee, O.Y., Lee, W.J., 2013. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strain WJL, a *Drosophila* gut symbiont. *Genome Announc.* 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00937-13>
- Kim, N.R., Jeong, D.W., Ko, D.S., Shim, J.H., 2017. Characterization of novel thermophilic alpha-glucosidase from *Bifidobacterium longum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 594–599. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.009>
- Kim, S., Park, H., Choi, J., 2017. Cloning and characterization of cold-adapted α -amylase from Antarctic *Arthrobacter agilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 1048–1059. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2267-5>

- Kittibunchakul, S., Pham, M.L., Tran, A.M., Nguyen, T.H., 2019. β -galactosidase from *Lactobacillus helveticus* DSM 20075: biochemical characterization and recombinant expression for applications in dairy industry. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 947. <https://doi.org/10.3390/ijms20040947>
- Klarin, B., Molin, G., Jeppsson, B., Larsson, A., 2008. Use of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 299 to reduce pathogenic bacteria in the oropharynx of intubated patients: a randomised controlled open pilot study. *Crit Care* 12, R136. <https://doi.org/10.1186/cc7109>
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1990–1995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337704100>
- Koshland, D.E., 1956. Molecular geometry in enzyme action. *J. Cell. Comp. Physiol.* 47, 217–234. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030470415>
- Kuriki, T., Imanaka, T., 1999. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 557–565. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80114-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80114-5)
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Sanders, S.A., Reinking, J., Savchenko, A., Arrowsmith, C.H., Edwards, A.M., Yakunin, A.F., 2005. Enzyme genomics: application of general enzymatic screens to discover new enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 263–279. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2004.12.006>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lambert, J.M., Bongers, R.S., Kleerebezem, M., 2007. Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1126–1135. <https://doi.org/10.1128/AEM.01473-06>
- Landete, J.M., Curiel, J.A., Rodríguez, H., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2014. Aryl glycosidases from *Lactobacillus plantarum* increase antioxidant activity of

- phenolic compounds. *J. Funct. Foods* 7, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.028>
- LeBlanc, J.G., Silvestroni, A., Connes, C., Juillard, V., de Giori, G.S., Piard, J.-C., Sesma, F., 2004. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce alpha-galactosidase. *Genet. Mol. Res. GMR* 3, 432–440
- Lee, Hee-Seob, Kim, M.S., Cho, H.S., Kim, J.I., Kim, T.J., Choi, J.H., Park, C., Lee, Heung-Soo, Oh, B.H., Park, K.H., 2002. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J. Biol. Chem.* 277, 21891–21897. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201623200>
- Li, B.C., Zhang, T., Li, Y.Q., Ding, G.B., 2019. Target discovery of novel α -L-rhamnosidases from human fecal metagenome and application for biotransformation of natural flavonoid glycosides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 189, 1245–1261. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03063-5>
- Li, K.B., Chan, K.Y., 1983. Production and properties of alpha-glucosidase from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1380–1387
- Li, X., Gu, Q., Lou, X., Zhang, X., Song, D., Shen, L., Zhao, Y., 2013. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus plantarum* strain ZJ316. *Genome Announc.* 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00094-13>
- Li, X.R., Gong, F.-M., Zheng, H.J., Zhang, Z.H., Luo, Y.Y., Liu, C.J., 2013. Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* strain AY01, isolated from the raw material of fermented goat milk cheese. *Genome Announc.* 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00737-13>
- Liao, X., Huang, J., Zhou, Q., Guo, L., Lin, J., You, L., Liu, S., Yang, J., 2017. Designing of a novel β -galactosidase for production of functional oligosaccharides. *Eur. Food Res. Technol.* 243, 979–986. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2813-y>
- Lin, M.G., Chi, M.C., Naveen, V., Li, Y.C., Lin, L.L., Hsiao, C.D., 2016. *Bacillus licheniformis* trehalose-6-phosphate hydrolase structures suggest keys to substrate specificity. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 72, 59–70. <https://doi.org/10.1107/S2059798315020756>
- Lin, Q., Wang, S., Wang, M., Cao, R., Zhang, R., Zhan, R., Wang, K., 2019. A novel glycoside hydrolase family 42 enzyme with bifunctional β -

- galactosidase and α -L-arabinopyranosidase activities and its synergistic effects with cognate glycoside hydrolases in plant polysaccharides degradation. *Int. J. Biol. Macromol.* 140, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.037>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Mahn, A., Angulo, A., Cabañas, F., 2014. Purification and characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) myrosinase (β -thioglucosidase glucohydrolase). *J. Agric. Food Chem.* 62, 11666–11671. <https://doi.org/10.1021/jf504957c>
- Majzlová, K., Pukajová, Z., Janeček, Š., 2013. Tracing the evolution of the α -amylase subfamily GH13_36 covering the amylolytic enzymes intermediate between oligo-1,6-glucosidases and neopullulanases. *Carbohydr. Res.* 367, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.11.022>
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Maldonado-Barragan, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padros, H., Ruiz-Barba, J.L., 2011. Genome sequence of *Lactobacillus pentosus* IG1, a strain isolated from Spanish-style green olive fermentations. *J. Bacteriol.* 193, 5605–5605. <https://doi.org/10.1128/JB.05736-11>
- Marasco, R., Salatiello, I., De Felice, M., Sacco, M., 2000. A physical and functional analysis of the newly-identified *bglGPT* operon of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 269–273. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09116.x>

