

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

---

---

División Académica de Ciencias de la Salud



**“Estudio comparativo de las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas  
recombinantes de *Bifidobacterium adolescentis* ATCC  
15703”**

Tesis que para obtener el grado de la:  
Maestría en Ciencias Biomédicas

Presenta:

José Antonio Morales Contreras

Directores

Ángela Ávila Fernández

Carolina Esther Melgar Valdes

Villahermosa, Tabasco

Febrero, 2020



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

Jefatura del  
Área de Estudios  
de Posgrado



Of. No. 0235/DACS/JAEP  
26 de febrero de 2020

ASUNTO: Autorización impresión de tesis

**C. José Antonio Morales Contreras**  
Maestría en Ciencias Biomédicas  
Presente

Comunico a Usted, que ha sido autorizada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dra. Leova Pacheco Gil, Dr. Jorge Luis Blé Castillo, DRa. Carolina Esther melgar Valdes, Dra. Isela Esther Juárez Rojop y la Dra. Ángela Ávila Fernández, impresión de la tesis titulada: "Estudio comparativo de las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703", para sustento de su trabajo recepcional de la Maestría en Ciencias Biomédicas, donde fungen como Directores de Tesis la Dra. Ángela Ávila Fernández y la Dra. Carolina Esther Melgar Valdes.

Atentamente

**Dra. Mirian Carolina Martínez López**  
Directora



C.c.p.- Dra. Ángela Ávila Fernández.- Director de Tesis  
C.c.p.- Dra. Carolina Esther melgar Valdes.- Director de Tesis  
C.c.p.- Dra. Leova Pacheco Gil.- Sinodal  
C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- Sinodal  
C.c.p.- Dra. Carolina Esther Melgar Valdes.- Sinodal  
C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop Sinodal  
C.c.p.- Dra. Ángela Ávila Fernández.- Sinodal

C.c.p.- Archivo  
DC'MCML/MO'MACA/lkrd\*





**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

Jefatura del  
Área de Estudios  
de Posgrado



### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Villahermosa Tabasco, siendo las 10:30 horas del día 11 del mes de febrero de 2020 se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la División Académica de Ciencias de la Salud para examinar la tesis de grado titulada:

**"Estudio comparativo de las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703"**

Presentada por el alumno (a):

Morales	Contreras	José Antonio
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)

Con Matricula

1	8	1	E	5	7	0	0	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---

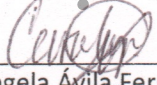
Aspirante al Grado de:

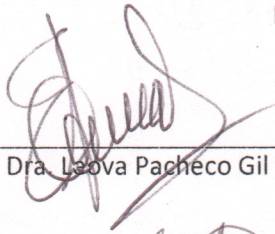
### Maestro en Ciencias Biomédicas


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

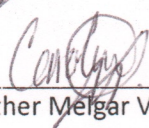
### COMITÉ SINODAL


  
Dra. Ángela Ávila Fernández

  
Dra. Carolina Esther Melgar Valdes  
Directores de Tesis

  
Dra. Leova Pacheco Gil

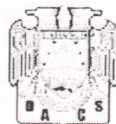
  
Dr. Jorge Luis Blé Castillo

  
Dra. Carolina Esther Melgar Valdes

  
Dra. Isela Esther Juárez Rojop

  
Dra. Ángela Ávila Fernández





## Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 12 del mes de Febrero del año 2020, el que suscribe, José Antonio Morales Contreras, alumno del programa de la Maestría en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 181E57006 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: "**Estudio comparativo de las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703**", bajo la Dirección de la Dra. Ángela Ávila Fernández y la Dra. Carolina Esther Melgar Valdes, Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31. El alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: [angela.avila@ujat.com.mx](mailto:angela.avila@ujat.com.mx). Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

José Antonio Morales Contreras

Nombre y Firma

DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS DE LA SALUD



JEFATURA DEL ÁREA DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO

Sello



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Centro de Investigación de la División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, bajo la dirección de la Dra. Ángela Ávila Fernández y la Dra. Carolina Esther Melgar Valdes.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca CONACyT 884472 y el proyecto SEP-CONACYT Investigación Científica Básica 288403.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## Dedicatorias

### **A Dios.**

Él, de quién recibo las bendiciones necesarias para vivir, el espíritu para luchar y la fuerza para creer.

### **A mis familiares.**

Ángeles y José, mis maravillosos padres, quiénes con creatividad formaron mi cuerpo físico. A Jessica y Janet, mis hermanas a quiénes aprecio y valoro. A mis abuelas, por la máxima protección que me han otorgado a través de los años. A mi tío Javier, quién me apoya incondicionalmente. A, Kali, Martha y Jacqueline, mis sobrinas preferidas, quiénes alegran mi vida.

### **A mis amigos.**

Aunque llegué al mundo solo, los encontré a ellos, mis personas favoritas, con las que estoy inmensamente agradecido. Luz, esa increíble mujer, quién me alimenta y me cuida. Heber, mi colega, con el que disfruto hablar. Jessica, mi amiga y consejera, quién se percató de mis verdaderos sentimientos. A Maloy, mi compañera durante la maestría.

### **A mis maestros.**

A Gaby, por enseñarme a aceptar y agradecer las situaciones que me rodean. A Sam, por ayudarme conectar con mi interior. A Ángela, por guiar e impulsar el cambio en mi persona.

**José Antonio Morales Contreras**



## Agradecimientos

A mis directoras de tesis: Dra. Ángela Ávila Fernández por admitirme en su laboratorio como su estudiante y formarme durante estos años. A la Dra. Carolina Esther Melgar Valdes por su apoyo brindado en la maestría.

A la Dra. Carolina Esther Melgar Valdes y a la Dra. Leova Pacheco Gil por formar parte de mi comité tutorial, sus observaciones enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Leova Pacheco Gil y al Dr. Xavier Miguel Boldo León por el acceso al uso de los equipos del Laboratorio de Genómica.

Al Dr. Miguel Ángel Alvarado López Alvarado y a la Dra. Miriam Carolina Martínez López por el acceso al uso de los equipos del Laboratorio de Biología Molecular.

Al Dr. Carlos Alfonso Álvarez González y a la Mtra. Karen Noemi Nieves Rodríguez por el acceso a los equipos del Laboratorio de Bioquímica de la División Académica de Ciencias Biológicas.

Al Dr. Agustín López Munguía por el acceso al equipamiento del Laboratorio de Tecnología Enzimática del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A la Mtra. María Elena Rodríguez por el apoyo técnico proporcionado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A los estudiantes Raúl Ricardo Ocampo Mendoza y Estefanía Quevedo Romero por contribuir a la caracterización parcial de las enzimas recombinantes.

## Índice

Abreviaturas .....	IX
Glosario de términos .....	X
Resumen .....	XI
Abstract.....	XII
1. Introducción.....	1
1.1 Microbiota intestinal en la salud .....	1
1.3 Las fructanas son carbohidratos bifidogénicos.....	5
1.4 Las $\beta$ -fructofuranosidasas facilitan el aprovechamiento de las fructanas.....	8
1.5 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15703.....	11
2. Planteamiento del problema.....	13
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis .....	15
5. Objetivos .....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos .....	16
6. Materiales y métodos .....	17
6.1 Identificación de $\beta$ -fructofuranosidasas en bifidobacterias mediante la minería de datos y elaboración del dendograma.....	17
6.2 Construcción del modelo tridimensional de B.ad1(637) y B.ad2(518) ..	17
6.3 Construcción de los plásmidos pET22-B.ad1(637) y pET22-B.ad2(518). .....	18
6.4 Cultivo de células transformadas de <i>E. coli</i> Rosetta™ 2.....	18
6.5 Obtención del extracto enzimático.....	19
6.6 Purificación de las proteínas B.ad1(637) y B.ad2(518). .....	19
6.7 Preparación de geles para electroforesis de proteínas.....	20
6.8 Cuantificación de proteína.....	20
6.9 Ensayo estándar de actividad enzimática.....	21
6.10 Efecto de la temperatura y pH y estabilidad térmica. ....	21



6.11 Actividad relativa sobre diferentes sustratos.....	22
6.12 Zimogramas. ....	22
7. Resultados .....	24
7.1 Identificación y clasificación de cepas de bifidobacterias con base en sus $\beta$ -fructofuranosidasas.....	24
7.2 Caracterización molecular de las $\beta$ -fructofuranosidasas de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703. ....	28
7.3 Modelos tridimensionales de las $\beta$ -fructofuranosidasas.....	32
7.4 Producción de las enzimas recombinantes B.ad1(637) y B.ad2(518)....	34
7.5 Purificación de las enzimas recombinantes. ....	35
7.6 Análisis de actividad enzimática por zimografía. ....	37
7.7 Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes. ....	38
a) Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	38
b) Efecto del pH sobre la actividad enzimática. ....	39
c) Estabilidad térmica.....	40
c) Actividad sobre diferentes sustratos.....	41
8. Discusión .....	43
9. Conclusiones .....	50
10. Perspectivas .....	51
11. Literatura científica citada.....	52

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Dendograma basado en 71 secuencias de aminoácidos, provenientes de los genomas de bifidobacterias, clasificadas en la familia GH32. Los recuadros de colores corresponden a los filogrupos propuestos por Sun et al., 2015. Grupo 1 (secuencias entre 463 y 488 aminoácidos). Grupo 2 (secuencias entre 390 y 538 aminoácidos). Grupo 3 (secuencias entre 608 y 642 aminoácidos).....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas de <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 (ACJ53120.1 – B.longum_I1) y <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 [BAF40106.1 – B.ad1(637)]. Resaltados en amarillo se muestran los residuos de cisteínas. En letras naranja se muestran los motivos conservados. La línea azul indica la sección correspondiente al dominio <math>\beta</math>-propela y la línea verde al <math>\beta</math>-sándwich. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas de <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697 (ACJ51890.1 – B.longum_I2) y <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 [BAF39931.1 – B.ad2(518)]. Resaltados en amarillo se muestran los residuos de cisteínas. En letras naranja se muestran los motivos conservados. La línea azul indica la sección correspondiente al dominio <math>\beta</math>-propela y la línea verde al <math>\beta</math>-sándwich. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4. Modelos tridimensionales de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 y <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697, creados en el servidor I-TASSER, A: B.ad1(637); B: B.ad2(518); C: B.longum_I1 y D: B.longum_I2; E: PDB: 3PIG (<i>B. longum</i> KN29.1). En cada imagen, la flecha indica el <math>\alpha</math>-hélice del dominio N-terminal y el corchete indica el dominio <math>\beta</math>-sandwich. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 5. SDS-PAGE del extracto proteico después de la producción de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703. A: Extracto enzimático B.ad1(637); B: Extracto enzimático B.ad2(518); C: Extracto enzimático control. MM: Marcador de peso molecular.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 6. SDS-PAGE de la purificación de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703. B.ad1(637) (Carriles A a D). B.ad2(518) (Carriles E a H). A y E: Extracto enzimático; B y F: Recirculado; C y G: Lavado; D y H: Proteína pura; MM; Marcador de peso molecular. ....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 7.. Zimografía de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas recombinantes de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 realizada en un gel de agarosa con inulina <i>L. citreum</i> al 1%. A y B, B.ad1(637); C y D, B.ad2(518); A y C: Tinción con el reactivo de Schiff; B y D: Tinción con el reactivo GelCode Blue Stain.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 8. Efecto de la temperatura en la actividad de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas recombinantes de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703. A, B.ad1(637); B, B.ad2(518). ....</b>	<b>39</b>



**Figura 9. Efecto del pH en la actividad de las  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de *B. adolescentis* ATCC 15703. A, B.ad2(518); B, B.ad1(637).**  
..... 40

**Figura 10. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad enzimática de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703. A, B.ad1(637); B, B.ad2(518), incubadas durante 15 minutos a diferentes temperaturas.**  
..... 41

#### Indice de tablas

<b>Tabla 1. Cepas de bifidobacterias que poseen 2 <math>\beta</math>-fructofuranosidasas.</b> .....	28
<b>Tabla 2. Purificación de B.ad1(637)</b> .....	36
<b>Tabla 3. Purificación de B.ad2(518)</b> .....	36
<b>Tabla 4. Actividad relativa de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas B.ad1(637) y B.ad2(518) sobre sustratos de diversas estructuras y orígenes.</b> .....	42
<b>Tabla 5. Propiedades bioquímicas de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas.</b> .....	45
<b>Tabla 6. Estabilidad térmica de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas.</b> .....	46
<b>Tabla 7. Actividad relativa de las <math>\beta</math>-fructofuranosidasas sobre sustratos de diversas estructuras y orígenes.</b> .....	49

## Abreviaturas

**AGCC.** Ácidos grasos de cadena corta.

**APM.** Alto peso molecular.

**BPM.** Bajo peso molecular.

**B.ad1(637).**  $\beta$ -fructofuranosidasa recombinante 1 de *B. adolescentis* ATCC 15703.

**B.ad2(518).**  $\beta$ -fructofuranosidasa recombinante 2 de *B. adolescentis* ATCC 15703.

**DNS.** Ácido 3,5 – dinitrosalicílico (por sus siglas en inglés).

**D.O.<sub>600</sub>.** Densidad óptica 600 nm.

**EII.** Enfermedad inflamatoria intestinal.

**FOS.** Fructooligosacáridos.

**GP.** Grado de polimerización.

**GRAS.** Generalmente reconocido como seguro (por sus siglas en inglés).

**HMOs.** Oligosacáridos de la leche humana (por sus siglas en inglés).

**IPTG.** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.

**MRCA.** Ancestro común más reciente (por sus siglas en inglés).

**SDS-PAGE.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (por sus siglas en inglés).

**TGI.** Tracto gastrointestinal.

## Glosario de términos

**Azúcares reductores.** Son aquellos azúcares que poseen un grupo aldehído o cetona libre, y que son capaces de actuar como agentes reductores.

**Cepa.** Un aislado o un grupo de aislados que pueden distinguirse de otros aislados del mismo género y especie por características fenotípicas o características genotípicas o ambas.

**Fructanas.** Son carbohidratos no estructurales basados en fructosa, desde oligosacáridos y polisacáridos. En otras palabras, cualquier compuesto dónde uno o más enlaces fructosil-fructosa ( $\beta$ -2,1, o  $\beta$ -2,6.) constituya la mayoría de los enlaces.

**Género.** Categoría taxonómica subordinada a la familia y superior a la especie.

**Inulina.** Polímero de fructosa unida mediante enlaces de tipo  $\beta$ -2,1.

**Levana.** Polímero de fructosa unida mediante enlaces de tipo  $\beta$ -2,6.

**Prebióticos.** Una sustancia que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedero confiriéndole beneficios a la salud.

**Probióticos.** Son microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para salud del hospedero.

**Raftilosa Sinergy 1.** Fructosas unidas por enlaces  $\beta$ -2,1, incluye oligofructosa e inulina en una proporción 1:1.

