



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Identificación, clonación y análisis funcional de la
fucosidasa GH95Fuc25 aislada del metagenoma de la
microbiota intestinal de niños lactantes.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Aniento Marcote, Fernando

Tutor/a: González Nebauer, Sergio

Director/a Experimental: YEBRA YEBRA, MARIA JESUS

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y FUNCIONAL DE LA FUCOSIDASA GH95FUC25 AISLADA DEL METAGENOMA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE NIÑOS LACTANTES

RESUMEN

La microbiota intestinal es una comunidad dinámica que puede ser alterada por la alimentación del hospedador así como por factores internos del mismo. La lactancia materna modula la composición de la microbiota intestinal. Así, la leche humana contiene oligosacáridos específicos (OLHs) que no son digeridos por los lactantes y llegan al intestino, donde son metabolizados por determinadas especies bacterianas, favoreciendo su colonización y crecimiento. Los OLHs consisten en una combinación de 5 monosacáridos: D-glucosa, D-galactosa, *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido siálico y L-fucosa. Los residuos de α -L-fucosa están presentes en el extremo no reductor de los OLHs y de otros glicanos relevantes como los antígenos de los grupos histo-sanguíneos (AGSs). Glicoconjugados de estos AGSs presentes en las superficies celulares del epitelio intestinal actúan como receptores para enteropatógenos y también como sustratos metabólicos para las bacterias. La utilización de los oligosacáridos fucosilados por éstas requiere de enzimas α -L-fucosidasas. En el presente trabajo se ha realizado un análisis de las secuencias de las α -L-fucosidasas de la familia GH95 presentes en el metagenoma de la microbiota fecal de niños lactantes, obtenido anteriormente en el laboratorio. Basándose en homología de secuencia se identificaron un total de 27 α -L-fucosidasas GH95 y el gen que codifica para la α -L-fucosidasa denominada GH95Fuc25 se ha clonado y expresado en *Escherichia coli*. La enzima se ha purificado y se han evaluado sus propiedades cinéticas y bioquímicas utilizando como sustrato *p*-nitrofenil- α -L-fucopiranosido. También se ha determinado su especificidad frente a glicanos fucosilados naturales. GH95Fuc25 es capaz de hidrolizar de forma eficiente los antígenos del grupo sanguíneo H tipo 1 y tipo 2, y los OLHs 2'-fucosil-lactosa (2'FL) y 3-fucosil-lactosa (3FL). También hidroliza residuos de fucosa de las glicoproteínas α -1 humana, lactoferrina bovina y la mucina porcina. Los resultados obtenidos indican que esta enzima muestra especificidades de sustrato hacia OLHs, AGSs y glicoproteínas naturales, lo que sugiere un gran potencial biotecnológico.

PALABRAS CLAVE: α -L-fucosidasa, microbiota, metagenoma, oligosacáridos de la leche humana, antígenos de los grupos histo-sanguíneos, glicoproteínas.

Alumno: D. Fernando Aniento Marcote

Tutor académico: Sergio González Nebauer

Tutora experimental: M^aJesús Yebra Yebra

Valencia, junio de 2023

IDENTIFICATION, CLONING AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF GH95FUC25 FUCOSIDASE ISOLATED FROM INFANT GUT METAGENOME

ABSTRACT

Gut microbiota is a dynamic community that can be altered by the host diet as well as internal host factors. Breastfeeding modulates the composition of the gut microbiota. Human milk contains specific oligosaccharides (HMOs) that are not digested by infants and when they reach the intestine, they are metabolized by certain bacterial species, favoring their colonization and growth. HMOs consist of a combination of 5 monosaccharides: D-glucose, D-galactose, N-acetylglucosamine (GlcNAc), sialic acid and L-fucose. Residues of α -L-fucose are present at the non-reducing end of HMOs and other relevant glycans such as histo-blood group antigens (AGSs). Glycoconjugates of these AGSs present on the cell surfaces of the gut epithelium act as receptors for enteropathogens and as metabolic substrates for bacterias. The use of fucosylated oligosaccharides by these bacterias requires α -L-fucosidase enzymes. In this work sequence analysis of α -L-fucosidases from the GH95 family present in the metagenome of the infant gut microbiota, previously obtained in the laboratory, has been carried out. Based on sequence homology, a total of 27 α -L-fucosidases GH95 were identified and the gene that codes for the fucosidase named GH95Fuc25 has been cloned and expressed in *Escherichia coli*. The enzyme has been purified and its kinetic and biochemical properties have been evaluated using p-nitrophenyl- α -L-fucopyranoside as substrate. Its specificity against natural fucosylated glycans has also been determined. GH95Fuc25 can efficiently hydrolyze blood group antigens type 1 and 2 and the HMOs 2'-fucosyllactose (2'FL) and 3-fucosyllactose (3FL). It also hydrolyzes fucose residues of human alpha-acid glycoproteins, bovine lactoferrin and porcine mucin. These results indicate that this enzyme shows substrate specificities towards HMOs, AGSs and natural glycoproteins, suggesting a great biotechnological potential.