- Martino, M.E., Bayjanov, J.R., Caffrey, B.E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., Hijum, V., A.f.t, S., Leulier, F., 2016. Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environ. Microbiol.* 18, 4974–4989. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13455>
- Martinovičová, M., Janeček, Š., 2018. In silico analysis of the α -amylase family GH57: eventual subfamilies reflecting enzyme specificities. *3 Biotech* 8, 307. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1325-9>
- Matsarskaia, O., Roosen-Runge, F., Lotze, G., Möller, J., Mariani, A., Zhang, F., Schreiber, F., 2018. Tuning phase transitions of aqueous protein solutions by multivalent cations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 27214–27225. <https://doi.org/10.1039/C8CP05884A>
- Mayo, B., González, B., Arca, P., Suárez, J.E., 1994. Cloning and expression of the plasmid encoded beta-D-galactosidase gene from a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 122, 145–151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07157.x>
- Mayo, B., Sinderen, D., Ventura, M., 2008. Genome analysis of food grade lactic acid-producing bacteria: from basics to applications. *Curr. Genomics* 9, 169–183. <https://doi.org/10.2174/138920208784340731>
- Mendoza-Llerenas, E.O., Pérez, D.J., Gómez-Sandoval, Z., Escalante-Minakata, P., Ibarra-Junquera, V., Razo-Hernández, R.S., Capozzi, V., Russo, P., Spano, G., Fiocco, D., Osuna-Castro, J.A., Moreno, A., 2016. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 β -Fructosidase: evidence for an open funnel-like channel through the catalytic domain with importance for the substrate selectivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180, 1056–1075. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2152-2>
- Menon, R., Munjal, N., Sturino, J.M., 2015. Characterization of amygdalin-degrading *Lactobacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* 118, 443–453. <https://doi.org/10.1111/jam.12704>
- Mi, L., Di Pasqua, A.J., Chung, F.-L., 2011. Proteins as binding targets of isothiocyanates in cancer prevention. *Carcinogenesis* 32, 1405–1413. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr111>
- Michalska, K., Tan, K., Li, H., Hatzos-Skintges, C., Bearden, J., Babnigg, G., Joachimiak, A., 2013. GH1-family 6-P- β -glucosidases from human

- microbiome lactic acid bacteria. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 451–463. <https://doi.org/10.1107/S0907444912049608>
- Michlmayr, H., Brandes, W., Eder, R., Schümann, C., del Hierro, A.M., Kulbe, K.D., 2011. Characterization of two distinct glycosyl hydrolase family 78 α -L-rhamnosidases from *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6524–6530. <https://doi.org/10.1128/AEM.05317-11>
- Michlmayr, H., Kneifel, W., 2014. β -Glucosidase activities of lactic acid bacteria: mechanisms, impact on fermented food and human health. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 1–10. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12348>
- Mital, B.K., Shallenberger, R.S., Steinkraus, K.H., 1973. Alpha-galactosidase activity of lactobacilli. *Appl. Microbiol.* 26, 783–788
- Møller, M.S., Fredslund, F., Majumder, A., Nakai, H., Poulsen, J.-C.N., Lo Leggio, L., Svensson, B., Abou Hachem, M., 2012. Enzymology and structure of the GH13_31 glucan 1,6- α -glucosidase that confers isomaltooligosaccharide utilization in the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *J. Bacteriol.* 194, 4249–4259. <https://doi.org/10.1128/JB.00622-12>
- Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F.H., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kleerebezem, M., 2005. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *JB* 187, 6119–6127. <https://doi.org/10.1128/JB.187.17.6119-6127.2005>
- Morlon-Guyot, J., Mucciolo-Roux, F., Sanoja, R.R., Guyot, J.P., 2001. Characterization of the *L. manihotivorans* α -amylase gene. *DNA Sequence* 12, 27–37. <https://doi.org/10.3109/10425170109042048>
- Mullaney, J.A., Kelly, W.J., McGhie, T.K., Ansell, J., Heyes, J.A., 2013. Lactic acid bacteria convert glucosinolates to nitriles efficiently yet differently from *Enterobacteriaceae*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3039–3046. <https://doi.org/10.1021/jf305442j>
- Nelson, C.E., Rogowski, A., Morland, C., Wilhide, J.A., Gilbert, H.J., Gardner, J.G., 2017. Systems analysis in *Cellvibrio japonicus* resolves predicted redundancy of β -glucosidases and determines essential physiological functions: functional analysis of *C. japonicus* β -glucosidases. *Mol. Microbiol.* 104, 294–305. <https://doi.org/10.1111/mmi.13625>