**Raftiline HP.** Inulina de achicoria.

**Zimograma.** Técnica electroforética que permite observar la actividad enzimática en gel.

## Resumen

**Objetivo:** Caracterizar las propiedades bioquímicas de las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas de la cepa *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703. **Materiales y métodos:** A partir de los plásmido pET22-*B.ad1(637)* y pET22-*B.ad2(518)* clonados en la cepa *Escherichia coli* Rosetta™ 2, se produjeron las  $\beta$ -fructofuranosidasas 1 (GeneBank: BAF40106.1) y 2 (GenBank: BAF39931.1) de *B. adolescentis* ATCC 15703 en su forma recombinante y se determinaron sus propiedades bioquímicas como pH y temperaturas óptimos, actividad sobre diferentes sustratos y estabilidad térmica. La actividad enzimática fue determinada sobre Raftilosa Sinergy 1 al 1% en amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0 y 5.5 a 50 °C para B.ad1(637) y Bad2(518), respectivamente. **Resultados:** El peso molecular calculado para B.ad1(637) fue de 62.5 kDa y para B.ad2 (518) fue de 55 kDa. La temperatura óptima fue de 50 °C para B.ad1(637), y un rango de 50 a 55 °C para B.ad2(518). B.ad1(637) exhibió un rango de pH óptimo de 5.5 a 7.0, mientras que B.ad2(518) tuvo un pH óptimo de 5.5. La actividad relativa sobre los sustratos, Oligofructosa p95, Raftilosa Sinergy 1, Agavina, Sacarosa, Levana SacB 8.3, Raftilina HP, Inulina de *L. Citreum*, Levana B512 para B.ad1(637) fue de 45.0 %, 100 %, 61.7 %, 38.1 %, 33.8 % 29.2 %, 0.61 %, 0.61 %, mientras que para B.ad2(518) fue de 100 %, 45.9 %, 20.69 %, 5.7 %, 2.2 %, 1.7 % 0.11 % y XX%, respectivamente. **Conclusiones:** La mayor actividad enzimática a las condiciones ensayadas fue sobre Raftilosa Sinergy1 para B.ad1(637) y Oligofructosa p95 para B.ad2(518). Por lo tanto, estas enzimas se clasifican como  $\beta$ -fructofuranosidasas.



## Abstract

**Aim:** To characterize the biochemical properties of the  $\beta$ -fructofuranosidases of *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703. **Materials and methods:** From plasmids pET22-B.ad1(637) and pET22-B.ad2(518) cloned in the *Escherichia coli* Rosetta™ 2, produced  $\beta$ -fructofuranosidases 1 (GeneBank: BAF40106.1) and 2 (GenBank: BAF39931.1) of *B. adolescentis* ATCC 15703 in its recombinant form and determined its biochemical properties such as pH and temperature optimum, activity with different substrates. Enzymatic activity was determined on 1% Raftilose Sinergy 1 in 100 mM phosphate buffer pH 6.0 and 5.5 at 50 ° C for B.ad1(637) and Bad2(518), respectively. **Results:** Molecular weight for B.ad1(637) was 62.5 kDa and for B.ad2(518) it was 55 kDa. Optimum temperature is 50 ° C for B.ad1(637), and a range of 50 to 55 ° C for B.ad2(518). B.ad1(637) exhibited an optimum pH range of 5.5 to 7.0, while B.ad2(518) had an optimal pH of 5.5. Relative activity on the substrates, Oligofructose p95, Raftilose Sinergy 1, Agavin, Sucrose, Levan SacB 8.3, Raftiline HP, Inulin *L. citreum*, Levan B512 for B.ad1 (637) was 45.0%, 100%, 61.7%, 38.1%, 33.8% 29.2%, 0.61%, 0.61%, while for B.ad2(518) it was 100%, 45.9%, 20.69%, 5.7%, 2.2%, 1.7% 0.11% and XX%, respectively. **Conclusions:** The highest enzyme activity under the conditions tested was Raftilose Sinergy1 for B.ad1(637) and Oligofructose p95 for B.ad2(518). Therefore, these enzymes are  $\beta$ -fructofuranosidases.

# 1. Introducción

## 1.1 Microbiota intestinal en la salud

La microbiota del intestino humano tiene funciones esenciales para la salud del huésped ([Tanno et al., 2019](#)). Por lo tanto, para preservar la lozanía del cuerpo humano es importante promover el crecimiento y mantenimiento de las bacterias benéficas ([Cionci, Baffoni, Gaggi, & Gioia, 2018](#)) conocidas como probióticos.

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas – con el fin de llegar hasta el colón, dónde ejercen sus efectos - confieren beneficios a la salud del huésped ([Hill et al., 2014](#)). Por ejemplo, se ha demostrado que los probióticos son capaces de reducir el crecimiento específico de patógenos mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) ([Kok & Hutkins, 2018](#)). Otros efectos clínicos de los probióticos incluyen: inmunomodulación ([Abul, Azad, Sarker, & Wan, 2018](#)), reducción del riesgo de enfermedades del tracto gastrointestinal (TGI) como la diarrea, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la colitis ulcerativa ([Cionci et al., 2018](#)), la enfermedad de Crohn y el cáncer de colon ([Rivière, Selak, Lantin, Leroy, & De Vuyst, 2016](#)). Además, se ha descrito que algunos probióticos poseen propiedades antimutagénicas ([Chalova, Lingbeck, Kwon, & Ricke, 2008](#)). No obstante, los efectos de los probióticos varían entre los diferentes huéspedes. Por lo que, los factores genéticos, el estado inmunológico, la presencia de comorbilidades y la composición de la microbiota intestinal deben ser considerados como variables que influyen en la eficacia de los probióticos ([Casaro et al., 2018](#)). Entre los probióticos

más representativos se encuentran las especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

## 1.2 Las bifidobacterias y su relación con los carbohidratos de la dieta

En el año 1900, Henry Tissier identificó por primera vez a las bifidobacterias en las heces de lactantes alimentados con leche materna (Arboleya, Watkins, Stanton, & Ross, 2016; Wong, Sugahara, Odamaki, & Xiao, 2018). Posteriormente, se demostró que estos microorganismos están distribuidos en diversos nichos ecológicos (Sun et al., 2015; Wong et al., 2018), principalmente en el TGI de mamíferos, aves e insectos (Lugli et al., 2019).

Las bifidobacterias se caracterizan por ser bacterias Gram (+), sacarolíticas, anaerobias obligatorias (Amaretti et al., 2006), no formadoras de esporas, catalasa (-) (Wong et al., 2018) y pleomórficas (Dhanashree, Rajashekharan, Krishnaswamy, & Kammara, 2017). Actualmente, se reconoce que estos microorganismos están conformados por 72 especies (Lugli et al., 2019). De forma general, se dividen en seis grupos filogenéticos principales: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. longum*, *B. pollorum*, *B. asteroides*, *B. pseudolongum*, *B. boum* (Sun et al., 2015). También, se sugiere que sus diferencias sustanciales son consecuencia de la adaptación ecológica entre las especies (Wong et al., 2018).

Debido a que las bifidobacterias presentes en el TGI humano son benéficas para la salud algunas especies son consideradas como marcadores de salud intestinal (De Vuyst, Moens, Selak, Rivière, & Leroy, 2014). Además, diversos estudios han demostrado los efectos positivos de las bifidobacterias en la salud del huésped. Por ejemplo, la restauración y el mantenimiento del equilibrio de la microbiota intestinal, la inhibición de bacterias patógenas, el incremento en la tolerancia a la lactosa y la

prevención de la diarrea (Airaksinen et al., 2019). También, son capaces de reducir las concentraciones de amonio, colesterol (Brusaferro et al., 2018) y glucosa en sangre. Asimismo, sintetizan vitaminas e incrementan la absorción de minerales a nivel intestinal (Hill et al., 2014). En consecuencia, las bifidobacterias son consideradas como bacterias probióticas, y desde su descubrimiento han sido objeto de investigación.

Por otra parte, la composición y funcionalidad de la microbiota del TGI humano ocurre desde el nacimiento, y es relativamente estable a los dos años de vida. Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes son los principales filos en la infancia (Turróni, Duranti, et al., 2014). El género *Bifidobacterium* pertenece al filo de las Actinobacterias y representa entre el 60 y el 70 % de la microbiota intestinal en los recién nacidos, destacando las especies: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum* (Turróni, Ventura, et al., 2014). No obstante, la colonización del TGI por parte de las bifidobacterias es dependiente de factores extrínsecos, tales como la transferencia vertical entre el tracto vaginal, la placenta y el líquido amniótico; la edad gestacional; y la lactancia materna exclusiva (Milani et al., 2017).

De igual forma, se ha demostrado que existe una asociación entre la disminución del número y variedad de especies de bifidobacterias con enfermedades como la obesidad y el síndrome de intestino irritable (Arboleya et al., 2016). También se ha observado que hay una diferencia en la composición de la microbiota intestinal de las personas que padecen alergias en comparación con los individuos sanos, pues los niveles altos de bifidobacterias se asocian con estos últimos (Casaro et al., 2018). Asimismo, la variabilidad entre individuos, las alteraciones en el estilo de vida, la dieta y la medicación con antibióticos tienen



efecto en la composición y la función de la microbiota. Igualmente, la edad juega un papel importante. Por ejemplo, en los adultos los niveles de bifidobacterias disminuyen significativamente hasta < 5%, pero permanecen estables ([Arboleya et al., 2016](#)). Incluso, la composición de especies de bifidobacterias en el TGI del adulto es diferente al TGI del infante, las especies que destacan son *B. catenulatum*, *B. longum* subsp *longum* y *B. adolescentis* ([Milani et al., 2017](#)), siendo esta última especie predominante en el TGI adulto. Del mismo modo, durante la vejez ocurre un nuevo decremento. Por todo lo anterior, se han explorado tratamientos enfocados a reestablecer la microbiota intestinal mediante la adición de diversas especies de bifidobacterias mediante suplementos comerciales ([Liu, Cao, & Zhang, 2015](#)). Sin embargo, las diferencias en la distribución de las especies de bifidobacterias en los diversos grupos etarios está relacionada con el contenido de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos específicos. Así, las especies que predominan en el TGI de niños, como *B. breve* y *B. longum* subsp. *infantis* poseen genes que están involucrados en el consumo de oligosacáridos de la leche humana (HMOs, por sus siglas en inglés). En contraste, las especies sobresalientes del TGI de adultos, como *B. longum* subsp. *longum* y *B. adolescentis* contienen un alto número de genes implicados en la degradación de carbohidratos de la dieta ([Milani et al., 2016](#)). De modo que, el conocimiento de la capacidad metabólica de las bifidobacterias aunado a la evidencia de que estas bacterias proporcionan beneficios al huésped han fomentado al desarrollo de diversos enfoques para estimular su crecimiento y/o actividad en el colon a través de sustancias presentes o suplementadas en la dieta ([Kuo, 2017](#)). A estas sustancias se les denomina como prebióticos y son definidas como sustratos que son

selectivamente utilizados por los microorganismos del huésped confiriéndole un beneficio para la salud (Gibson, Hutkins, & Prescott, 2017). Con base a este concepto, las bifidobacterias utilizan selectivamente prebióticos (Tanno et al., 2019) como las fructanas para su crecimiento.

### **1.3 Las fructanas son carbohidratos bifidogénicos.**

Como se mencionó previamente, la dieta modifica la composición de las bifidobacterias en el TGI. Esto se debe a que ciertos componentes de los alimentos, como los carbohidratos complejos que resisten la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas de mamíferos e incluso la absorción intestinal son accesibles solo a ser fermentados por parte de la microbiota del colon (Gibson, Probert, Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004). Particularmente, algunos de estos sustratos como las fructanas han demostrado ser prebióticos bifidogénicos. Las fructanas son polisacáridos no estructurales que se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes reinos como las plantas, las bacterias y algunos hongos. Estos polisacáridos están compuestos de fructosas unidas mediante enlaces fructosil-fructosa de tipo  $\beta$ , por lo que no pueden ser hidrolizados por las enzimas de mamíferos y permanecen intactos a su paso por el TGI (Versluys, Kirtel, Toksoy Öner, & Van den Ende, 2018).

Las fructanas se pueden clasificar por su origen, grado de polimerización (GP) y tipo de enlace predominante. De acuerdo con este último criterio existen tres tipos, si el enlace entre las fructosas es de tipo  $\beta$ -(2,1) son llamadas inulinas; en cambio si es  $\beta$ -(2,6) son llamadas levanas y si contienen ambos tipos de enlace son llamadas graminanas o fructanas mezcladas (Apolinário et al., 2014). La agavina, una fructana obtenida del planta de agave originaria de México, pertenece a este

último grupo. Con respecto al GP, si las fructanas tienen un grado de polimerización <10, se les conoce como fructooligosacáridos (FOS).

Tanto los FOS como la inulina son sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) y han sido extensamente estudiadas por sus propiedades biológicas y nutricionales en la fisiología humana, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, en modelos animales, en individuos sanos y en sujetos con trastornos metabólicos, (Ackerman, Craft, & Townsend, 2017). Por ejemplo, los estudios acerca de los FOS y de la inulina han demostrado reducir los niveles séricos de colesterol y triglicéridos y el incremento en la absorción de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Tódero, Rechia, & Guimarães, 2019). Con relación a la agavina, recientemente ha sido empleada en ensayos clínicos como coadyuvante de la dieta baja en calorías para el control de peso en individuos con obesidad y asociada con simvastatina para el tratamiento de la dislipidemia mixta. En ambos casos, sus efectos incluyeron la disminución de los niveles de triglicéridos y de colesterol total (Mart, Barrera-dur, Gonz, & Hern, 2016; Padilla-Camberos, Barragán-Álvarez, Diaz-Martinez, Rathod, & Flores-Fernández, 2018). Por otro lado, la levana también ha demostrado disminuir el nivel de colesterol sérico en ratas. Además, disminuyó el peso corporal, moduló la función inmunológica y aumentó la absorción de minerales (Öner, Hernández, & Combie, 2016). A pesar de estas evidencias científicas, las aplicaciones de la levana han sido orientadas en la industria cosmética a la elaboración de productos belleza y cuidado personal y en la industria farmacéutica se han limitado a su aplicación como coadyuvante en la encapsulación de medicamentos más que a su aprovechamiento por sus propiedades prebióticas (Srikanth, Reddy, Siddartha, Ramaiah, & Uppuluri, 2015).