KEY WORDS: α -L-fucosidase, microbiota, metagenome, human milk oligosaccharides, histo-blood group antigens, glycoproteins.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional que me ha dado siempre.

A mi tutora M^a Jesús por organizar y dirigir mi TFG.

A mis compañeros de laboratorio Diego, Irene, Eva e Ismael por su amabilidad y ayuda en la realización de las distintas tareas de laboratorio.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 4 |
| 3.1. FUCOSILOLIGOSACÁRIDOS | 4 |
| 3.2. MICROORGANISMOS | 4 |
| 3.2.1. Cepas bacterianas | 4 |
| 3.2.2. Medio de cultivo..... | 4 |
| 3.2.3. Condiciones de cultivo de las bacterias | 4 |
| 3.3. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 5 |
| 3.3.1. Aislamiento de DNA plasmídico pQE-80L (Qiagen) de <i>E. coli</i> | 5 |
| 3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 5 |
| 3.3.3. Digestiones con enzimas de restricción | 6 |
| 3.3.4. Purificación de fragmentos de DNA después de la digestión con enzimas de restricción/PCR..... | 6 |
| 3.3.5. Reacciones de ligación | 6 |
| 3.4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GH95FUC25 CON UNA ETIQUETA DE POLI-HISTIDINA | 6 |
| 3.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA α-L-FUCOSIDASA GH95FUC25 | 7 |
| 3.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA SOBRE FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS NATURALES | 7 |
| 3.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA SOBRE GLICOPROTEÍNAS NATURALES ... | 8 |
| 4. RESULTADOS | 8 |
| 4.1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE FUCOSIDASAS GH95 A PARTIR DEL METAGENOMA BACTERIANO DE NIÑOS LACTANTES | 8 |
| 4.2. CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA α-L-FUCOSIDASA GH95FUC25 | 9 |
| 4.2.1. Clonación de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 | 9 |
| 4.2.2. Expresión y purificación de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25..... | 11 |
| 4.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA α-L-FUCOSIDASA GH95FUC25 | 13 |
| 4.4. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA α-L-FUCOSIDASA GH95FUC25 | 14 |
| 4.5. ACTIVIDAD DE LA α-L-FUCOSIDASA GH95FUC25 SOBRE GLICOPROTEÍNAS | 15 |
| 5. DISCUSIÓN | 16 |
| 6. CONCLUSIONES | 18 |
| 7. REFERENCIAS | 19 |
| 8. ANEXOS | 22 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructuras de los principales OLHs fucosilados. | 1 |
| Figura 2. Oligosacáridos fucosilados utilizados en este estudio. | 4 |
| Tabla 1. Putativas fucosidasas GH95 encontradas en el metagenoma microbiano del intestino de niños lactantes. | 9 |
| Figura 4. Estrategia de clonación de un fragmento de DNA genómico que codifica para la fucosidasa GH95Fuc25. | 10 |
| Figura 5. Amplificación por PCR del gen que codifica para la fucosidasa GH95Fuc25. | 10 |
| Figura 6. Geles de agarosa mostrando los productos del PCR de colonias resistentes a ampicilina obtenidas tras la ligación de pQE-80L y el gen que codifica para le enzima GH95Fuc25. | 11 |
| Figura 7. Análisis de la expresión de GH95Fuc25 en los clones 1 y 2 antes y después de inducir con IPTG. | 12 |
| Figura 8. Purificación de la fucosidasa GH95Fuc25 aislada a partir del metagenoma de niños lactantes. | 12 |
| Figura 9. Representación del % de actividad de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 en función del valor de pH ensayado. | 13 |
| Figura 10. Representación del % de actividad de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 en función de la temperatura ensayada. | 13 |
| Figura 11. Hidrólisis de los antígenos sanguíneos H tipo 1, Lewis a y H tipo 2 por la α -L-fucosidasa GH95Fuc25. | 14 |
| Figura 12. Hidrólisis del antígeno sanguíneo Lewis x y los OLHs 2'-fucosil-lactosa (2'FL) y 3-fucosil-lactosa (3FL) por la α -L-fucosidasa GH95Fuc25. | 14 |
| Tabla 2. Porcentaje de hidrólisis de fucosil-oligosacáridos naturales por parte de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 aislada del metagenoma microbiano de niños lactantes. | 15 |
| Figura 13. Hidrólisis de las glicoproteína ácida α -1 humana, mucina porcina y lactoferrina bovina por parte de GH95Fuc25. | 16 |

1. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal es una comunidad dinámica que puede ser alterada por la alimentación del hospedador así como por factores internos del mismo, y contribuye a la maduración del sistema inmunológico, a la fisiología gastrointestinal, al avance cognitivo y a la regulación metabólica. Cada individuo posee una comunidad microbiana particular en la que juega un papel importante la alimentación que recibe durante sus primeros años (Browne et al., 2022). La lactancia materna modula la microbiota intestinal y el impacto del glicobioma de la leche humana en la microbiota intestinal de los niños está muy bien establecido (Zivkovic et al., 2011). Mientras una gran parte de los componentes de la leche materna proporciona nutrientes al niño, los oligosacáridos de la leche humana (OLHs) no son digeridos por los lactantes y favorecen la colonización y el crecimiento de las bacterias, las cuales son capaces de degradar los OLHs. Las bacterias que degradan los OLHs, como *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium breve* dominan la microbiota intestinal infantil durante la lactancia (Ioannou et al., 2021).

Los oligosacáridos de la leche humana son glicanos no conjugados compuestos de 3 a más de 20 unidades de monosacáridos, con muchos isómeros estructurales, y consisten en una combinación de 5 monosacáridos: D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido siálico y L-fucosa (Zúñiga et al., 2018).

Hasta el momento se han caracterizado aproximadamente 200 OLHs diferentes y se supone que 50 de ellos representan el 99 % en cantidad de OLHs en la leche materna humana (Zhang et al., 2021). Todos los OLH contienen un núcleo de lactosa (Gal β -1,4Glc) en el extremo reductor, que puede alargarse mediante enlaces glicosídicos (β 1,3) o (β 1,4). Además, las estructuras centrales de OLHs también pueden contener ácido siálico y/o fucosa en las posiciones terminales. Residuos de fucosa pueden añadirse a la galactosa, glucosa o GlcNAc vía una unión α -1,2, α -1,3 o α -1,3/1,4, respectivamente (Figura 1) (Zhang et al., 2021). El metabolismo de los OLHs por las bacterias requiere de la acción de genes que codifican enzimas como β -hexosaminidasas, lacto-N-biosidasas, β -galactosidasas, sialidasas y α -L-fucosidasas.