- Neves, A., Pool, W., Kok, J., Kuipers, O., Santos, H., 2005. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis*. The input from in vivo NMR. FEMS Microbiol. Rev. 29, 531–554. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.005>
- Nguyen, T.T., Nguyen, T.H., Maischberger, T., Schmelzer, P., Mathiesen, G., Eijsink, V.G., Haltrich, D., Peterbauer, C.K., 2011. Quantitative transcript analysis of the inducible expression system pSIP: comparison of the overexpression of *Lactobacillus* spp. β -galactosidases in *Lactobacillus plantarum*. Microb. Cell Fact. 10, 46. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-46>
- Nielsen, P., Krogh, A., 2005. Large-scale prokaryotic gene prediction and comparison to genome annotation. Bioinformatics 21, 4322–4329. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti701>
- Oh, K.W., Kim, M.J., Kim, H.Y., Kim, B.Y., Baik, M.Y., Auh, J.H., Park, C.S., 2005. Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 252, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.050>
- Oh, P.L., Benson, A.K., Peterson, D.A., Patil, P.B., Moriyama, E.N., Roos, S., Walter, J., 2010. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. ISME J 4, 377–387. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.123>
- O'Neill, E.C., Stevenson, C.E.M., Paterson, M.J., Rejzek, M., Chauvin, A.L., Lawson, D.M., Field, R.A., 2015. Crystal structure of a novel two domain GH78 family α -rhamnosidase from *Klebsiella oxytoca* with rhamnose bound: crystal structure of the GH78 family rhamnosidase. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 83, 1742–1749. <https://doi.org/10.1002/prot.24807>
- Otzen, D., 2011. Protein–surfactant interactions: a tale of many states. Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics 1814, 562–591. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.003>
- Outtrup, H., Norman, B.E., 1984. Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of *Bacillus* modified by recombinant-DNA techniques. Starch - Stärke 36, 405–411. <https://doi.org/10.1002/star.19840361202>

- Palop, M.L., Smiths, J.P., ten Brink, B., 1995. Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 219–229. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00123-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00123-2)
- Panwar, D., Shubhashini, A., Chaudhari, S.R., Prashanth, K.V.H., Kapoor, M., 2020. GH36 α -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1 synthesizes gal- α -1,6 linked prebiotic α -galactooligosaccharide by transglycosylation. *Int. J. Biol. Macromol.* 144, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.032>
- Park, K.H., Kim, T.J., Cheong, T.K., Kim, J.W., Oh, B.H., Svensson, B., 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1478, 165–185. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00041-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00041-8)
- Petrov, K., Urshev, Z., Petrova, P., 2008. L-(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiol.* 25, 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.02.005>
- Plaza-Vinuesa, L., Hernández-Hernández, O., Moreno, F.J., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2019. Unravelling the diversity of glycoside hydrolase family 13 α -amylases from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microb. Cell Factories* 18. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1237-3>
- Pons, T., Naumoff, D.G., Martínez-Fleites, C., Hernández, L., 2004. Three acidic residues are at the active site of a β -propeller architecture in glycoside hydrolase families 32, 43, 62, and 68. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 54, 424–432. <https://doi.org/10.1002/prot.10604>
- Pons, T., Olmea, O., China, G., Beldarraín, A., Márquez, G., Acosta, N., Rodríguez, L., Valencia, A., 1998. Structural model for family 32 of glycosyl-hydrolase enzymes. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 33, 383–395. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(19981115\)33:3<383:aid-prot7>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(19981115)33:3<383:aid-prot7>3.0.co;2-r)
- Poolman, B., 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 125–147. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00015.x>
- Postma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R., 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543–594

- Qureshi, A., Itankar, Y., Ojha, R., Mandal, M., Khardenavis, A., Kapley, A., Purohit, H.J., 2014. Genome sequence of *Lactobacillus plantarum* EGD-AQ4, isolated from fermented product of Northeast India. *Genome Announc.* 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01122-13>
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 104, S1–S63. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>
- Rozès, N., Peres, C., 1998. Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 108–111. <https://doi.org/10.1007/s002530051145>
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual: Vol. 2*, 2. ed. Cold Spring Harbor, S.I. ISBN 978-1-936113-41-5
- Sarmiento-Rubiano, L.A., Zúñiga, M., Pérez-Martínez, G., Yebra, M.J., 2007. Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Res. Microbiol.* 158, 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.007>
- Sathya, T.A., Khan, M., 2014. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry: diversity of glycosyl hydrolase enzymes. *J. Food Sci.* 79, R2149–R2156. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12677>
- Saulnier, D.M.A., Molenaar, D., de Vos, W.M., Gibson, G.R., Kolida, S., 2007. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1753–1765. <https://doi.org/10.1128/AEM.01151-06>
- Schmid, J., Heider, D., Wendel, N.J., Sperl, N., Sieber, V., 2016. Bacterial glycosyltransferases: challenges and opportunities of a highly diverse enzyme class toward tailoring natural products. *Front. Microbiol.* 7, 182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00182>
- Schwab, C., Sørensen, K.I., Gänzle, M.G., 2010. Heterologous expression of glycoside hydrolase family 2 and 42 β -galactosidases of lactic acid