Los efectos benéficos de las fructanas están relacionados a la habilidad de ciertos microorganismos como las bifidobacterias para fermentar dichos sustratos y producir metabolitos particulares a partir de ellos (Di Bartolomeo & Van den Ende, 2015). Los análisis derivados de la información obtenida a partir de proyectos de secuenciación de genomas de bifidobacterias han sugerido que su capacidad de fermentar carbohidratos complejos es extensa (Milani et al., 2016). Por consiguiente, diversos estudios *in vitro* han evaluado la capacidad de diversas cepas de bifidobacterias para usar fructanas como fuente de carbono. Por ejemplo, Rossi et al., en 2005 evaluaron la capacidad de 55 cepas de bifidobacterias para crecer en medios suplementados con FOS e inulina. La mayoría de las cepas creció en FOS, pero solo 8 fueron capaces de utilizar, como fuente de carbono, inulina con un GP promedio de 25 unidades, entre ellas, *B. adolescentis* ATCC 15703. Selak et al., en 2016 analizaron 190 cepas, y solo 10 crecieron en medios suplementados con inulina (~ GP 12 - 65), de las cuales 9 eran de la especie *B. adolescentis*. Por otro lado, Thomson, Medina, Ortúzar, Gotteland, & Garrido, en 2018 evaluaron el crecimiento celular de 5 bacterias representativas del TGI adulto en inulina y el mayor crecimiento celular se observó con la cepa *B. adolescentis* ATCC 15700. Por último, Rivière, Selak, Geirnaert, Van den Abbeele, & De Vuyst, en 2018 analizaron el crecimiento de 18 cepas sobre fructanas y *B. adolescentis* B72 fue capaz de degradar todas las fracciones de FOS y fue la única en degradar inulina. En contraste, pocos son los estudios donde se han identificado cepas capaces de aprovechar agavinas o levanas como fuente de carbono. Velázquez-Martínez et al., en 2014 demostraron que *B. adolescentis* ATCC 15703 fue capaz de utilizar tres fracciones de fructanas de agave con diferente GP [AFF3 (GP 2 – 22) AFF2 (GP 2



- 40) y AFF1 (GP 3 - 60)] y [Marx, Winkler, & Hartmeier, en 2000](#) evaluaron el crecimiento de 4 cepas de bifidobacterias en medios suplementados con FOS de tipo levana de bajo peso molecular (BPM, GP 2 - 20) y encontraron que *B. adolescentis* DSM 20083 (ATCC 15703) logró un mayor crecimiento y una mayor acidificación del medio, aunque no se observó crecimiento cuando el medio fue suplementado con levana de alto peso molecular (APM).

Estos estudios *in vitro* demuestran que no todas las bifidobacterias tienen la capacidad de metabolizar una amplia variedad de fructanas. Algunos autores proponen que las diferencias se atribuyen al peso molecular de la fructana y no al tipo de enlace, aunado a la expresión de enzimas hidrolíticas ([Marx et al., 2000](#); [Rossi et al., 2005](#)). Por otro parte, los estudios de proteómica han permitido identificar diferentes tipos de proteínas y enzimas asociadas al metabolismo de las fructanas en las bifidobacterias. Entre ellas varios tipos de exo y endo-glicosidasas así como proteínas de unión a carbohidratos ([Kim et al., 2013](#); [Wong et al., 2018](#)).

#### **1.4 Las $\beta$ -fructofuranosidasas facilitan el aprovechamiento de las fructanas.**

Para hidrolizar a las fructanas las bifidobacterias poseen enzimas con actividad fructanasa, conocidas como  $\beta$ -fructofuranosidasas. Estas pertenecen a la familia 32 de las glicosil hidrolasas ([Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska, Bielecki, Redzynia, & Bujacz, 2011](#)). Teóricamente, las  $\beta$ -fructofuranosidasas permiten a las bifidobacterias hidrolizar a los FOS, a la inulina y a la levana. A pesar de ello, tal y como se describió anteriormente, existen diferencias en la capacidad de las bifidobacterias para metabolizar fructanas ([Rossi et al., 2005](#)) y se ha prouesto que esto se debe a que las bifidobacterias se han adaptado específicamente al nicho

dónde habitan (Sun et al., 2015; Wong et al., 2018) y posiblemente las propiedades bioquímicas específicas de las  $\beta$ -fructofuranosidasas juegan un papel importante en esta adaptación. Por consiguiente, algunas  $\beta$ -fructofuranosidasas han sido caracterizadas en su forma nativa o producidas por sistemas de expresión heterólogos. Tal es el caso de las  $\beta$ -FFasas nativas de las cepas *B. longum* JCM7007, *B. adolescentis* G1 y *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 (Imamura, Hisamitsu, & Kobashi, 1994; Muramatsu, Onodera, Kikuchi, & Shiomi, 1994; Warchol et al., 2002), y de las  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de las cepas *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, *B. lactis* DSM 10140, *B. longum* KN29.1, *B. longum* JCM1217, *B. adolescentis* G1 y *B. breve* UCC2003 (Ávila-Fernández, Cuevas-Juárez, Rodríguez-Alegría, Olvera, & López-Munguía, 2016; Ehrmann, Korakli, & Vogel, 2003; Jedrzejczak-Krzepkowska, Tkaczuk, & Bielecki, 2011; Omori, Toshima, Keiji Ueno, Kei Muramatsu, Masanori Kikuchi, 2010; Omori et al., 2010; Ryan, Fitzgerald, & Van, 2005). En general, se ha establecido que el pH óptimo de estas enzimas se encuentra en el rango ácido, de 5.7 a 6.5, mientras que su temperatura óptima se encuentra en el rango de 37 a 55 °C. Aunque en la mayoría de los reportes se menciona la caracterización de una sola  $\beta$ -fructofuranosidasa, se sabe que la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 posee dos  $\beta$ -fructofuranosidasas, de acuerdo con el análisis de proteómica reportado por Kim et al., en 2013, dónde describieron la expresión de las proteínas de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 utilizando como fuente de carbono diferentes carbohidratos prebióticos.

Por otra parte, [Ávila-Fernández et al., en 2016](#) aislaron, clonaron, expresaron y caracterizaron una de las enzimas y la denominaron B.longum\_I1. Esta enzima es, de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de bifidobacterias reportadas hasta el momento, la que tiene mayor peso molecular, posee mayor estabilidad térmica y metaboliza una amplia variedad de fructanas largas y de estructura compleja. Posteriormente, [Morales-Contreras & Ávila-Fernández, en 2018](#) caracterizaron parcialmente la otra  $\beta$ -fructofuranosidasa denominada B.longum\_I2, la cual tiene un peso similar a las demás reportadas y aunque también metaboliza una amplia variedad de fructanas aún no se conoce su estabilidad térmica, por lo que no se sabe si esta característica es propia de las enzimas de la cepa o si se conserva solo en aquellas  $\beta$ -fructofuranosidasas que tienen un mayor peso molecular.

Con el fin de saber si la capacidad de una cepa para metabolizar fructanas largas y de estructura compleja está asociada a un determinado tipo de  $\beta$ -fructofuranosidasa se requiere caracterizar la actividad sobre diferentes sustratos y las propiedades bioquímicas de estas enzimas a partir de varias cepas. Por tal motivo, se buscó intencionadamente si existen otras cepas de bifidobacterias que posean 2 enzimas con características estructurales similares para caracterizarlas y compararlas con las reportadas. Sorprendentemente, se encontró que la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703 posee también 2 enzimas de tipo  $\beta$ -fructofuranosidasa, una de 637 aminoácidos, B.ad1(637) y otra de 518, B.ad2(518), muy similares en tamaño a las enzimas de la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, con un porcentaje de identidad relativamente bajo: 75% entre B.longum\_I1 y B.ad1(637) y 87 % entre B.longum\_I2 y B.ad2(518). Por lo cual se decidió caracterizar a las  $\beta$ -

fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703 en su forma recombinante y comparar sus propiedades bioquímicas. Asimismo, esta cepa además posee características interesantes que se resumen a continuación.

### **1.5 *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703**

*B. adolescentis* ATCC 15703 fue aislado de las heces de un adulto en el año de 1963 y fue designado 8 años después en The American Type Culture Collection (ATCC) como *B. adolescentis* E194a = ATCC 15703. Esta cepa ha demostrado tener características bioquímicas peculiares debido a su capacidad para metabolizar una amplia variedad de fructanas (Marx et al., 2000; Rossi et al., 2005; Velázquez-Martínez et al., 2014). De igual manera, los estudios han demostrado que esta cepa posee propiedades probióticas importantes en la prevención y/o tratamiento de enfermedades gastrointestinales tales como la inhibición de la adherencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena y *Clostridium difficile* a las células epiteliales del intestino (Karetkin et al., 2019). Asimismo, en trastornos cardiometabólicos y enfermedades autoinmunes, el tratamiento preventivo administrado por vía oral con la cepa viva de *B. adolescentis* ATCC 15703 demostró reducir la afluencia de eosinófilos en la vía aérea en un modelo experimental de inflamación alérgica con ratones Balb/c. Probablemente, *B. adolescentis* ATCC 15703 induce la tolerancia específica a alérgenos a través de la producción de IL-10 (Casaro et al., 2018). También, se ha demostrado que *B. adolescentis* ATCC 15703 produce compuesto bioactivos extracelulares en la fase exponencial de crecimiento con propiedades antimutagénicas en contra del Benzo[a]pireno, un hidrocarburo policíclico aromático mutagénico, usado como

indicador de altos niveles de contaminación ambiental (Chalova et al., 2008). Por último se ha descrito como adyuvante del tratamiento de trastornos mentales como la ansiedad y la depresión (Jang, Jang, Han, & Kim, 2018). A pesar de ello, es menos frecuente usar a *B. adolescentis* como probiótico (Casaro et al., 2018). Por lo tanto, una caracterización más detallada de esta cepa respecto a la capacidad de sus enzimas para metabolizar fructanas largas y de estructura compleja incrementará el conocimiento que se tiene de ella y contribuirá a definir si puede ser candidata para la elaboración de productos para su comercialización.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## 2. Planteamiento del problema

Es bien sabido que el hábitat dónde se desarrolla la microbiota intestinal tiende a moldear el genoma de los microorganismos para su adaptación al entorno. Dicho de otra forma, las diferencias que existen entre las especies que conforman la microbiota intestinal son consecuencia de la adquisición y/o pérdida de genes a través del tiempo que le permiten competir contra otras especies en un ambiente en particular. Así pues, el análisis del genoma de las bifidobacterias sugiere una alta capacidad para fermentar carbohidratos complejos. Entre ellos, las fructanas, que destacan por su capacidad prebiótica y su valor comercial. Estos polímeros de fructosa estimulan el crecimiento de las bifidobacterias en el TGI humano. Aunque, diversos estudios demuestran que no todas las cepas tienen la capacidad de degradar una amplia variedad de fructanas. Por ello, surge el interés por investigar a que se deben estas diferencias entre cepas y entender cómo las bifidobacterias aprovechan estas fuentes de carbono para su crecimiento y competitividad en el nicho ecológico que habitan. Para ello, se han estudiado las  $\beta$ -fructofuranosidasas, enzimas involucradas en la degradación de fructanas. En particular, se ha reportado que la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 metaboliza fructanas largas y de estructura compleja y posee 2  $\beta$ -fructofuranosidasas, una de ellas con características bioquímicas peculiares, incluidas la estabilidad térmica a 50 °C por horas y actividad sobre diversas fructanas. Sin embargo, no se sabe si su capacidad para metabolizar fructanas largas y de estructura compleja está asociada a un determinado tipo de  $\beta$ -fructofuranosidasa, por lo tanto, se requiere caracterizar las propiedades de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de otras especies. En este estudio se



caracterizarán las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas de la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703 con esa finalidad.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

### 3. Justificación

El análisis de los genomas de bifidobacterias reportados hasta el momento en la base de datos del NCBI, sugiere que la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703, posee 2  $\beta$ -fructofuranosidasas, con un 27% de identidad entre ellas, las cuáles no han sido caracterizadas. Estas enzimas poseen un tamaño similar a las enzimas de la cepa *B. longum* ATCC 15697. No obstante, presentan entre ellas y con otras reportadas de un 13 a un 25% de diferencias a nivel de secuencia de aminoácidos. Por otra parte, *B. adolescentis* es la especie bifidobacteriana más abundante del grupo etario de jóvenes y adultos, por lo cual, sería interesante estudiar las características de las enzimas de esta cepa en su forma recombinante y comparar sus propiedades bioquímicas con las de la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 a fin de incrementar la información respecto de la especie *B. adolescentis*, cuyo uso en la industria alimenticia es escaso en comparación con otras especies. Asimismo, la caracterización de estas enzimas nos permitirá establecer si la capacidad de metabolizar fructanas largas y de estructura compleja está asociada a un determinado tipo de  $\beta$ -fructofuranosidasa o a algunas cepas en particular, confiriéndoles características metabólicas distintas.

### 4. Hipótesis

Las características moleculares y bioquímicas de las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas de la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703, así como su capacidad para metabolizar fructanas diversas, difieren entre sí.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general.

Establecer las similitudes y diferencias en las características moleculares y bioquímicas de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703.

### 5.2 Objetivos específicos

- a) Realizar la caracterización molecular de las  $\beta$ -fructofuranosidasas B.ad1(637) y B.ad2(518).
- b) Producir y purificar las proteínas recombinantes B.ad1(637) y B.ad2(518).
- c) Analizar el comportamiento electroforético de B.ad1(637) y B.ad2(518) en geles de actividad enzimática.
- d) Determinar las características bioquímicas de la enzima y su afinidad por diferentes sustratos

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Identificación de $\beta$ -fructofuranosidasas en bifidobacterias mediante la minería de datos y elaboración del dendograma.

Se analizaron los genomas completos de las cepas de bifidobacterias secuenciadas y depositadas en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para obtener las secuencias pertenecientes a la familia glicosil hidrolasa 32 (GH32), a la cual pertenecen las  $\beta$ -fructofuranosidasas. Se recuperaron 170 secuencias pertenecientes a 138 cepas diferentes. De ellas, 99 fueron secuencias idénticas y se eliminaron para este estudio. A partir de las 71 secuencias restantes y agregando la invertasa de *Thermotoga maritima* ATCC 43589 (PDB 1W2T\_A) se realizó un alineamiento con el software protein-protein BLAST del NCBI. Posteriormente, con la información del alineamiento, se construyó un dendograma con base en la distancia genética de las secuencias analizadas utilizando los parámetros preestablecidos del algoritmo Blast Tree.

### 6.2 Construcción del modelo tridimensional de B.ad1(637) y B.ad2(518)

A partir de las 2 secuencias seleccionadas del genoma de *B. adolescentis* ATCC 15703 se generaron los modelos tridimensionales en el servidor de I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) mediante el modelamiento por homología utilizando como plantilla la estructura cristalográfica de la  $\beta$ -fructofuranosidasa de *B. longum* KN29.1 (PDB: 3PIG\_A) reportada por Bujacz, Jedrzejczak-Krzepkowska, Bielecki, Redzynia, & Bujacz en 2011.

### **6.3 Construcción de los plásmidos pET22-*B.ad1*(637) y pET22-*B.ad2*(518).**

Los genes que codifican las  $\beta$ -fructofuranosidasas *B. ad1*(637) y *B.ad2*(518) de la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703 con número de acceso GeneBank: BAF40106.1 y BAF39931.1, respectivamente, fueron sintetizados con el uso preferencial de codones para *Escherichia coli* por la compañía GenScript y clonados en el vector de expresión pET-22b(+) en los sitios de restricción NdeI y XhoI. Los plásmidos pET22-*B.ad1*(637) y pET22-*B.ad2*(518) fueron introducidos en células competentes de *E. coli* Rosetta™ 2. Las clonas transformadas se seleccionaron en placas de agar Luria-Bertani (LB) adicionadas con ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL.