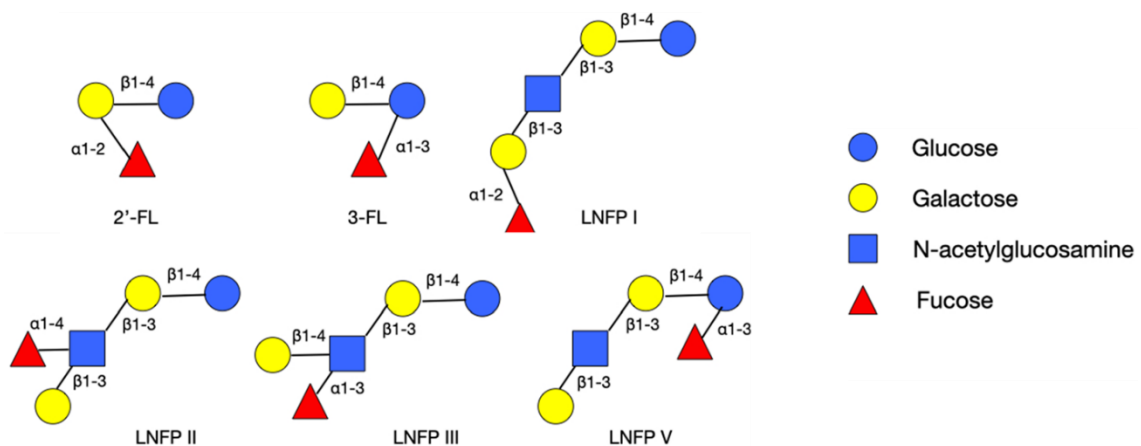


Figura 1. Estructuras de los principales OLHs fucosilados. Se muestra los tipos de enlace entre los monosacáridos. 2'-FL, 2'-fucosil-lactosa; 3-FL, 3-fucosil-lactosa; LNFP I, lacto-N-fucopentaosa-1; LNFP II, lacto-N-fucopentaosa-2; LNFP III, lacto-N-fucopentaosa-3; LNFP V, lacto-N-fucopentaosa-5. Los símbolos de los monosacáridos siguen la Nomenclatura de Símbolos del sistema de Glicanos. Figura modificada de Zhang et al., 2021.

Según la genética del huésped, entre el 50 y el 80 % de los OLHs y el 75 % de los *N*-glucanos de las proteínas de la leche humana contienen L-fucosa (Moya-González et al., 2022). Estos OLHs y glicoproteínas fucosiladas son cruciales para modular la microbiota intestinal infantil. La L-fucosa se encuentra de forma ubicua en mamíferos, plantas, insectos y microbios como parte de oligosacáridos, glicoproteínas o lípidos que forman glicoconjugados mediante una unión tipo alfa. En humanos se encuentra no sólo en los OLHs, sino también en muchos glicanos relevantes, incluidos los antígenos de los grupos histo-sanguíneos (AGSs) como ABO y Lewis y los epítomos en los receptores glicoconjugados de la superficie celular (Wu et al., 2023). Estos glicanos fucosilados están involucrados en una serie de procesos fisiológicos, incluida la adhesión de patógenos y las respuestas inmunitarias (Zúñiga et al., 2018).

Debido a esta amplia diversidad de estructuras fucosiladas de origen natural, los microorganismos producen una gama de α -L-fucosidasas de diversa especificidad de sustrato que escinden los residuos de α -L-fucosa de oligosacáridos libres y glicoconjugados. Estas enzimas también se pueden usar como herramientas biotecnológicas en reacciones de transglucosilación para sintetizar oligosacáridos. Según la base de datos de Enzimas Activas de Carbohidratos (CAZy) (CAZy, 2023), las L-fucosidasas se pueden clasificar en base a su secuencia en 5 familias (GH29, GH95, GH139, GH141 y GH151), la mayoría de las cuales son de microorganismos. La eliminación de los residuos terminales de α -L-fucosa de los glicoconjugados y OLHs está catalizada por las familias principales, GH29 y GH95. Estas enzimas se han caracterizado a partir de varias bacterias intestinales, incluidas especies pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactocaseibacillus*, *Ruminococcus* y *Streptococcus*. Sin embargo, la información de la funcionalidad (por ejemplo la especificidad de sustrato) de la gran cantidad de α -L-fucosidasas identificadas mediante análisis de secuencias es todavía escasa (Moya-González et al., 2022; Wu et al., 2023).

Las fucosidasas más estudiadas son las de las familias GH29 y GH95, las cuales emplean mecanismos catalíticos de retención e inversión respectivamente. Actualmente hay un total de 9867 secuencias anotadas de GH29, de las que el 96% son de origen bacteriano, mientras que para la familia GH95 hay anotadas la mitad de las secuencias (4890), perteneciendo el 97 % a bacterias (Wu et al., 2023).

En comparación con la familia GH29, las fucosidasas GH95 han sido mucho menos caracterizadas. Según la base de datos CAZy, actualmente se han resuelto las estructuras de cuatro fucosidasas GH95 (código PDB: [4UFC](#), [2EAB](#), [2RDY](#), [7KMQ](#)). Se ha demostrado que el pH óptimo para la mayoría de las fucosidasas GH95 caracterizadas está entre pH 6 y 7 con algunas enzimas que muestran un pH óptimo de 5. La temperatura óptima de las fucosidasas GH95 varía de 25 °C para FucWf5 de *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T a 60 °C para AfcA de *B. bifidum* JCM 1254 y Afc3. Individualmente, se ha demostrado que las enzimas GH95 tienen especificidades de sustrato estrictas, actuando preferentemente en los enlaces de fucosa α -1,2 que se encuentran en los OLHs, los *O*-glucanos de mamíferos y los xiloglucanos fucosilados en las dicotiledóneas. Además, algunas enzimas GH95 han revelado una actividad más relajada en los enlaces de fucosa α -1,3/4/6 (Wu et al., 2023).