- bacteria in *Lactococcus lactis*. Syst. Appl. Microbiol. 33, 300–307.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.07.002>
- Shibata, K., Flores, D.M., Kobayashi, G., Sonomoto, K., 2007. Direct L-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. Enz. Microb. Technol. 41, 149–155.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.020>
- Siezen, R.J., Tzeneva, V.A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H.T.K., Rademaker, J.L.W., Starrenburg, M.J.C., Kleerebezem, M., Molenaar, D., van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2010. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. Environ. Microbiol. 12, 758–773. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02119.x>
- Siezen, R.J., van Hylckama Vlieg, J.E., 2011. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. Microb. Cell Fact. 10, S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S3>
- Silvestroni, A., Connes, C., Sesma, F., Giori, G.S. de, Piard, J.C., 2002. Characterization of the *melA* locus for α -galactosidase in *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5464–5471.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5464-5471.2002>
- Smokvina, T., Wels, M., Polka, J., Chervaux, C., Brisse, S., Boekhorst, J., Vlieg, J.E.T. van H., Siezen, R.J., 2013. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. PLoS ONE 8, e68731.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068731>
- Souza, P.M., Magalhães, P.O., 2010. Application of microbial α -amylase in industry. A review. Braz. J. Microbiol. 41, 850–861.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Stam, M.R., Danchin, E.G.J., Rancurel, C., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2006. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of alpha-amylase-related proteins. Protein. Eng. Des. Sel. 19, 555–562.
<https://doi.org/10.1093/protein/gzl044>
- Stepper, J., Dabin, J., Eklof, J.M., Thongpoo, P., Kongsaree, P., Taylor, E.J., Turkenburg, J.P., Brumer, H., Davies, G.J., 2013. Structure and activity of

- the *Streptococcus pyogenes* family GH1 6-phospho- β -glucosidase SPy1599. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 16–23. <https://doi.org/10.1107/S0907444912041005>
- Structural Genomics Consortium, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, Joint Center for Structural Genomics, Midwest Center for Structural Genomics, New York Structural GenomiX Research Center for Structural Genomics, Northeast Structural Genomics Consortium, Oxford Protein Production Facility, Protein Sample Production Facility, Max Delbrück Center for Molecular Medicine, RIKEN Structural Genomics/Proteomics Initiative, SPINE2-Complexes, 2008. Protein production and purification. *Nat. Methods* 5, 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
- Stryer, L., Mark Verg, J., L.Tymoczko J., 2013. *Bioquímica*. Editorial Reverté, S. A., ISBN: 978-84-291-7602-5
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W., 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60–89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85008-c](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85008-c)
- Sun, Z., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, J.C., Kagawa, T.F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M.C., O’Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F.P., Paul Ross, R., Yang, R., Briner, A.E., Felis, G.E., de Vos, W.M., Barrangou, R., Klaenhammer, T.R., Caufield, P.W., Cui, Y., Zhang, H., O’Toole, P.W., 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat. Commun.* 6, 8322. <https://doi.org/10.1038/ncomms9322>
- Suzuki, H., Okazaki, F., Kondo, A., Yoshida, K., 2013. Genome mining and motif modifications of glycoside hydrolase family 1 members encoded by *Geobacillus kaustophilus* HTA426 provide thermostable 6-phospho- β -glucosidase and β -fucosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2929–2938. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4168-z>

- Suzuki, M., Saito, T., Itoh, T., 1996. Purification and characterization of 6-phospho-beta-galactosidase from *Lactobacillus gasseri* JCM 1031. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 139–141. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.139>
- Taboada, B., Ciria, R., Martinez-Guerrero, C.E., Merino, E., 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res.* 40, D627-631. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1020>
- Tamura, C., Matsushita, O., 1992. Melibiose transport system in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiol. Immunol.* 36, 1119–1128. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02116.x>
- Teixeira, J.S., Abdi, R., Su, M.S.W., Schwab, C., Gänzle, M.G., 2013. Functional characterization of sucrose phosphorylase and scrR, a regulator of sucrose metabolism in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiol.* 36, 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.011>
- Thomas, T.D., Turner, K.W., Crow, V.L., 1980. Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products, and regulation. *J. Bacteriol.* 144, 672–682
- Thompson, J., 1979. Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: phosphorylation of galactose and glucose moieties in vivo. *J. Bacteriol.* 140, 774–785
- Thompson, J., 2002. Purification and some properties of phospho-beta-galactosidase from the Gram-negative oral bacterium *Leptotrichia buccalis* ATCC 14201. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11344.x>
- Thompson, J., Chassy, B.M., Egan, W., 1985. Lactose metabolism in *Streptococcus lactis*: studies with a mutant lacking glucokinase and mannose-phosphotransferase activities. *J. Bacteriol.* 162, 217–223. <https://doi.org/10.1128/JB.162.1.217-223.1985>
- Thompson, J., Saier, M.H., 1981. Regulation of methyl-beta-D-thiogalactopyranoside-6-phosphate accumulation in *Streptococcus lactis* by exclusion and expulsion mechanisms. *J. Bacteriol.* 146, 885–894
- Tiels, P., Baranova, E., Piens, K., De Visscher, C., Pynaert, G., Nerinckx, W., Stout, J., Fudalej, F., Hulpiaw, P., Tännler, S., Geysens, S., Van Hecke, A., Valevska, A., Vervecken, W., Remaut, H., Callewaert, N., 2012. A bacterial glycosidase enables mannose-6-phosphate modification and