### **6.4 Cultivo de células transformadas de *E. coli* Rosetta™ 2.**

Se prepararon, por duplicado, 2 matraces con 15 y 150 mL de medio de cultivo LB (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%). Inmediatamente, los cuatro matraces fueron esterilizados en un Autoclave Vitale Class CD 21 con los valores patrones del programa "Líquidos". Luego, se atemperaron los matraces y se añadió a cada uno ampicilina para alcanzar una concentración final de 100  $\mu$ g/mL.

El preinóculo se realizó añadiendo células de *E. coli* Rosetta™ 2, transformadas con el plásmido pET22-*B.ad1*(637) o con el plásmido pET22-*B.ad2*(518), a un matraz con 15 mL de cultivo LB estéril adicionado con ampicilina. El preinóculo se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación constante de 150 rpm.

Posteriormente, se cuantificó el crecimiento de ambos preinóculos a 600 nm en un espectrofotometro OPTIZEN POP UV/VIS y se agregó la cantidad necesaria

de cada preinóculo, para iniciar a una densidad óptica (D.O.<sub>600</sub>) de 0.05, a cada matraz de 150 mL de cultivo LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C con agitación constante de 150 rpm hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.6. En ese momento, se indujo la expresión de las proteínas B.ad1(637) y B.ad2(518) añadiendo 1 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e incubando durante 14 horas a 22 °C con agitación constante de 150 rpm.

### **6.5 Obtención del extracto enzimático.**

Las células se recuperaron por medio de centrifugación (15 minutos a 7,530 rpm a 4 °C) en una centrifuga 5430 R eppendorf. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con 15 mL amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0. Luego se suspendieron con la cantidad necesaria de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0 para alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de  $3 \times 10^8$  células. La suspensión fue sometida a ruptura mecánica por medio de un sonicador 130-Watt Ultrasonic Processor Modelo CV18 (cuatro ciclos de 10 s encendido / 30 s apagado a 60% de amplitud). Los restos celulares se separaron del extracto proteico soluble por medio de centrifugación en una centrifuga 5430 R eppendorf (10 minutos a 14,000 rpm a 4 °C). Los extractos enzimáticos se separaron con una micropipeta de los restos celulares y se conservaron bajo refrigeración a 4 °C.

### **6.6 Purificación de las proteínas B.ad1(637) y B.ad2(518).**

Se utilizó una columna HiTrap™ HP (1 mL) previamente tratada con NiSO<sub>4</sub> 0.1 M y equilibrada con el amortiguador de unión A (fosfato de sodio 20 mM, 0.5 M de NaCl y 20 mM de Imidazol, pH 7.0). Cada extracto enzimático se diluyó 1:5 con el amortiguador de unión y se recirculó 2 veces en la columna. Luego, la columna



fue lavada con 10 volúmenes de amortiguador de unión y 5 volúmenes con amortiguador de unión B (fosfato de sodio 20 mM, 0.5 M de NaCl y 40 mM de Imidazol, pH 7.0). Posteriormente se realizó la elución de las proteínas usando 5 mL de amortiguador de elución en un gradiente lineal de Imidazol al 20, 50, 60 y 100% (100, 250, 300 y 500 mM de Imidazol, respectivamente, fosfato de sodio 20 mM, 0.5 M de NaCl, pH 7.0) a un flujo de 1 mL/min. Las fracciones puras se unieron y dializaron mediante una membrana semipermeable de 12 kDa contra una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM pH 6.0 durante 24 horas a 4 °C.

### **6.7 Preparación de geles para electroforesis de proteínas.**

Las proteínas puras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), según lo propuesto por Laemmli (1970); con algunas modificaciones. Se colocaron 30 µg de cada muestra con amortiguador de carga con concentración final de 1X. La electroforesis se desarrolló utilizando una cámara de Bio-Rad a 10 mA. Los geles se tiñeron utilizando el reactivo GelCode Blue Stain (Thermo Scientific), y se destiñeron siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

### **6.8 Cuantificación de proteína.**

La proteína total del extracto enzimático y la proteína pura se determinó por el método de Bradford usando el sistema Protein Assay (Bio-Rad), una curva estándar de seroalbúmina bovina (Sigma) y un espectrofotómetro OPTIZEN POP UV/VIS a 595 nm.

### **6.9 Ensayo estándar de actividad enzimática.**

Se midió la velocidad de liberación del poder reductor obtenido a partir de la hidrólisis del sustrato mediante la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller 1959). La actividad enzimática para B.ad1(637) y B.ad2(518) se determinó a pH 6.0 y 5.5 respectivamente, en buffer de fosfatos 100 mM a 50 °C, con una concentración final de sustrato de 1% (p/v) en un volumen final de reacción de 500 µL. Los ensayos se realizaron por duplicado. A 50 µL de muestra o su dilución, según el caso, se le agregaron 50 µL de reactivo de DNS, se calentaron a 95 °C durante 5 minutos y se enfriaron en hielo durante otros 5 minutos. Luego, se agregaron 500 µL de agua y se midió la absorbancia a 540 nm en un UV/VIS Espectrofotómetro OPTIZEN POP. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de extracto enzimático o enzima pura requerida para obtener un µmol de azúcares reductores equivalentes a fructosa por minuto.

### **6.10 Efecto de la temperatura y pH y estabilidad térmica.**

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se evaluó midiendo la actividad de las enzimas a pH 6.0, bajo las condiciones descritas previamente, en un rango de temperaturas de 25 a 60 °C, utilizando Raftilosa Sinergy 1 al 1% (p/v) como sustrato.

El efecto del pH se determinó a la temperatura óptima obtenida, con los valores de pH en el rango de 4.5 a 8.0, utilizando Raftilosa Sinergy 1 al 1% (p/v) como sustrato utilizando diferentes amortiguadores: acetatos (pH 4.5 – 5.5), fosfatos (pH 5.5 – 8.0).

La estabilidad térmica se evaluó incubando las enzimas durante 15 minutos a pH óptimo y a las temperaturas de 45 y 50 °C para B.ad1(637); y 50 y 55 °C para B.ad2(518). Después del período de incubación se tomaron muestras de la enzima y se determinó la actividad residual. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### **6.11 Actividad relativa sobre diferentes sustratos.**

Para analizar la preferencia de cada  $\beta$ -fructofuranosidasa sobre diferentes sustratos se utilizaron como sustratos fructanas con diferentes estructuras y grados de polimerización: Oligofructosa p95, Raftilosa Sinergy 1, Agavina, Raftilina HP, Inulina de *Leuconostoc citreum*, Levana SacB 8.3, Levana B512, y Sacarosa. Las condiciones utilizadas para todos los sustratos fueron las mismas que las del ensayo estándar de actividad enzimática reportado en la sección 6.9.

### **6.12 Zimogramas.**

Para observar la actividad enzimática en geles, se realizó un análisis por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% según lo descrito Laemmli (1970). El gel se adicionó con una solución de inulina de *L. citreum* para obtener una concentración final de 1%. Con la finalidad de no desnaturalizar de manera irreversible las proteínas, se utilizó el amortiguador de carga sin  $\beta$ -mercaptoetanol y las muestras no se calentaron antes de cargarlas en el gel. Se cortó el gel en dos partes, la mitad que contenía el marcador de peso molecular se tiñó de la forma descrita en la sección 6.7. El resto del gel se lavó tres veces por 15 minutos con una solución que contenía amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.0 y Tween 80 al 1% a fin de renaturalizar las enzimas. Posteriormente se lavó una vez con amortiguador

de fosfatos 100 mM pH 6.0 y se dejó incubando en el mismo amortiguador durante 18 horas a 35 °C.

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

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## 7. Resultados

### 7.1 Identificación y clasificación de cepas de bifidobacterias con base en sus $\beta$ -fructofuranosidasas.

Se identificaron las secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas que pertenecen a la familia glicosil hidrolasa 32 (GH32) a partir de la información de los genomas de bifidobacterias depositados en la base de datos del NCBI. Dichas secuencias codifican para  $\beta$ -fructofuranosidasas hipotéticas en su mayoría ya que no han sido caracterizadas y reportadas en la literatura. Hasta la fecha se han anotado 1042 genomas bifidobacterianos, los cuáles provienen de 72 especies de bifidobacterias. De estos genomas, solo 138 han sido secuenciados por completo y a partir de ellos se identificaron 170 secuencias de aminoácidos clasificadas dentro de la familia GH32, a la cual pertenecen las  $\beta$ -fructofuranosidasas. Es importante mencionar, que aunque la mayoría de los genomas analizados poseen solo una secuencia perteneciente a la familia GH32, existen 50 genomas que poseen dos secuencias. Se observó que la presencia de dos diferentes secuencias de la familia GH32 en un mismo genoma no es dependiente de especie puesto que, entre las diferentes cepas de una misma especie, solo alguna de ellas poseen esta característica.

Por otra parte, se observó que las secuencias de la familia GH32 analizadas poseen un amplio rango de tamaño que va desde los 390 hasta los 642 aminoácidos. A pesar de ello, todas las secuencias analizadas poseen los 3 residuos asociados a la catálisis. El aspártico del motivo RDP que ayuda a posicionar el azúcar para que se lleve a cabo la hidrólisis, el aspártico del motivo

DPN y el glutámico del motivo ECP involucrados directamente en la catálisis. Esto corrobora que se trata de  $\beta$ -fructofuranosidasas.

Mediante la técnica de agrupamiento se construyó un dendograma con base en la distancia genética de las secuencias. Como se observa en la figura 1, las  $\beta$ -fructofuranosidasas se agrupan claramente en tres grupos. De las 170 secuencias investigadas: el grupo 1 (recuadro verde) representa el 17.64% de las secuencias, tienen un tamaño entre 463 y 488 aminoácidos y son las más cercanas al ancestro común más reciente (MRCA, por sus siglas en inglés). Además, la mayoría de las secuencias del grupo 1 se caracteriza por los motivos conservados DCM, RDP y EMP. En estos motivos se encuentran los residuos catalíticos aspártico, aspártico, y glutámico, respectivamente. El grupo 2 (recuadro amarillo) engloba el 70.58% de las secuencias. Conviene subrayar, que todas las cepas bifidobacterianas incluidas en este estudio poseen una secuencia del grupo 2 en su genoma, las cuales se caracterizan por tener un tamaño en el rango de 390 a 538 aminoácidos. No obstante, la mayoría de las secuencias del grupo 2 poseen 518 y 532 aminoácidos, que corresponde a un 67.5 y 22.5%, respectivamente. Asimismo, los motivos conservados en las secuencias ubicadas en el grupo 2, (DPN, RDP y ECP) son los que mejor describen a las secuencias de la familia GH32 ya que son los predominantes. Por último, el 11.76% de las secuencias se agrupan en el grupo 3. Este grupo se identifica por tener secuencias de mayor tamaño, en un rango de 608 a 642 aminoácidos y sus motivos conservados son los mismos descritos para el grupo 2.





Al analizar el origen de las secuencias de cada grupo del dendograma, se observó que las 50 cepas de bifidobacterias que poseen dos  $\beta$ -fructofuranosidasas en su genoma tienen ya sea, una secuencia ubicada en el grupo 1 y una secuencia ubicada en el grupo 2 o, una secuencia ubicada en el grupo 2 y una ubicada en el grupo 3. Por lo tanto, las secuencias ubicadas en el grupo 1 y 3 nunca se encuentran juntas y siempre están asociadas a la presencia de otra  $\beta$ -fructofuranosidasa del grupo 2, como se muestra en la tabla 1. Se encontró que son 12 especies, reportadas hasta el momento, las que poseen cepas con 2  $\beta$ -fructofuranosidasas y entre ellas: *B. adolescentis*, *B. longum* y *B. catenulatum* son las que poseen más cepas reportadas con 2  $\beta$ -fructofuranosidasas. Las  $\beta$ -fructofuranosidasas caracterizadas hasta el momento pertenecen a cepas que poseen solo una  $\beta$ -fructofuranosidasa, excepto por el caso de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, que posee 2  $\beta$ -fructofuranosidasas, una de ellas de 636 aminoácidos, ubicada en el grupo 1 del dendograma, reportada por [Ávila-Fernández et al., en 2016](#) denominada B.longum\_I1 y la otra de 518 aminoácidos, B.longum\_I2, ubicada en el grupo 2 del dendograma, caracterizada por [Morales-Contreras & Ávila-Fernández, en 2018](#). Estas enzimas presentan características bioquímicas interesantes que no se sabe si son dependientes de cepa o de las características del grupo de  $\beta$ -fructofuranosidasas al que pertenecen. De acuerdo con la información analizada en la tabla 1, la caracterización de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703 podría contribuir a establecer algunas conclusiones al respecto. Esta cepa pertenece a una especie diferente y posee 2  $\beta$ -fructofuranosidasas ubicadas en los mismos grupos que las caracterizadas para *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697.

Tabla 1. Cepas de bifidobacterias que poseen 2  $\beta$ -fructofuranosidasas.

Especie	Cepa	Rangos de secuencias (n° de aminoácidos)		
		463 a 488	390 a 538	608 a 642
<i>B. adolescentis</i>	ATCC 15703**			
	22L			
	BBMN23			
	1-11			
	6			
<i>B. angulatum</i>	JCM 7096			
	GT102			
<i>B. longum</i>	ATCC 15697*			
	JDM301			
	CCUG30698			
<i>B. breve</i>	UCC2003			
<i>B. dentium</i>	JCM 1195			
	Bd1			
<i>B. catenulatum</i>	JCM 15439			
	PV20-2			
	PV20-2			
<i>B. pseudocatenulatum</i>	12			
<i>B. gallinarum</i>	CACC 514			
<i>B. actinocoloniiforme</i>	DSM 22766			
<i>B. coryneforme</i>	LMG18911			
<i>B. indicum</i>	DSM 20214			
<i>B. thermophilum</i>	12			

\* Las enzimas de la cepa ATCC 15697 han sido previamente reportadas.

\*\* Las enzimas de la cepa ATCC 15703 son caracterizadas en este estudio.

## 7.2 Caracterización molecular de las $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703.

Se llevó a cabo la caracterización molecular de las  $\beta$ -fructofuranosidasas hipotéticas de la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703. Se denominó como B.ad1(637) a la enzima de 637 aminoácidos, y B.ad2(518) a la enzima de 518 aminoácidos. Se realizó el análisis comparativo mediante el alineamiento secuencias de aminoácidos

de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703 y las de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15796 utilizando el servidor clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). En la figura 2 se muestra el alineamiento entre B.longum\_I1 (ACJ53120.1) y B.ad1(637) (BAF40106.1). Mientras que en la figura 3 el alineamiento entre B.longum\_I2 (ACJ51890.1) y B.ad2(518) (BAF39931.1). Se observa que todas las secuencias comparten los motivos conservados DPN, RDP y ECP, dentro de los que se encuentran los residuos Asp131, Asp269, y Glu375 en B.ad1(637) que corresponden a los aminoácidos involucrados en el reconocimiento del sustrato y en la catálisis de la enzima. Dichos residuos corresponden al Asp54, Asp181 y Glu235 en B.ad2(518).