Dado que solo una pequeña fracción de la microbiota intestinal total es cultivable, tanto los enfoques como los análisis metagenómicos brindan acceso a una mayor diversidad en las secuencias de proteínas. En un estudio anterior del laboratorio donde he realizado el trabajo fin de grado, se analizó taxonómicamente la composición de la microbiota de muestras fecales de niños lactantes. Los resultados demostraron la presencia de géneros bacterianos que se sabe que contienen en sus genomas hipotéticas α -L-fucosidasas. En el presente trabajo se ha realizado un análisis de las secuencias de las α -L-fucosidasas de la familia GH95 presentes en el metagenoma de la microbiota fecal de niños lactantes obtenido anteriormente en el laboratorio y, de esa clasificación, se ha seleccionado una de las fucosidasas (denominada GH95Fuc25) para

aislarla del metagenoma y realizar su caracterización bioquímica y funcional, determinando su especificidad de sustrato hacia oligosacáridos y glicoproteínas glicosiladas.

2. OBJETIVOS

Como se ha mencionado en la Introducción, los residuos de α -L-fucosa están presentes en muchos glicanos relevantes, como los oligosacáridos de la leche humana (OLHs), los antígenos de los grupos histosanguíneos (AGSs) y en los receptores de glicoconjugados de la superficie celular. Los microorganismos producen un gran número de α -L-fucosidasas de diversa especificidad de sustrato que pueden influir en la función de los glicanos fucosilados. El objetivo principal de este trabajo es caracterizar una α -L-fucosidasa del metagenoma de la microbiota de heces de niños lactantes.

Para conseguir este objetivo, se van a realizar los siguientes objetivos específicos:

- 1) Clonar y expresar en *Escherichia coli* una α -L-fucosidasa de la familia GH95 (GH95Fuc25) aislada a partir del metagenoma de la microbiota de heces de niños lactantes.
- 2) Purificar la α -L-fucosidasa GH95Fuc25
- 3) Evaluar las propiedades cinéticas y bioquímicas de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25.
- 4) Determinar la especificidad de sustrato y actividad frente a glicoproteínas de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25.

Además, este trabajo se relaciona con los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030:

- Salud y Bienestar (ODS 3)

Los glicoconjugados fucosilados desempeñan funciones fundamentales en una gran cantidad de procesos fisiológicos (respuestas inmunitarias, fertilización, metástasis tumoral y las interacciones huésped-microbioma), de modo que la caracterización de α -L-fucosidasas del microbioma, como la que se ha estudiado en este trabajo, puede ayudar a que se consiga modular el contenido de L-fucosa en dichos procesos con el objetivo de utilizarlo como estrategia terapéutica en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.

- Producción y consumo responsables (ODS 12)

En la realización de este trabajo, a la hora de imprimir las fotografías del resultado de los geles, se ha hecho uso de papel reciclado, permitiendo un ahorro de recursos y demostrando un consumo responsable con el medio ambiente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. FUCOSILOLIGOSACÁRIDOS

Los fucosiloligosacáridos utilizados en este estudio se obtuvieron de Biosynth Carbosynth y la estructura se muestra en la Figura 2.