- improved cellular uptake of yeast-produced recombinant human lysosomal enzymes. *Nat. Biotechnol.* 30, 1225–1231. <https://doi.org/10.1038/nbt.2427>
- Torriani, S., Clementi, F., Vancanneyt, M., Hoste, B., Dellaglio, F., Kersters, K., 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 554–560. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00071>
- Tzortzis, G., Jay, A.J., Baillon, M.L.A., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2003. Synthesis of α -galactooligosaccharides with α -galactosidase from *Lactobacillus reuteri* of canine origin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 286–292. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1426-0>
- van den Broek, L.A.M., Hinz, S.W.A., Beldman, G., Vincken, J.-P., Voragen, A.G.J., 2008. *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 146–163. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700121>
- Veiga da Cunha, M., Foster, M.A., 1992. Sugar-glycerol cofermentations in lactobacilli: the fate of lactate. *J. Bacteriol.* 174, 1013–1019. <https://doi.org/10.1128/jb.174.3.1013-1019.1992>
- Viborg, A.H., Fredslund, F., Katayama, T., Nielsen, S.K., Svensson, B., Kitaoka, M., Lo Leggio, L., Abou Hachem, M., 2014. A β 1-6/ β 1-3 galactosidase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B I-04 gives insight into sub-specificities of β -galactoside catabolism within *Bifidobacterium*. *Mol. Microbiol.* 94, 1024–1040. <https://doi.org/10.1111/mmi.12815>
- Viborg, A.H., Katayama, T., Arakawa, T., Abou Hachem, M., Lo Leggio, L., Kitaoka, M., Svensson, B., Fushinobu, S., 2017. Discovery of α -L-arabinopyranosidases from human gut microbiome expands the diversity within glycoside hydrolase family 42. *J. Biol. Chem.* 292, 21092–21101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.792598>
- Vieites, J.M., Guazzaroni, M.E., Beloqui, A., Golyshin, P.N., Ferrer, M., 2009. Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 236–255. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00152.x>
- Vishnu, C., Seenayya, G., Reddy, G., 2000. Direct conversion of starch to L (+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. *Bioprocess. Eng.* 23, 155–158. <https://doi.org/10.1007/PL00009119>

- Vos, W.M. de, Boerrigter, I., Rooyen, R.J. van, Reiche, B., Hengstenberg, W., 1990. Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 265, 22554–22560
- Vos, W.M., Vaughan, E.E., 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 217–237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00136.x>
- Wang, K., Qi, T., Guo, L., Ma, Z., Gu, G., Xiao, M., Lu, L., 2019. Enzymatic glucosylation of salidroside from starch by α -amylase. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2012–2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06618>
- Wang, Y., Black, B.A., Curtis, J.M., Gänzle, M.G., 2014. Characterization of α -galacto-oligosaccharides formed via heterologous expression of α -galactosidases from *Lactobacillus reuteri* in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2507–2517. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5145-x>
- White, R.H., 2006. The difficult road from sequence to function. *J. Bacteriol.* 188, 3431–3432. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3431-3432.2006>
- Wildberger, P., Pfeiffer, M., Brecker, L., Nidetzky, B., 2015. Diastereoselective synthesis of glycosyl phosphates by using a phosphorylase-phosphatase combination catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 15867–15871. <https://doi.org/10.1002/anie.201507710>
- Yadav, V., Yadav, P.K., Yadav, S., Yadav, K.D.S., 2010. α -L-rhamnosidase: a review. *Process Biochem.* 45, 1226–1235. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.025>
- Yoon, M., Hwang, H., 2008. Reduction of soybean oligosaccharides and properties of α -D-galactosidase from *Lactobacillus curvatus* R08 and *Leuconostoc mesenteroides* JK55. *Food Microbiol.* 25, 815–823. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.008>
- Zhang, L., Yin, H., Zhao, Q., Yang, C., Wang, Y., 2018. High alkaline activity of a thermostable α -amylase (cyclomaltodextrinase) from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* isolate. *Ann. Microbiol.* 68, 881–888. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1394-3>
- Zhou, J., Li, Z., Zhang, H., Wu, J., Ye, X., Dong, W., Jiang, M., Huang, Y., Cui, Z., 2018. Novel maltogenic amylase CoMA from *Corallococcus* sp. strain

EGB catalyzes the conversion of maltooligosaccharides and soluble starch to maltose. Appl. Environ. Microbiol. 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00152-18>

Zomer, A.L., Buist, G., Larsen, R., Kok, J., Kuipers, O.P., 2007. Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. J. Bacteriol. 189, 1366–1381. <https://doi.org/10.1128/JB.01013-06>

BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA

<http://www.cazy.org/b125.html>

<http://www.secugen.es>

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>

<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

<https://web.expasy.org/protparam/>

<http://cello.life.nctu.edu.tw>

<https://www.kegg.jp>

<http://biocomputo2.ibt.unam.mx/OperonPredictor/>

<https://www.enzyme-database.org/>

Identificación y caracterización de glicosil hidrolasas en *Lactobacillus plantarum* WCFS1

I. INTRODUCCIÓN

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. CONCLUSIONES

VI. BIBLIOGRAFÍA

VII. ANEXOS

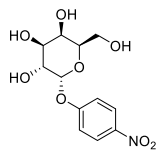
ANEXO I: Características principales de las glicosidasas de *L. plantarum* WCFS1 estudiadas en esta tesis doctoral.