A pesar de que las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703 tienen un tamaño muy similar a las enzimas de *B. longum* ATCC 15697 existen claras diferencias entre ellas. La identidad es del 75% entre B.longum\_I1 y B.ad1(637) y del 87% entre B.longum\_I2 y B.ad2(518) a nivel de secuencia de aminoácidos.

BAF40106.1	MSNTYSISVETGGYRQLDLFAERCGEGNAVVTADGNGVAIAAHTMPIAERRHHFSIAVP	60
ACJ53120.1	MPDNYSVAIETGGYRLLLELFAERCGDDA-AVTITDGDGHQIASHVMPVAERRHRFLIPVP	59
BAF40106.1	QKSTVTVAASGLVVRFGYLSECDLLDNGVRYVNMNPSDTDWPQPTLEQIYNRFGRSGA	120
ACJ53120.1	TNVCLTVRARQLTVRFAYLSECNLLDEGVRFISMNPYDNEWDTPQPTLDQIYDRFARPA	119
BAF40106.1	HFEFFARWMNDPNGLCQFQGRYHLFFQLNPYGFWDNMHWGHAVSRDLVHWTHLPVFLEP	180
ACJ53120.1	HFEFFARWMNDPNGLCRFQGRYHLFYQFNYPYGFWDNMHWGHAVSRDLVHWTHLPVIFLEP	179
BAF40106.1	QPFLHTDERIVGGAFSGSAVTVDHNDNPVAGNEANAIRLYLTRHLETRGDESSVTEYQTT	240
ACJ53120.1	QPFLHTDERIVGGAFSGSAVTVDAQDNPCKGDDAAAIRLYLTRHLETRGDESSVTEYQTT	239
BAF40106.1	CLCEDGVHVRVESPVALARNDDFGYDFRDPKVECGMGGEALDPDRAYMVTATNLPVSEFG	300
ACJ53120.1	CLCEDGVHVSVEPVALARVNDGFGDFDRDPKVECTGMGGEAIDPERAYMVTATNLPVAEFD	299
BAF40106.1	ADAADSAPVPGISTQNTGGWFTYSPOGKPGVDQPNNAVTPAMTLFSAKKPLKRNVTWRYEG	360
ACJ53120.1	TDVSSAAPGISVQCTDGFWTGCPQGMPTDKPNMMDTPAMALFSAKKPLKRNVTWQYEG	359
BAF40106.1	PVLADFGHQIARTYECEDLQVDGVTVAVGALMHYRDKQGRFQVRWYAGDLVNTDNGPK	420
ACJ53120.1	PVLADFGHQLSRTYECEDLQVDGKTVAGALMHYRDKQGRFQVRWYVGDLDKDTADGPR	419
BAF40106.1	LDVKASDWCDFGTGYATQSFADNRRIVFGWFTDFPEMRVEQCLANGMMSLPRELHV	480
ACJ53120.1	LQVGNSDWCDFGTGYATQSFADNRRIVFGWYDFPAMRVEKCIANGMMSLPRELHV	479
BAF40106.1	RDGRLYSKPVSEVYRELLGERLAVHGDGDMVVTAPGNAYYANVHLADDADAIMVLAKGV	540
ACJ53120.1	RDGRRLTSRPVKEVYEQLLGDRLEAHADENGTFFIVPNNAYYTMHLADDDDFTMLIATGT	539
BAF40106.1	NPQDGRPTELLQRTDGVTRLVAKGTAVEDVDFDSGITDVRQVEVFFDRNVVEVFLNGGQ	600
ACJ53120.1	NSANGNSMELQLQRRDGVTRLVTKGTVDIDFDSGIADVRRVEIFFDRNVVEVFLNNGE	599
BAF40106.1	TAGSMLFQGADGDGELRIASSGKIDAVDARALNGIWR	637
ACJ53120.1	AAGSMLFQGADGDGEFRFVADGKVDVDRVRLDGIWR	636

**Figura 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 (ACJ53120.1 – B.longum\_11) y *B. adolescentis* ATCC 15703 [BAF40106.1 – B.ad1(637)].** Resaltados en amarillo se muestran los residuos de cisteínas. En letras naranja se muestran los motivos conservados. La línea azul indica la sección correspondiente al dominio  $\beta$ -propela y la línea verde al  $\beta$ -sándwich.

BAF39931.1	MTGFTPDAPVLHEIKNHSEELTKAEAGVAFAAKRNNRWYPKFHIASNGGWINDPNGLCF	60
ACJ51890.1	MTGFTPDAPVLHEIKDHSEALAQAEAGVAAMAERNNRWYPKFHIASNGGWINDPNGLCF	60
BAF39931.1	YKGRWHVFYQLHPYGTQWGPMPHWGHVSSADMVNWKREPIMFAPSLEEEKDGVFSGSAVIG	120
ACJ51890.1	YKGRWHVFYQLHPYGTQWGPMPHWGHVSSDMLNWKREPIMFAPLLEEEKDGVFSGSAVIG	120
BAF39931.1	DDGKLFYITGHRWANGKNTGGDWQVQMLAEPDNDELTSATKRGMVIDCPTDKVNHHR	180
ACJ51890.1	DDGELKFYITGHRWANGQDNTGGDWQVQMLAEPDNDELTSATKRGMIIDCPTDKVDHHR	180
BAF39931.1	DPKVVWKTGDKWYMTFGVSSAEKRGQMWLFSSDDMVKWTYEQVLFEPDSDNVFMLECPDF	240
ACJ51890.1	DPKVVWKTGDTWYMTFGVSSADKRGQMWLFSSKDMVWRWEYERVLQHPDPDVFMLECPDF	240
BAF39931.1	PIKDVEGNEKQWVIGFSAMGAKPSGFMNRRVNNAGYMITWTPGEQFKPETEFRLWDCGHN	300
ACJ51890.1	PIKDKDGNKQWVIGFSAMGSKPSGFMNRRVNNAGYMITWEPGGEFKPETEFRLWDCGHN	300
BAF39931.1	YYAPQSFNDGKROIVYGWMSPFVQPIPMQDDGWCNLTLPREITLGADGDLHTAPVAEME	360
ACJ51890.1	YYAPQSFNVDGROIVYGWMSPFVQPIPMEDDGCGLTLPREITLGDDGDDVVTAPVAEME	360
BAF39931.1	GLREDTVDFGAIIDLVSGETIVDDAEAVEIEMTIDLANSTAERAGLRVHATEDGAYTSV	420
ACJ51890.1	GLREDTLDHGSITLDMDGEOVIADDAEAVEIEMTIDLAASTAERAGLKIHATEDGAYTYV	420
BAF39931.1	AYDDQIGRVVVDQRANAQGDRGYRTAPLSEAELAAGELKLRVYVDRGQVEVYVNDGRQVL	480
ACJ51890.1	AYDDQIGRVVVDQRAMANGDRGYRAAPLDTELASGKLDLRFVDRGQVEVYVNGGHQVL	480
BAF39931.1	SSYSYASEGPRAIKLVAESGSLKVKSLVLLHMKSIGLE	518
ACJ51890.1	SSYSYASEGPRAIKLVAESGSLKVDLRLHMKSIGLE	518

**Figura 3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 (ACJ51890.1 – B.longum\_I2) y *B. adolescentis* ATCC 15703 [BAF39931.1 – B.ad2(518)]. Resaltados en amarillo se muestran los residuos de cisteínas. En letras naranjas se muestran los motivos conservados. La línea azul indica la sección correspondiente al dominio  $\beta$ -propela y la línea verde al  $\beta$ -sándwich.**

Como se observa en la figura 2, las mayores diferencias entre B.ad1(637) y B.longum\_1 se encuentran distribuidas en dos zonas: en los primeros 120 aminoácidos del extremo N-terminal donde se ubica el  $\alpha$ -hélice característica del inicio las  $\beta$ -fructofuranosidasas de las bifidobacterias y al comenzar la región C-terminal que corresponde al dominio  $\beta$ -sándwich. Por otro lado, las diferencias entre Bad2(518) y B.longum\_I2 se localizan principalmente a lo largo de la región C-

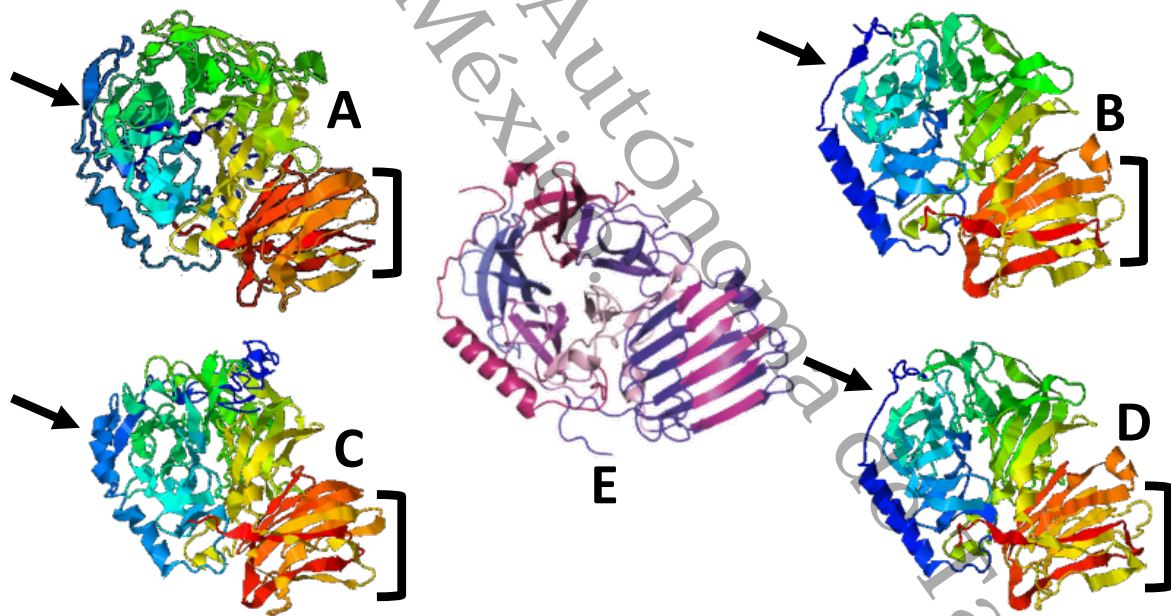


terminal del  $\beta$ -sándwich (Figura 3). Una característica particular de la enzima B.longum\_I1 es que posee 13 residuos de cisteína. Casi el doble de lo reportado para las otras 8  $\beta$ -fructofuranosidasas (5 a 7 cisteínas) de bifidobacterias anteriormente reportadas (Ávila-Fernández et al., 2016). Esta característica no se conserva en las enzimas de *B. adolescentis* ATCC 15703, B.ad1(637) y B.ad2(518), que solo contienen 6 y 9 residuos de cisteína, respectivamente.

### 7.3 Modelos tridimensionales de las $\beta$ -fructofuranosidasas.

Se construyeron los modelos tridimensionales por homología de las enzimas B.ad1(637), B.ad2(518), B.longum\_I1 y B.longum\_I2, utilizando el software I-TASSER. Dichos modelos fueron construidos con base en la estructura cristalográfica de la  $\beta$ -fructofuranosidasa de *B. longum* KN29.1 (PDB: 3PIG). Los modelos tridimensionales muestran el plegamiento típico de las proteínas de la familia GH32, que consiste de dos dominios: un dominio N-terminal con un  $\alpha$ -hélice al inicio y un plegamiento tipo  $\beta$ -propela de 5 hojas que incluye al sitio catalítico y un dominio C-terminal formado por un  $\beta$ -sándwich. Sin embargo, se pueden observar las siguientes diferencias entre las estructuras tridimensionales de B.ad1(637) y B.longum\_I1, que corresponden a las letras A y C, respectivamente (Figura 4). Primero, el  $\alpha$ -hélice de B.ad1(637) contiene 3 vueltas unidas a una lamina  $\beta$  mediante loops, mientras que el  $\alpha$ -hélice de B.longum\_I1 conserva 6 vueltas. También, en el dominio  $\beta$ -sándwich se aprecian diferencias en el acomodo de las laminas  $\beta$ . De igual forma, se aprecian algunas diferencias entre las estructuras tridimensionales de B.ad2(518) y B.longum\_I2, que se muestran con las

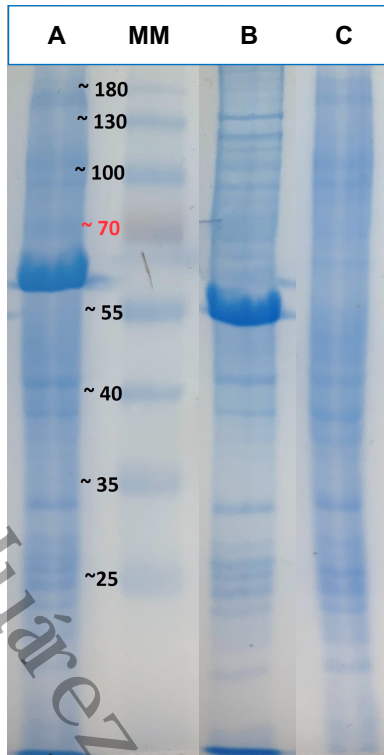
letras B y D, respectivamente (Figura 4). La región N-terminal de B.ad2(518) contiene una lamina  $\beta$  después del  $\alpha$ -hélice, mientras que esta estructura secundaria se encuentra ausente en B.longum\_I2, al igual que la estructura cristalográfica que sirvió de molde para realizar estos modelos (PDB:3PIG), esto puede ser un efecto de las pocas diferencias observadas en el alineamiento de estas enzimas al inicio del dominio N-terminal (Figura 3). Además, aunque las mayores diferencias a nivel de secuencia se observaron en el  $\beta$ -sándwich no parecen tener una influencia muy clara en el plegamiento de esta región en B.ad2(518) y B.longum\_I2.



**Figura 4. Modelos tridimensionales de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703 y *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697, creados en el servidor I-TASSER, A: B.ad1(637); B: B.ad2(518); C: B.longum\_I1 y D: B.longum\_I2; E: PDB: 3PIG (*B. longum* KN29.1). En cada imagen, la flecha indica el  $\alpha$ -hélice del dominio N-terminal y el corchete indica el dominio  $\beta$ -sandwich.**

#### 7.4 Producción de las enzimas recombinantes B.ad1(637) y B.ad2(518).

Las enzimas recombinantes B.ad1(637) y B.ad2(518) se produjeron utilizando el sistema de expresión heterólogo *E. coli* mediante el vector de expresión pET-22b(+). Las enzimas producidas contienen unido al extremo C-terminal una etiqueta de 6 residuos de histidina que fueron añadidos a la secuencia de aminoácidos mediante el vector de expresión para facilitar su purificación. Considerando la adición de la etiqueta de histidinas, el peso molecular calculado para las enzimas en el servidor de ExPASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) fue de 70.97 kDa y 58.94 kDa para B.ad1(637) y B.ad2(518), respectivamente. En la figura 5 se muestra una fotografía del gel SDS-PAGE al 12% con el que se identificó la sobreproducción de la enzima y se estimó su peso molecular. En los carriles A y B se observa una banda de mayor intensidad, que corresponde a la sobreexpresión de B.ad1(637) y B.ad2 (518), respectivamente. El peso molecular calculado con respecto al marcador de peso molecular es de ~ 62 kDa para B.ad1(637) y ~ 55 kDa para B.ad2(518). Por lo tanto, los pesos observados en la figura 4 son inferiores al peso molecular esperado para ambas proteínas.



**Figura 5. SDS-PAGE del extracto proteico después de la producción de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703. A: Extracto enzimático B.ad1(637); B: Extracto enzimático B.ad2(518); C: Extracto enzimático control. MM: Marcador de peso molecular.**

### 7.5 Purificación de las enzimas recombinantes.

La purificación de las enzimas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos. Los resultados de la purificación se muestran en las tablas 2 y 3. La enzima B.ad1(637) fue purificada 42 veces y se recuperó el 64% de la actividad enzimática y la enzima B.ad2(518) fue purificada 21 veces y se recuperó 41% de la actividad enzimática.

**Tabla 2. Purificación de B.ad1(637)**

Etapa de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	Grado de purificación	Rendimiento (%)
<b>EE</b>	0.7	70.35	758.4	10.77	1	100
<b>IMAC</b>	4	1.06	490.66	460.18	42	64

EE: extracto enzimático.

IMAC: Cromatografía por afinidad por iones metálicos inmovilizados.

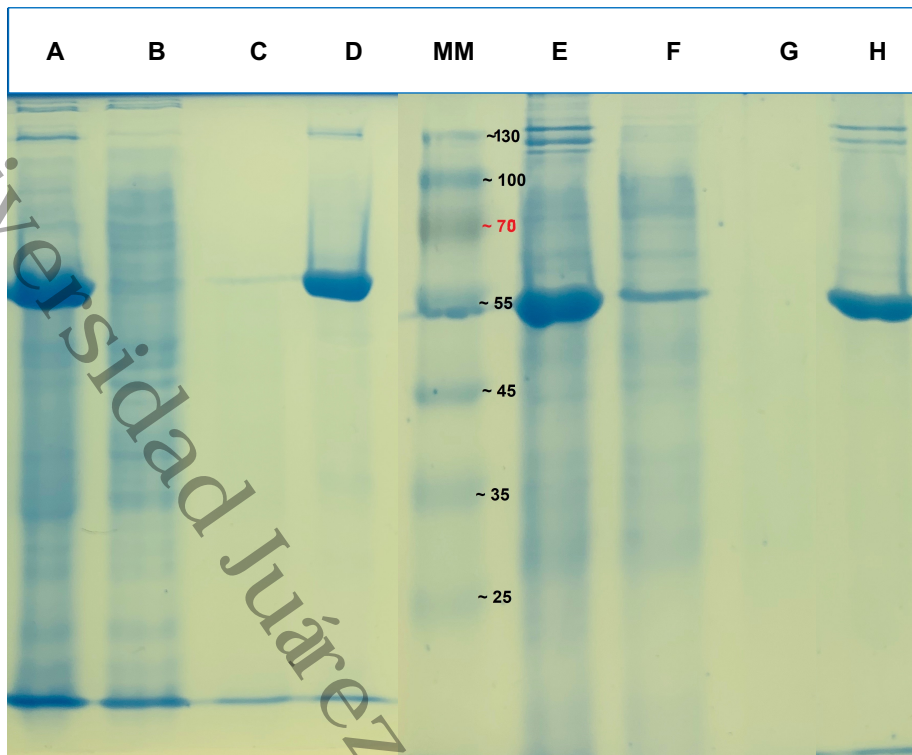
**Tabla 3. Purificación de B.ad2(518)**

Etapa de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad Total (U)	Actividad específica (U/mg)	Grado de purificación	Rendimiento (%)
<b>EE</b>	0.8	55.6	496.5	8.93	1	100
<b>IMAC</b>	5	1.1	208.35	189.41	21	41

EE: extracto enzimático.

IMAC: Cromatografía por afinidad por iones metálicos inmovilizados.

En la figura 6 se muestra el resultado del proceso de purificación de las enzimas B.ad1(637) y B.ad2(518). En el carril D se muestra la enzima B.ad1(637) purificada y el carril H la enzima B.ad2(518) purificada. El peso molecular observado de las enzimas puras (carriles D y H) fue el mismo que para las bandas de sobreexpresión del extracto proteico: ~ 62 kDa para B.ad1(637) y ~ 55 kDa para B.ad2(518) (carriles A y E). Nótese que, en ambos carriles de las proteínas puras, coexisten otras bandas de mayor peso molecular. En el caso de B.ad1(637), una banda mayor de 130 kDa y en B.ad2(518), se observan dos bandas entre 100 y 130 kDa.



**Figura 6. SDS-PAGE de la purificación de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703. B.ad1(637) (Carriles A a D). B.ad2(518) (Carriles E a H). A y E: Extracto enzimático; B y F: Recirculado; C y G: Lavado; D y H: Proteína pura; MM; Marcador de peso molecular.**

### 7.6 Análisis de actividad enzimática por zimografía.

Se comparó la actividad enzimática de B.ad1(637) y B.ad2(518) mediante zimografía. Se utilizó Inulina de *L. citreum* al 1% como sustrato en los geles de actividad enzimática y los resultados se muestran en la figura 7. Se observó que las dos enzimas tienen actividad enzimática sobre inulina de *L. citreum*. En el carril A, observamos un halo prominente de ~ 62 kDa, que corresponde a la enzima B.ad1(637) pura y en el carril C, uno de ~ 55 kDa que corresponde a la enzima pura B.ad2(518). En ambos casos, se observa que existen múltiples halos de actividad enzimática de mayor peso molecular al esperado para estas enzimas. Estos corresponden a los pesos moleculares que se observan en el gel de poliacrilamida



teñido con azul de Comassie (Figura 6) en los carriles que muestran las enzimas puras (carriles D y H). Dado que ninguna proteína de *E. coli* tiene actividad sobre el sustrato utilizado en la zimografía, este resultado corrobora que las bandas observadas en los carriles D y H de la figura 6 corresponden a formas activas de las  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes purificadas. Las bandas de mayor tamaño pueden corresponder a formas multiméricas de la enzima.

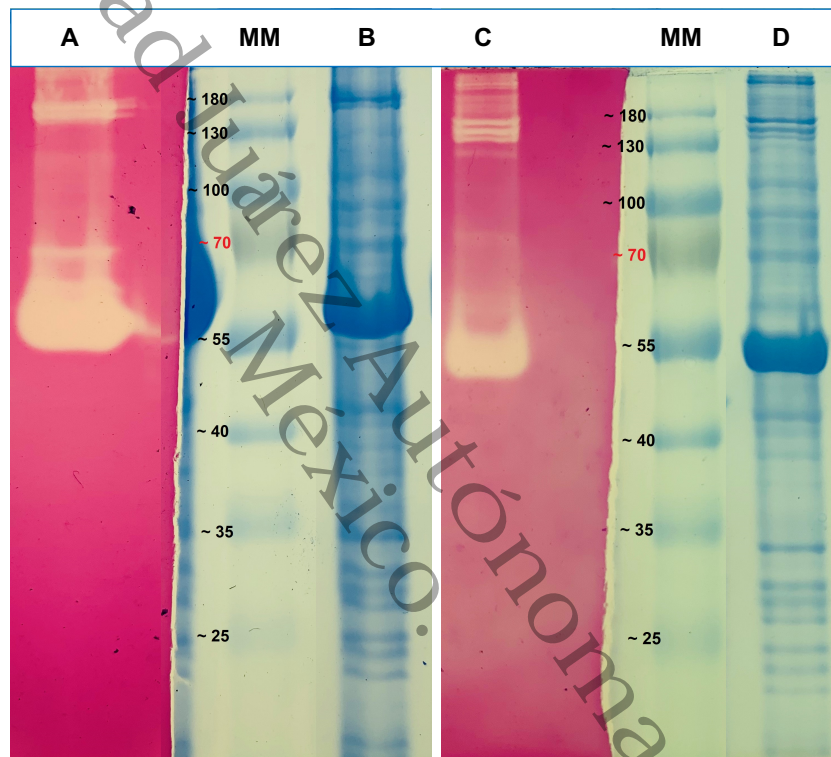


Figura 7.. Zimografía de las  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de *B. adolescentis* ATCC 15703 realizada en un gel de agarosa con inulina *L. citreum* al 1%. A y B, B.ad1(637); C y D, B.ad2(518); A y C: Tinción con el reactivo de Schiff; B y D: Tinción con el reactivo GelCode Blue Stain.

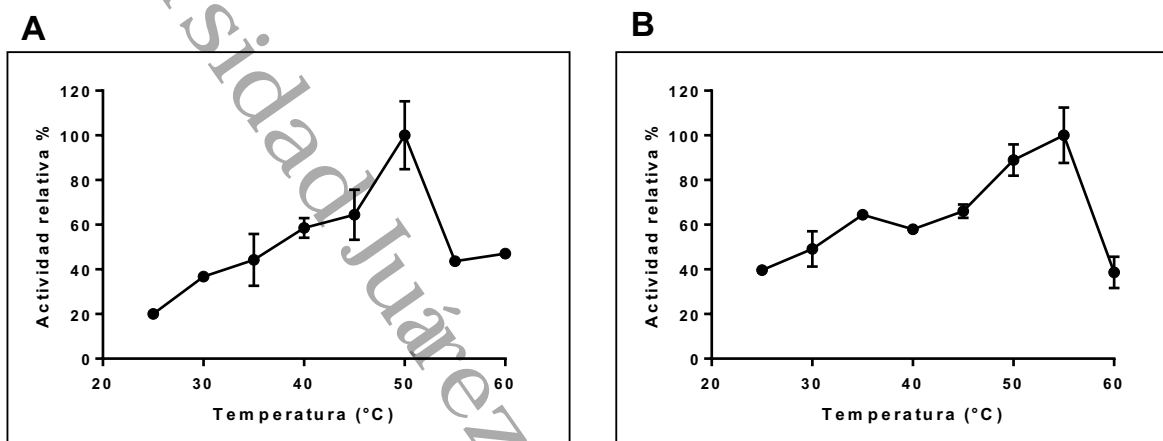
## 7.7 Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes.

### a) Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

Para conocer la temperatura óptima de las enzimas B.ad1(637) y B.ad2(518) se evaluó la actividad enzimática sobre Raftilosa Sinergy 1 al 1% en un rango de

temperatura de 25 a 60 °C a pH 6.0. En la figura 8 se muestra la representación del efecto de la temperatura sobre estas enzimas.

Se determinó que la temperatura óptima de B.ad1(637) es de 50 °C (Figura 8 A). Mientras que para B.ad2(518) es de 50 a 55 °C (Figura 8 B).



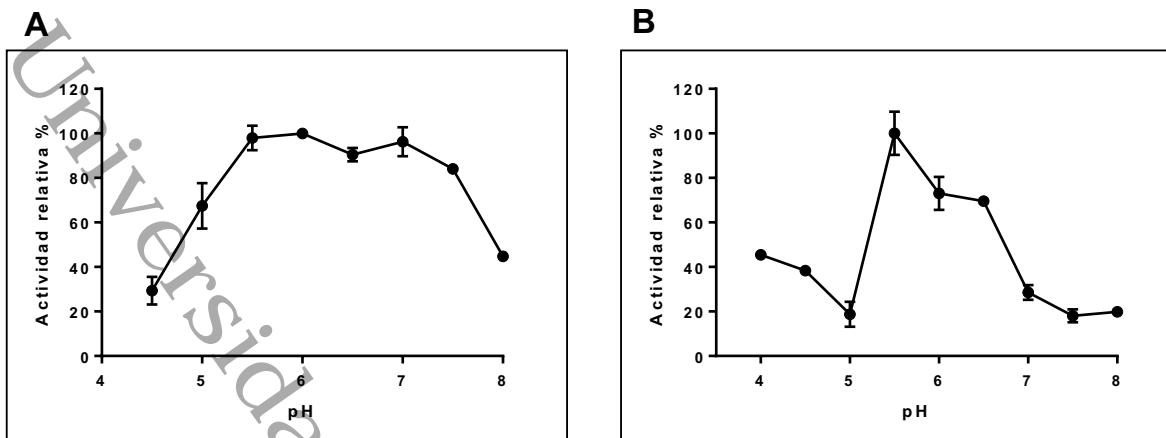
**Figura 8. Efecto de la temperatura en la actividad de las  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de *B. adolescentis* ATCC 15703. A, B.ad1(637); B, B.ad2(518).**

#### **b) Efecto del pH sobre la actividad enzimática.**

El pH óptimo se evaluó midiendo la actividad de las enzimas a la temperatura óptima (50°C) en un rango de pH de 4.5 a 8.0, usando Raftilosa Sinergy 1 al 1% como sustrato. Como se observa en la figura 9 el pH óptimo de B.ad1(637) se estableció un rango entre 5.5 y 7.0, mientras que para B.ad2(518) fue de 5.5.

B.ad1(637) y B.ad2(518) tienen una temperatura y pH óptimos similares a los de las  $\beta$ -fructofuranosidasas tanto nativas como recombinantes caracterizadas con anterioridad (Tabla 5).

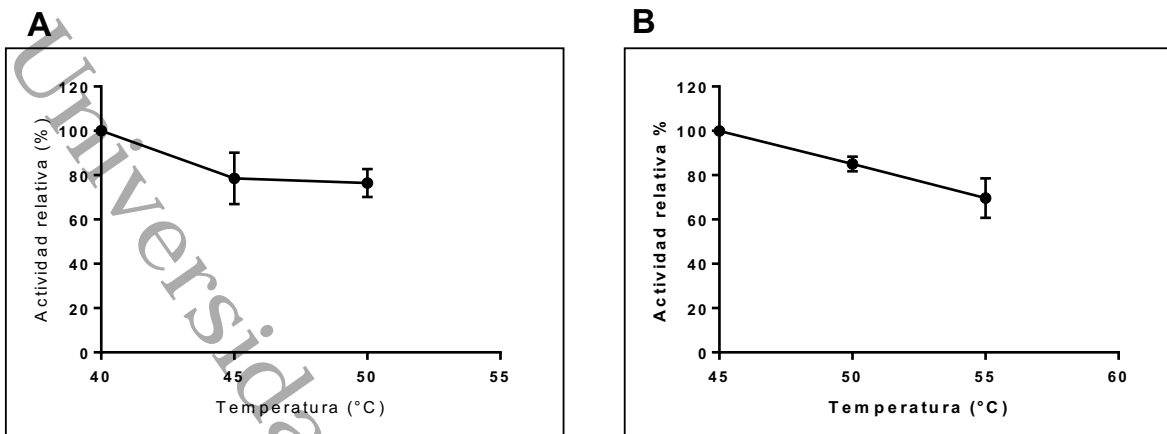




**Figura 9. Efecto del pH en la actividad de las  $\beta$ -fructofuranosidasas recombinantes de *B. adolescentis* ATCC 15703. A, B.ad2(518); B, B.ad1(637).**

### c) Estabilidad térmica.

En la figura 10 se muestra el efecto de la incubación a diferentes temperaturas en la actividad de B.ad1(637) y B.ad2(518). Se observa que la enzima B.ad1(637) pierde un 22 y 24 % de la actividad enzimática después de ser incubada durante 15 minutos a 45 y 50 °C, respectivamente. Mientras que, la enzima B.ad2(518) pierde un 18 y 37% de la actividad enzimática después de ser incubada a 50 y 55 °C, respectivamente.