Proteína	Familia GH	Gen	aa/kDa	Actividad β -NF carbohidratos	Actividad carbohidratos naturales	UE ^a (Umg ⁻¹)	Rto ^b (mg/L)	T ^a óptima (°C)	pH óptimo	E _{cat} ^e min ⁻¹ mM ⁻¹	Activadores	Inhibidores
Lp_0179	13	<i>amy2</i>	440/49,9	α -D-Maltosidasa	α -Amilasa	4,3	6,6	4-37	4,0-7,0	720	-	Hg ²⁺ , PMSF
Lp_0187	32	<i>sacA</i>	501/56,7	α -D-Maltosidasa	Sacarasa Rafinasa	1,2	6,7	37	6,0-6,5	200	Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , T20, PMSF, EDTA, Mn ²⁺	Hg ²⁺ , SDS
Lp_0263	13	<i>treA</i>	547/62,0	α -D-Glucosidasa	Trehalasa Sacarasa	-	15,8	37	6,0	-	PMSF	SDS, Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ²⁺
Lp_0440	1	<i>pbg1</i>	478/54,9	6-P- β -D-Glucosidasa	-	0,01	4,7	22	6,0	0,7	-	-
Lp_0906	1	<i>pbg2</i>	500/57,9	6-P- β -D-Glucosidasa	Lactasa	-	14,3	45	7,0	-	-	-
Lp_1401	1	<i>pbg3</i>	490/55,8	6-P- β -D-Glucosidasa	-	-	18,2	30-37	6,5-8,0	-	-	-
Lp_2757	13	-	574/64,4	α -D-Maltosidasa α -D-Maltopentaosidasa	α -Amilasa maltogénica	3,9 15,7	5,3	30-37 30	4,0-6,0 4,0-6,0	480 334	- -	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺
Lp_2777	1	<i>pbg4</i>	480/54,7	6-P- β -D-Glucosidasa	Lactulasa	39,5	21,4	4-65	5,0-8,0	911,2	-	Hg ²⁺ , SDS, Cu ²⁺
Lp_2778	1	<i>pbg5</i>	479/54,9	6-P- β -D-Glucosidasa	-	1,9	1,9	30-45	4,0-8,0	146	-	-
Lp_3011	1	<i>pbg6</i>	460/53,4	6-P- β -D-Glucosidasa	-	-	16,9	45	6,5-8,0	-	-	-
Lp_3132	1	<i>pbg7</i>	483/55,4	6-P- β -D-Glucosidasa	-	-	20,3	4-30	6,0	-	-	-
Lp_3220	13	<i>agl4</i>	555/63,9	α -D-Glucosidasa	Sacarasa Turanasasa Isomaltulasa Maltasa Kojibiasa Nigerasa	-	14,7	37	5,0-6,0	-	T20, PMSF	SDS, Hg ²⁺ , Cu ²⁺
Lp_3469	42	<i>lacA</i>	683/78,1	β -D-Galactosidasa β -D-Fucosidasa α -L-Arabinosidasa	Lactasa Lactulasa	18,7 - -	7,2	30-37 30-37 30	4,0-7,0 5,0-7,0 5,0-6,0	17,9 - -	- - -	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ Hg ²⁺ , Cu ²⁺ Hg ²⁺ , Cu ²⁺
Lp_3471	78	<i>ram1</i>	652/74,8	α -L-Ramnosidasa	-	5,9	2,7	45	6,0-6,5	285	T80, EDTA, urea, PMSF	Hg ²⁺ , K ⁺ , Ni ²⁺ , SDS, Mg ²⁺
Lp_3473	78	<i>ram2</i>	525/59,7	α -L-Ramnosidasa	-	-	31,8	65	3,0	-	Hg ²⁺	Cu ²⁺ , PMSF
Lp_3485	36	<i>melA</i>	738/83,6	α -D-Galactosidasa	Melibiasa Rafinasa	624	13,5	4-22	4,0-6,5	80.328 ^d	T20, Mn ²⁺ , DEPC, Fe ²⁺ , EDTA, TX100	Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺
Lp_3512	1	<i>pbg8</i>	486/55,9	6-P- β -D-Glucosidasa	-	-	2,4	30-37	5,0-7,0	-	-	-
Lp_3525	1	<i>pbg9</i>	480/54,6	6-P- β -D-Glucosidasa 6-P- β -D-Galactosidasa	-	0,1 1,2	3,4	4-65 45	6,0-6,5 4,0	5,8 242	- PMSF, T20, SDS, EDTA, Fe ²⁺	- Hg ²⁺ , Ni ²⁺
Lp_3526	1	<i>pbg10</i>	487/55,4	6-P- β -D-Glucosidasa	-	-	5,2	4-45	6,0-8,0	-	-	-
Lp_3629	1	<i>bgl</i>	461/52,7	6-P- β -D-Glucosidasa	-	2,9	5,8	37	5,0-6,0	27,8	-	-

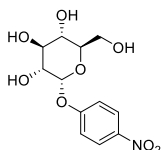
^aUE, actividad enzimática específica; ^bRto, rendimiento (mg/L); ^cT20, tween 20; T80, tween 80; PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo; SDS, dodecilsulfato sódico; EDTA, etilendiaminotetraacético; TX100, Tritón X100; DEPC, pirocarbonato de dietilo; β M, β -mercaptoetanol; ^d estudio cinético realizado sin DTT; $E_{cat}^e = k_{cat}/K_M$, eficiencia catalítica

ANEXO II: Estructuras de los carbohidratos derivados de *p*-NF utilizados en esta tesis (ChemDraw® Professional 16.0).

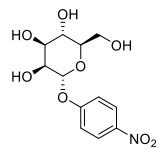
pNF- α -D-Galactopiranosido



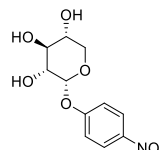
pNF- α -D-Glucopiranosido



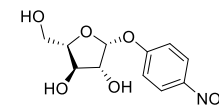
pNF- α -D-Manopiranosido



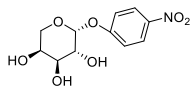
pNF- α -D-Xilopiranosido



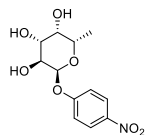
pNF- α -L-Arabinofuranosido



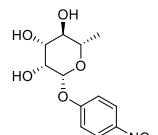
pNF- α -L-Arabinopiranosido



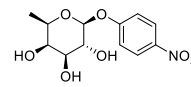
pNF- α -L-Fucopiranosido



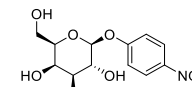
pNF- α -L-Ramnopiranosido



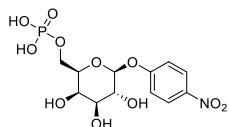
pNF- β -D-Fucopiranosido



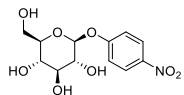
pNF- β -D-Galactopiranosido



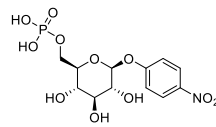
pNF-6-fosfo- β -D-Galactopiranosido



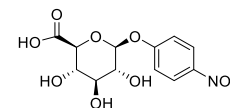
pNF- β -D-Glucopiranosido



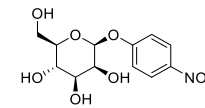
pNF-6-fosfo- β -D-Glucopiranosido



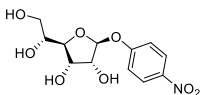
pNF- β -D-Glucurónido



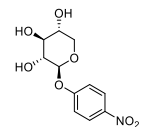
pNF- β -D-Manopiranosido



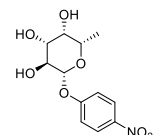
pNF- β -D-Ribofuranosido



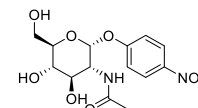
pNF- β -D-Xilopiranosido



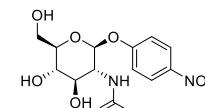
pNF- β -L-Fucopiranosido



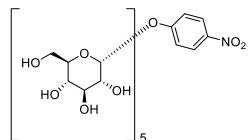
pNF-NAC- α -D-Glucosamínido



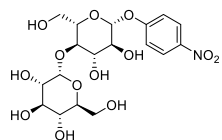
pNF-NAC- β -D-Glucosamínido



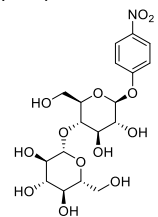
pNF- α -D-Maltopentaósido



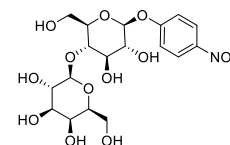
pNF- α -D-Maltopiranosido



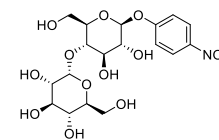
pNF- β -D-Celobiosa



pNF- β -D-Lactopiranosido

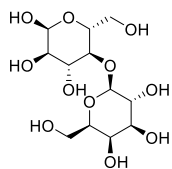


pNF- β -D-Maltósido

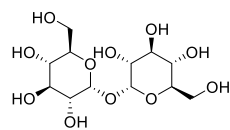


ANEXO III: Estructuras de los carbohidratos naturales utilizados en esta tesis (ChemDraw® Professional 16.0).