**Figura 10. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la actividad enzimática de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. adolescentis* ATCC 15703. A, B.ad1(637); B, B.ad2(518), incubadas durante 15 minutos a diferentes temperaturas.**

Ambas enzimas conservan al menos un 80% de su actividad enzimática a 50 °C después de 15 minutos de incubación. Por lo tanto, resultan ser de las más estables comparadas con las reportadas en la literatura (Tabla 6). Al determinar la  $t_{1/2}$  de B.ad2(518) resultó ser de 92 minutos para B.ad2(518) a 50 °C. No se determinó la  $t_{1/2}$  de B.ad1(637).

### c) Actividad sobre diferentes sustratos.

En la tabla 4 se muestra el porcentaje de actividad relativa de las enzimas B.ad1(637) y B.ad2(518) sobre los sustratos ensayados. Se observó que las enzimas B.ad2(518) y B.ad1(637) son capaces de hidrolizar sustratos con diferentes características estructurales: de tipo inulina, de tipo levana, de alto y de bajo peso molecular. Esta es una característica que comparten con B.longum\_I1 y B.longum\_I2 y a diferencia de ellas, B.ad1(637) y B.ad2(518) no mantienen el mismo orden de preferencia en el uso de los sustratos ensayados (Tabla 7). Se observó

que B.ad1(637) tiene mayor actividad sobre Raftilosa Sinergy 1 como sustrato, seguido de la agavina. Mientras que, B.ad2(518) sobre Oligofructosa p95, seguido de Raftilosa Sinergy 1.

**Tabla 4. Actividad relativa de las  $\beta$ -fructofuranosidasas B.ad1(637) y B.ad2(518) sobre sustratos de diversas estructuras y orígenes.**

<b>Sustratos</b>	<b>B.ad1(637)(%)</b>	<b>B.ad2(518)(%)</b>
Oligofructosa P95 [FOS $\beta$ -(2,1); GP 2-8]	45	100
Raftilosa Sinergy 1 [FOS $\beta$ -(2,1) e Inulina; GP 2-60]	100	45.9
Agavina [ $\beta$ -(2,1)/ $\beta$ -(2,6); GP 3-29; 6.2 kDa]	61.7	20.6
Sacarosa	38.1	5.7
Raftilina HP [Inulina $\beta$ -(2,1); GP > 23; 8.3 kDa]	29.2	1.7
Levana SacB BPM [ $\beta$ -(2,6); 8.3 kDa]	33.6	2.2
Inulina <i>L. citreum</i> APM [ $\beta$ -(2,1); 3000 kDa]	0.61	0.1
Levana B512 APM [ $\beta$ -(2,6); 2200 kDa]	0.61	-
Levana SacB APM [ $\beta$ -(2,6); 3500 kDa]	-	-
<i>Referencia</i>	Este estudio	Este estudio

## 1. Discusión

De acuerdo con el dendograma descrito en este estudio, la mayoría de las  $\beta$ -fructofuranosidasas ya caracterizadas corresponden al grupo 2, en el que predominan las enzimas en un rango de 518 a 532 aminoácidos, y solo una de ellas, B.longum\_I1, pertenece al grupo 3, con un tamaño de 636 aminoácidos. Por lo tanto, B.ad1(637), es la segunda enzima caracterizada del grupo 3 con un tamaño de secuencia de 637 aminoácidos. Sorprendentemente, B.ad1(637) observó un peso molecular menor a B.longum\_I1, 62 y 75 kDa, respectivamente, analizados mediante electroforesis. Incluso, comparado con las enzimas nativas de *B. longum* 15697 y *B. infantis* JCM 7007 y las enzimas recombinantes de las cepas *B. adolescentis* G1, *B. longum* JCM 1217 y *B. longum* KN29.1 que son de enzimas de 518 aminoácidos. Por otro lado, B.ad2(518) es la enzima con el menor peso molecular de todas las reportadas (Tabla 5). Es importante mencionar que tanto B.ad1(637) como B.ad2(518) tienen un peso molecular diferente al calculado. Esto ha sido reportado previamente por algunos autores para otras enzimas de este tipo, incluidas las  $\beta$ -fructofuranosidasas de *B. longum* KN29.1, *B. longum* JCM1217, *B. adolescentis* G1 (Jedrzejczak-Krzepkowska et al., 2011; Omori, Toshima, Keiji Ueno, Kei Muramatsu, Masanori Kikuchi, 2010; Omori et al., 2010). Asimismo, el comportamiento electroforético que muestran las enzimas de la cepa *B. adolescentis* ATCC 15703 en el zimograma adicionado con Inulina de *L. citreum* al 1% descrito en este estudio, es similar con lo previamente referido por Morales-Contreras & Ávila-Fernández, 2018 para las  $\beta$ -fructofuranosidasas B.longum\_I1 y B.longum\_I2 de la cepa *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697. En ese trabajo, se

describieron múltiples bandas electroforéticas con actividad enzimática y se concluyó que, los halos de mayor tamaño pueden ser formas multiméricas de las enzimas.

En cuanto a las características bioquímicas de las enzimas, B. ad1(637) se diferencia del resto de las  $\beta$ -fructofuranosidasas de bifidobacterias por su amplio rango de pH óptimo que va de 5.5 a 7.0. Mientras que, B.ad2(518) presenta el pH óptimo más ácido (5.5) reportado para este tipo de enzimas (Tabla 5), siendo las enzimas de la cepa *B. adolescentis* G1 y *B. longum* JCM 1217 las que más se le acercan (5.7). Se ha demostrado que la enzima B.longum\_I1 de 636 aminoácidos es una enzima extracelular ya que, de las 2  $\beta$ -fructofuranosidasas que posee la cepa *B. longum* ATCC 15697, fue la única identificada en el medio del cultivo cuando la cepa fue cultivada utilizando Agavina e Inulina como fuentes de carbono (Cuevas-Juárez, Ávila-Fernández, & López-Munguía, 2017). Si la enzima nativa B. ad1(637) observara el mismo comportamiento, su amplio rango de pH óptimo podría representar una ventaja para que esta cepa pudiera alojarse en un amplio segmento del colon, cuyo pH es variable, sin que se viera afectada su capacidad de metabolizar sustratos como las fructanas que ayudan a su establecimiento y mantenimiento.

Por otra parte, la temperatura óptima de B.ad1(637) (50 °C) es igual a la de B.longum\_I1, B.longum\_I2 y a la de la cepa *B. longum* KN29.1. En cambio, B.ad2(518) tiene una temperatura óptima mayor (50 a 55 °C), que coincide con la descrita para la enzima nativa de *B. infantis* JCM 7007. En particular, la temperatura óptima de la única  $\beta$ -fructofuranosidasa de *B. adolescentis* reportada anteriormente (cepa G1) no se describe en el artículo, de modo que no es posible utilizarla con

finés comparativos y el resto de las  $\beta$ -fructofuranosidasas tienen una temperatura óptima  $\leq 40$  °C como se muestra en la tabla 5. Al parecer las  $\beta$ -fructofuranosidasas del grupo 3, aquellas de mayor tamaño, poseen temperaturas óptimas altas. Sin embargo, comparten esta característica con algunas enzimas reportadas del grupo 2. No se sabe cual es el significado biológico de que estas enzimas posean temperaturas óptimas altas. Considerando que las bifidobacterias se alojan en el colon y por lo tanto están a una temperatura de 37°C, sus  $\beta$ -fructofuranosidasas estarían actuando a una temperatura subóptima.

**Tabla 5. Propiedades bioquímicas de las  $\beta$ -fructofuranosidasas.**

Especies	Tamaño de secuencia (aa)	Tamaño de la proteína (kDa)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Origen	Referencias
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 B.ad1(637)	637	62	5.5 a 7.0	50	Recombinante	En este estudio
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 B.ad2(518)	518	55	5.5	50 a 55	Recombinante	En este estudio
<i>B. infantis</i> JCM 7007	-	75	6.0 a 6.2	55	Nativa	Imamura et al, 1994
<i>B. lactis</i> DSM 10140 <sup>T</sup>	532	59.4	6.5	40	Recombinante	Ehrmann et al, 2003
<i>B. breve</i> UCC2003	518	60	6.0	37	Recombinante	Ryan et al, 2005
<i>B. adolescentis</i> G1	518	74	6.1	-	Nativa	Muramatsu et al, 1993
		66	5.7	-	Recombinante	Omori (a) et al, 2010
<i>B. longum</i> JCM 1217	518	64	5.7	-	Recombinante	Omori (b) et al, 2010
<i>B. longum</i> KN29.1	518	67	6.0 a 6.2	50	Nativa/ recombinante	Jedrzejczak-Krzepkowska et al, 2011
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	532	60	6.0 a 6.5	35 a 40	Recombinante	Broca-Cárdenas, 2015
<i>B. longum</i> ATCC 15697 B. longum_11	636	75	6.0 a 6.5	50	Recombinante	Ávila-Fernández et al, 2016
<i>B. longum</i> ATCC 15697 B. longum_12	518	70	6.0	37	Nativa	Warchol et al, 2002
	518	59	6.0	45 a 50	Recombinante	Morales-Contreras, 2018

En lo que respecta a la estabilidad térmica de estas enzimas, resulta complejo sacar conclusiones ya que en la mayoría de los casos solo se reporta la medición de la actividad residual estimada a un punto en el tiempo, el cual no es el mismo en todos los casos, y tampoco se realiza a la misma temperatura. En pocas ocasiones se ha determinado la  $t_{1/2}$ . Específicamente, se ha reportado la  $t_{1/2}$  de B.longum\_I1 y B.longum\_I2. De acuerdo a estos datos, la  $t_{1/2}$  de B.ad2(518) es mayor que la de B.longum\_I2, siendo B.ad2(518) la más estable de las enzimas del grupo 2 (518 a 532 aminoácidos) reportadas hasta el momento. No obstante, B.longum\_I1, una enzima del grupo 3, sigue siendo la  $\beta$ -fructofuranosidasa con mayor estabilidad térmica (Tabla 6).

**Tabla 6. Estabilidad térmica de las  $\beta$ -fructofuranosidasas**

Especies	Temperatura (° C)	Tiempo del ensayo	Referencias
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 B.ad1(637)	-	-	En este estudio
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 B.ad2(518)	50	$t_{1/2}$ = 92 min	En este estudio
<i>B. infantis</i> JCM 7007	40	30 min	Imamura et al, 1994
<i>B. lactis</i> DSM 10140 <sup>T</sup>	-	-	Ehrmann et al, 2003
<i>B. breve</i> UCC2003	37	20 min	Ryan et al, 2005
<i>B. adolescentis</i> G1	45	10 min	Muramatsu et al, 1993
	50	15 min	Omori (a) et al, 2010
<i>B. longum</i> JCM 1217	50	5 min	Omori (b) et al, 2010
<i>B. longum</i> KN29.1	45	30 min	Jedzejczak-Krzepkowska et al, 2011
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	-	-	Broca-Cárdenas, 2015
<i>B. longum</i> ATCC 15697 B. longum_I1	50	$t_{1/2}$ = 75.5 h	Ávila-Fernández et al, 2016
<i>B. longum</i> ATCC 15697 B. longum_I2	55	$t_{1/2}$ = 30 min	Warchol et al, 2002
	-	-	Morales-Contreras, 2018

En lo que concierne a la afinidad hacia diferentes sustratos tampoco es posible hacer una comparación tan precisa entre las diferentes  $\beta$ -fructofuranosidasas, puesto que, no se utilizan los mismos sustratos para hacer dichas determinaciones. A pesar de ello, se pueden sacar algunas conclusiones generales como que la mayoría de  $\beta$ -fructofuranosidasas de bifidobacterias muestran mayor capacidad para hidrolizar fructanas de cadena corta. Sin embargo, también se observa que algunas de ellas, catalogadas como  $\beta$ -fructofuranosidasas han sido reportadas como más afines hacia la sacarosa por lo que debieran clasificarse como invertasas. Tal es el caso, de enzimas provenientes de las cepas *B. lactis* DSM10140 y *B. breve* UCC2003 (Ehrmann et al., 2003; Ryan et al., 2005). Otra limitante para realizar comparaciones confiables entre los diferentes reportes es la poca información proporcionada sobre los sustratos utilizados, en particular, los sustratos de cadena larga. En ocasiones, no se mencionan las características de los sustratos evaluados o la fuente de obtención y debemos recordar que sus estructuras pueden ser muy complejas, pudiendo observar tanto ramificaciones como tamaños de cadena de 60 a >1000 unidades. En este estudio, se determinó que B.ad1(637) y B.ad2 (518) hidrolizan de forma preferente FOS por lo que se clasifican como  $\beta$ -fructofuranosidasas. En general, la actividad enzimática de ambas enzimas resultó menor cuando se emplean sustratos de alto peso molecular. Sin embargo, resultan interesantes las diferencias en el orden de preferencia por los sustratos evaluados (Tabla 7). B.ad2(518) conserva prácticamente el mismo orden de preferencia por los sustratos comparada con B.longum\_I1 y B.longum\_I2, excepto porque prefiere Levana SacB 8.3 en lugar de Raftilina HP. Ambos, sustratos



de 8.3 kDa, de acuerdo con los reportado por [Muñoz-Gutiérrez, Rodríguez-Alegría, & López-Munguía, en 2009](#). Por su parte, B.ad1(637) prefiere Raftilosa Sinergy 1 como sustrato a diferencia de todas las demás que prefieren Oligofructosa P95. Cabe destacar que, en segundo lugar, B.ad1(637) prefiere a la Agavina, sobre la que conserva arriba del 60% de la actividad relativa, muy por encima de la actividad relativa mostrada por las otras enzimas sobre el mismo sustrato y al igual que B.ad2(518) tiene mayor preferencia por Levana Sac B 8.3 que por Raftilina HP. Lo anterior hace suponer que B.ad1(637) tiene preferencia por enlaces de tipo  $\beta$ -(2,6) ya que la Agavina aunque es una fructana mezclada posee en sus ramificaciones, mayormente expuestas a la acción de las  $\beta$ -fructofuranosidasas, enlaces de tipo  $\beta$ -(2,6). La medición de la actividad enzimática de B.ad1(637) sobre FOS de levana podría ayudarnos a concluir al respecto. Las diferencias entre B.ad1(637) y B.ad2(518) podrían atribuirse al bajo porcentaje de identidad (27 %) que existe entre ellas.

Tabla 7. Actividad relativa de las  $\beta$ -fructofuranosidasas sobre sustratos de diversas estructuras y orígenes.