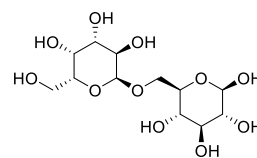
Lactosa



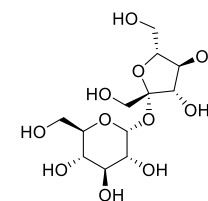
Trehalosa



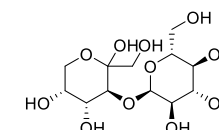
Melibiosia



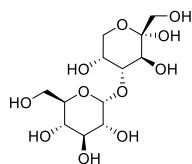
Sacarosa



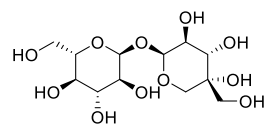
Turanosia



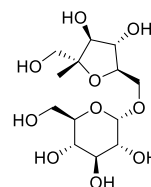
Maltulosa



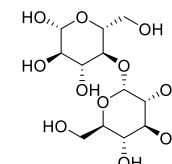
Leucrosia



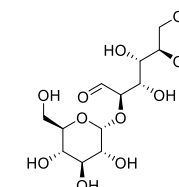
Isomaltulosa



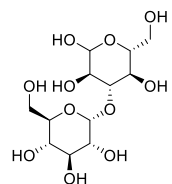
Maltosa



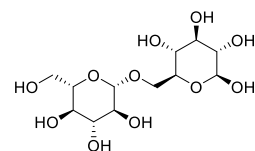
Kojibiosia



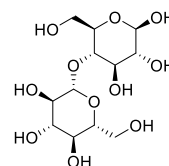
Nigerosa



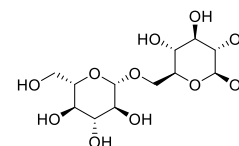
Isomaltosa



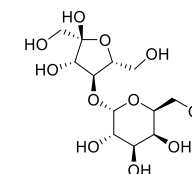
Celobiosia



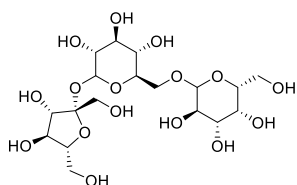
Gentiobiosia



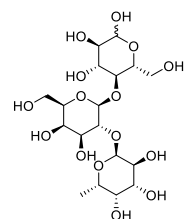
Lactulosa



Rafinosa



2' Fucosil lactosa



ANEXO IV: Matriz de identidad entre las secuencias de aminoácidos de las glicosil hidrolasas de *L. plantarum* WCFS1 caracterizadas en esta tesis. *Clustal Omega*.

Lp_0179	Lp_0187	Lp_0263	Lp_0440	Lp_0906	Lp_1401	Lp_2757	Lp_2777	Lp_2778	Lp_3011	Lp_3132	Lp_3220	Lp_3512	Lp_3525	Lp_3526	Lp_3629	Lp_3469	Lp_3471	Lp_3473	Lp_3485	Proteína
100	14	24	10	11	13	25	11	11	9	9	24	14	14	11	10	18	7	11	17	Lp_0179
	100	14	13	13	13	11	13	12	9	12	13	13	12	15	9	18	13	21	13	Lp_0187
		100	13	11	14	25	13	13	7	14	38	14	12	13	8	18	11	9	17	Lp_0263
			100	40	51	11	64	67	34	50	10	47	54	31	29	18	12	12	15	Lp_0440
				100	39	11	43	41	32	49	9	44	44	46	23	14	10	9	13	Lp_0906
					100	12	31	51	34	47	12	48	51	50	27	16	10	12	14	Lp_1401
						100	11	11	10	12	24	12	14	11	9	16	11	13	18	Lp_2757
							100	66	35	51	12	49	52	33	28	16	12	14	17	Lp_2777
								100	36	49	11	48	49	30	28	17	12	12	17	Lp_2778
									100	35	10	34	34	34	30	14	8	10	11	Lp_3011
										100	10	30	46	34	28	15	12	11	13	Lp_3132
											100	12	12	11	10	16	8	10	17	Lp_3220
												100	50	72	29	16	8	10	14	Lp_3512
													100	33	29	17	10	11	16	Lp_3525
														100	27	15	11	9	14	Lp_3526
															100	12	9	9	9	Lp_3629
																100	16	14	17	Lp_3469
																	100	25	12	Lp_3471
																		100	12	Lp_3473
																			100	Lp_3485

ANEXO V: Publicaciones derivadas de los resultados presentados en esta tesis.

- Acebrón, I., Plaza-Vinuesa, L., de las Rivas, B., Muñoz, R., Cumella, J., Sánchez-Sancho, F., Mancheño, J.M., 2017. Structural basis of the substrate specificity and instability in solution of a glycosidase from *Lactobacillus plantarum*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1865, 1227–1236. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.07.007>
- Delgado-Fernández, P., Plaza-Vinuesa, L., Hernández-Hernández, O., de las Rivas, B., Corzo, N., Muñoz, R., Javier Moreno, F., 2019. Unravelling the carbohydrate specificity of MeIA from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: an α -galactosidase displaying regioselective transgalactosylation. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.237>
- Delgado-Fernández, P., Plaza-Vinuesa, L., Lizasoain-Sánchez, S., de las Rivas, B., Muñoz, R., Jimeno, M.L., García-Doyagüez, E., Moreno, F.J., Corzo, N., 2020. Hydrolysis of lactose and transglycosylation of selected sugar alcohols by LacA β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *J. Agr. Food. Chem.* <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02439>
- Perez-Rizquez, C., Lopez-Tejedor, D., Plaza-Vinuesa, L., de las Rivas, B., Muñoz, R., Cumella, J., Palomo, J.M., 2019. Chemical modification of novel glycosidases from *Lactobacillus plantarum* using hyaluronic acid: effects on high specificity against 6-phosphate glucopyranoside. *Coatings* 9, 311. <https://doi.org/10.3390/coatings9050311>
- Plaza-Vinuesa, L., Hernández-Hernández, O., Moreno, F.J., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2019. Unravelling the diversity of glycoside hydrolase family 13 α -amylases from *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microb. Cell. Fact.* 18. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1237-3>