Sustratos	B.ad1(637)(%)	B.longum_I1 (%)*	B.ad2(518)(%)	B.longum_I2(%)
Oligofructosa P95 [FOS $\beta$ -(2,1); GP 2-8]	45	100	100	100
Raftilosa Sinergy 1 [FOS $\beta$ -(2,1) e Inulina; GP 2-60]	100	60	45.9	49
Agavina [ $\beta$ -(2,1)/ $\beta$ -(2,6); GP 3-29; 6.2 kDa]	61.7	25	20.6	-
Sacarosa	38.1	12.5	5.7	17
Raftilina HP [Inulina $\beta$ -(2,1); GP > 23; 8.3 kDa]	29.2	10	1.7	10
Levana SacB BPM [ $\beta$ -(2,6); 8.3 kDa]	33.6	6.25	2.2	8
Inulina <i>L. citreum</i> APM [ $\beta$ -(2,1); 3000 kDa]	0.61	0.625	0.1	0.6
Levana B512 APM [ $\beta$ -(2,6); 2200 kDa]	0.61	-	-	0.4
Levana SacB APM [ $\beta$ -(2,6); 3500 kDa]	-	0.375	-	-
Referencia	Este estudio	Ávila- Fernández, 2016	Este estudio	Morales-Contreras, 2018

\* Los datos fueron recalculados a partir de los datos reportados por [Ávila-Fernández et al., 2016](#)

## 2. Conclusiones

B.ad1(637) y B.ad2(518) conservan el plegamiento típico de la familia GH32 y comparten los motivos DPN, RDP y ECP, los cuales contienen los residuos que participan en la catalisis de las  $\beta$ -fructofuranosidasas.

*E. coli* Rosetta™ 2 produjo eficientemente a las proteínas recombinantes B.ad2(518) y B.ad1(637) y fueron eficientemente purificadas en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.

B.ad1(637) tuvo el rango más amplio de pH óptimo (5.5 – 7.0) reportado hasta el momento para  $\beta$ -fructofuranosidasas bifidobacterianas, mientras que, B.ad2(518) tuvo el pH óptimo (5.5) más ácido para las  $\beta$ -fructofuranosidasas de 518 a 532 aminoácidos.

B.ad1(637) y B.ad2(518) tuvieron preferencia por Raftilose Sinergy 1 y Oligofructosa P95, respectivamente. Observaron actividad sobre fructanas con una amplia variedad de tamaños y estructuras y B.ad1(637) destacó por el orden de preferencia hacia los sustratos, ya que difiere de B.ad2(518) y de las demás  $\beta$ -fructofuranosidasas bifidobacterianas.

### 3. Perspectivas

Determinar la actividad enzimática de B.ad1(637) y B.ad2(518) sobre FOS de levana permitirá establecer la preferencia de estas enzimas por los enlaces de tipo  $\beta$ -(2,6).

Establecer la  $t_{1/2}$  para B.ad1(637) y B.ad2(518) a diferentes temperaturas permitirá corroborar si la termoestabilidad es una característica de las enzimas del grupo 3 o si pudiera ser dependiente de la cepa más que del tipo de  $\beta$ -fructofuranosidasa.

Producir y caracterizar algunas  $\beta$ -fructofuranosidasas del grupo 1 en su forma recombinante permitirá comparar sus propiedades bioquímicas con las enzimas de los grupos 2 y 3. Este conocimiento contribuirá a consolidar o descartar la clasificación propuesta para estas enzimas con base en sus características moleculares y propiedades bioquímicas.

#### 4. Literatura científica citada

- Abul, M., Azad, K., Sarker, M., & Wan, D. (2018). *Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8063647>
- Ackerman, D. L., Craft, K. M., & Townsend, S. D. (2017). Infant Food Applications of Complex Carbohydrates: Structure, Synthesis, and Function. *Carbohydr Res.*, 437, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.11.007>.
- Airaksinen, K., Yeung, N., Lyra, A., Lahtinen, S. J., Huttunen, T., Shanahan, F., & Ouwehand, A. C. (2019). The effect of a probiotic blend on gastrointestinal symptoms in constipated patients: A double blind, randomised, placebo controlled 2-week trial. *Beneficial Microbes*, 10(6), 617–627. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0163>
- Amaretti, A., Tamburini, E., Bernardi, T., Pompei, A., Zanoni, S., Vaccari, G., ... Rossi, M. (2006). Substrate preference of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239: Compared growth on single and mixed carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 654–662. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0500-9>
- Apolinário, A. C., De Lima Damasceno, B. P. G., De Macêdo Beltrão, N. E., Pessoa, A., Converti, A., & Da Silva, J. A. (2014). Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.081>
- Arboleya, S., Watkins, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2016). Gut bifidobacteria populations in human health and aging. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01204>
- Ávila-Fernández, Cuevas-Juárez, E., Rodríguez-Alegria, M. E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2016). Functional characterization of a novel  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 on structurally diverse fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 263–276. <https://doi.org/10.1111/jam.13154>
- Brusaferro, A., Cozzali, R., Orabona, C., Biscarini, A., Farinelli, E., Cavalli, E., ... Esposito, S. (2018). Is It Time to Use Probiotics to Prevent or Treat Obesity? *Nutrients*, 10(11), 1613. <https://doi.org/10.3390/nu10111613>
- Bujacz, A., Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Bielecki, S., Redzynie, I., & Bujacz, G. (2011). Crystal structures of the apo form of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose. *FEBS Journal*, 278(10), 1728–1744. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08098.x>
- Casaro, M. C., Crisma, A. R., Vieira, A. T., Silva, G. H. M., Mendes, E., Ribeiro, W. R., ... Ferreira, C. M. (2018). Prophylactic *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 supplementation reduces partially allergic airway disease in Balb/c but not in C57BL/6 mice. *Beneficial Microbes*, 9(3), 465–476. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0073>

- Chalova, V. I., Lingbeck, J. M., Kwon, Y. M., & Ricke, S. C. (2008). Extracellular antimutagenic activities of selected probiotic Bifidobacterium and Lactobacillus spp. as a function of growth phase. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 43(2), 193–198. <https://doi.org/10.1080/03601230701795262>
- Cionci, N. B., Baffoni, L., Gaggi, F., & Gioia, D. Di. (2018). *Therapeutic microbiology : The Role of Bifidobacterium breve as Food Supplement for the Prevention / Treatment of Pediatric Diseases*. 1–32. <https://doi.org/10.3390/nu10111723>
- Cuevas-Juárez, E., Ávila-Fernández, Á., & López-Munguía, A. (2017). Identification of enzymatic activities involved in agave fructan consumption by Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697. *Journal of Functional Foods*, 35, 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.048>
- De Vuyst, L., Moens, F., Selak, M., Rivière, A., & Leroy, F. (2014). Summer Meeting 2013: Growth and physiology of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 116(3), 477–491. <https://doi.org/10.1111/jam.12415>
- Dhanashree, Rajashekar, S., Krishnaswamy, B., & Kammara, R. (2017). Bifid shape is intrinsic to Bifidobacterium adolescentis. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00478>
- Di Bartolomeo, F., & Van den Ende, W. (2015). Fructose and Fructans: Opposite Effects on Health? *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 227–237. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0485-6>
- Ehrmann, M. A., Korakli, M., & Vogel, R. F. (2003). Identification of the gene for  $\beta$ -fructofuranosidase of Bifidobacterium lactis DSM10140T and characterization of the enzyme expressed in Escherichia coli. *Current Microbiology*, 46(6), 391–397. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3908-1>
- Gibson, G. R., Hutkins, R. W., & Prescott, S. L. (2017). *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics ( ISAPP ) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics*.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. Van, Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(02), 259. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Imamura, L., Hisamitsu, K., & Kobashi, K. (1994). Purification and Characterization of B-Fructofuranosidase from Bifidobacterium infantis. *Biol. Pharm. Bull*, 17(5), 596–602. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>
- Jang, H. M., Jang, S. E., Han, M. J., & Kim, D. H. (2018). Anxiolytic-like effect of

- Bifidobacterium adolescentis IM38 in mice with or without immobilisation stress. *Beneficial Microbes*, 9(1), 123–132. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0226>
- Jedrzejczak-Krzepkowska, M., Tkaczuk, K. L., & Bielecki, S. (2011). Biosynthesis, purification and characterization of  $\alpha$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1. *Process Biochemistry*, 46(10), 1963–1972. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.005>
- Karetkin, B. A., Guseva, E. V., Evdokimova, S. A., Mishchenko, A. S., Khabibulina, N. V., Grosheva, V. D., ... Panfilov, V. I. (2019). A quantitative model of *Bacillus cereus* ATCC 9634 growth inhibition by bifidobacteria for synbiotic effect evaluation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 89. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2665-2>
- Kim, J. H., An, H. J., Garrido, D., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2013). Proteomic Analysis of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Reveals the Metabolic Insight on Consumption of Prebiotics and Host Glycans. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057535>
- Kok, C. R., & Hutkins, R. (2018). Yougurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *BioScience*, 76, 4–15. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy138>
- Kuo, S.-M. (2017). Does Modification of the Large Intestinal Microbiome Contribute to the Anti-inflammatory Activity of Fermentable Fiber? *Current Developments in Nutrition*, cdn.117.001180. <https://doi.org/10.3945/cdn.117.001180>
- Liu, X., Cao, S., & Zhang, X. (2015). Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(36), 7885–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02404>
- Lugli, G. A., Mancino, W., Milani, C., Duranti, S., Mancabelli, L., Napoli, S., ... Turrone, F. (2019). Dissecting the evolutionary development of the species *bifidobacterium animalis* through comparative genomics analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(7), 1–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02806-18>
- Mart, E., Barrera-dur, C., Gonz, M., & Hern, E. (2016). *Efecto de simvastatina más inulina en comparación con simvastatina más ezetimiba en el tratamiento de la dislipidemia mixta.*
- Marx, S. P., Winkler, S., & Hartmeier, W. (2000). Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 163–169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10612749>
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., ... Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 81(4), e00036-17. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

- Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Lugli, G. A., Mancabelli, L., Ferrario, C., ... Ventura, M. (2016). Genomics of the genus *Bifidobacterium* reveals species-specific adaptation to the glycan-rich gut environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 980–991. <https://doi.org/10.1128/AEM.03500-15>
- Morales-Contreras, J. A., & Ávila-Fernández, Á. (2018). *Caracterización bioquímica de la beta-fructofuranosidasa 2 de Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 y su análisis comparativo*.
- Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., & López-Munguía, A. (2009). Kinetic behaviour and specificity of B-fructosidasas in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*, 44, 891–898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.013>
- Muramatsu, K., Onodera, S., Kikuchi, M., & Shiomi, N. (1994). Substrate specificity and subsite affinities of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(9), 1642–1645. <https://doi.org/10.1080/bbb.58.1642>
- Omori, T., Ueno, K., Muramatsu, K., Kikuchi, M., Onodera, S., & Shiomi, N. (2010). Properties of Recombinant  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* JCM1217. *Journal of Applied Glycoscience*, 7(6), 73–76.
- Omori, T., Ueno, K., Muramatsu, K., Kikuchi, M., Onodera, S., & Shiomi, N. (2010). Characterization of recombinant beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Chemistry Central Journal*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-4-9>
- Öner, E. T., Hernández, L., & Combie, J. (2016). Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 34(5), 827–844. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.002>
- Padilla-Camberos, E., Barragán-Álvarez, C. P., Díaz-Martínez, N. E., Rathod, V., & Flores-Fernández, J. M. (2018). Effects of Agave fructans (*Agave tequilana* Weber var. azul) on Body Fat and Serum Lipids in Obesity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 34–39. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0654-5>
- Rivière, A., Selak, M., Geirnaert, A., Van den Abbeele, P., & De Vuyst, L. (2018). Complementary mechanisms for degradation of inulin-type fructans and arabinoxylan oligosaccharides among bifidobacterial strains suggest bacterial cooperation. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), 1–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02893-17>
- Rivière, A., Selak, M., Lantin, D., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2016). Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zannoni, S., & Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by



- bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6150–6158. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6150-6158.2005>
- Ryan, S. M., Fitzgerald, G. F., & Van, D. (2005). *Transcriptional Regulation and Characterization of a Novel  $\beta$ -Fructofuranosidase-Encoding Gene from Bifidobacterium breve UCC2003*. *Transcriptional Regulation and Characterization of a Novel  $\beta$ -Fructofuranosidase-Encoding Gene from Bifidobacterium breve UCC*. 71(7), 3475–3482. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3475>
- Selak, M., Rivière, A., Moens, F., Van den Abbeele, P., Geirnaert, A., Rogelj, I., ... De Vuyst, L. (2016). Inulin-type fructan fermentation by bifidobacteria depends on the strain rather than the species and region in the human intestine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 4097–4107. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7351-9>
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.003>
- Sun, Z., Zhang, W., Guo, C., Yang, X., Liu, W., Wu, Y., ... Zhang, H. (2015). Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus bifidobacterium: A snapshot of its genetic diversity and evolution e0117912. *PLoS ONE*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117912>
- Tanno, H., Fujii, T., Ose, R., Hirano, K., Tochio, T., & Endo, A. (2019). Characterization of fructooligosaccharide-degrading enzymes in human commensal Bifidobacterium longum and Anaerostipes caccae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 518(2), 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.049>
- Thomson, P., Medina, D. A., Ortúzar, V., Gotteland, M., & Garrido, D. (2018). Anti-inflammatory effect of microbial consortia during the utilization of dietary polysaccharides. *Food Research International*, 109(April), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.008>
- Tódero, L. M., Rechia, C. G. V., & Guimarães, L. H. S. (2019). Production of short-chain fructooligosaccharides (scFOS) using extracellular  $\beta$ -D-fructofuranosidase produced by Aspergillus thermomutatus. *Journal of Food Biochemistry*, 43(8), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12937>
- Turrone, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). Bifidobacterium bifidum as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00437>
- Turrone, F., Ventura, M., Buttó, L. F., Duranti, S., O'Toole, P. W., Motherway, M. O.

- C., & Van Sinderen, D. (2014). Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: A *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(2), 183–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1318-0>
- Velázquez-Martínez, J. R., González-Cervantes, R. M., Hernández-Gallegos, M. A., Mendiola, R. C., Aparicio, A. R. J., & Ocampo, M. L. A. (2014). Prebiotic potential of *Agave angustifolia* haw fructans with different degrees of polymerization. *Molecules*, 19(8), 12660–12675. <https://doi.org/10.3390/molecules190812660>
- Versluys, M., Kirtel, O., Toksoy Öner, E., & Van den Ende, W. (2018). The fructan syndrome: Evolutionary aspects and common themes among plants and microbes. *Plant Cell and Environment*, 41(1), 16–38. <https://doi.org/10.1111/pce.13070>
- Warchol, M., Warchol, M., Perrin, S., Perrin, S., Schneider, F., & Schneider, F. (2002). Characterization of a purified  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Society*, 462–467.
- Wong, C. B., Sugahara, H., Odamaki, T., & Xiao, J. Z. (2018). Different physiological properties of human-residential and non-human-residential bifidobacteria in human health. *Beneficial Microbes*, 9(1), 111–122. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0031>