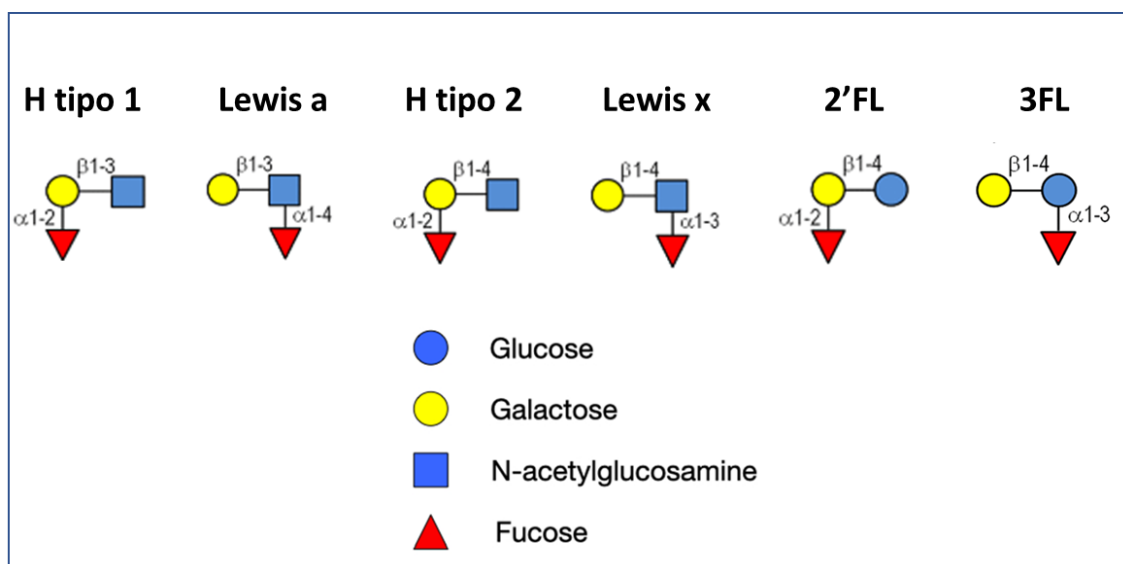


Figura 2. Oligosacáridos fucosilados utilizados en este estudio. Los símbolos de los monosacáridos siguen la Nomenclatura de Símbolos del sistema de Glicanos. H tipo 1, antígeno del grupo sanguíneo H tipo 1; Lewis a, antígeno de Lewis a; H tipo 2, antígeno del grupo sanguíneo H tipo 2; Lewis x, antígeno de Lewis x; 2'-FL, 2'-fucosil-lactosa; 3-FL, 3-fucosil-lactosa.

3.2. MICROORGANISMOS

3.2.1. Cepas bacterianas

En este trabajo se ha utilizado la cepa bacteriana DH10B de *Escherichia coli* (F^- *endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC) λ⁻*) (Invitrogen).

3.2.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* fue el medio LB (Luria-Bertani-Medium): peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH7.0; cuando se utilizó el medio sólido éste se solidificaba mediante la adición de 1.8 % de agar (LBA).

3.2.3. Condiciones de cultivo de las bacterias

Los cultivos líquidos de bacterias se incubaron toda la noche a 37°C con agitación de 200 rpm. Los cultivos en placas Petri con medio sólido se incubaron toda la noche en estufa a 37°C.

3.3. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.3.1. Aislamiento de DNA plasmídico pQE-80L (Qiagen) de *E. coli*

Para la clonación del DNA genómico de GH95Fuc25 se utilizó el vector pQE-80L (Qiagen) (Figura 3). Este vector es un vector lacIq que se utiliza para expresar proteínas con una etiqueta de 6xHistidinas en el extremo N-terminal. Confiere resistencia a ampicilina.

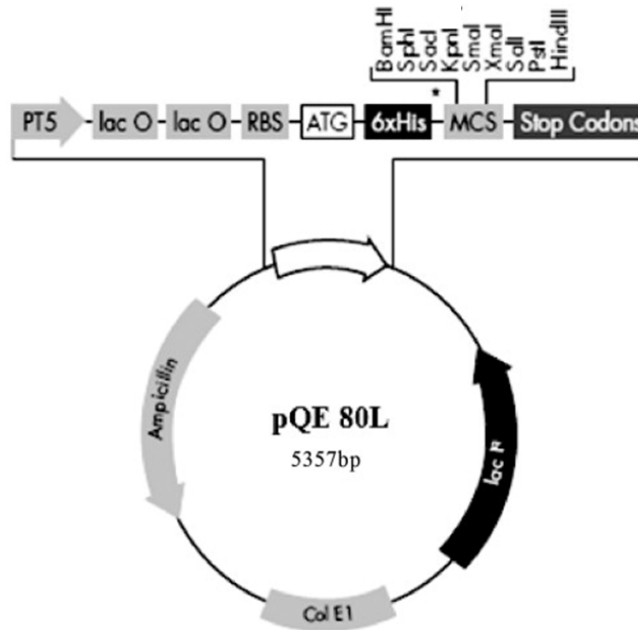


Figura 3. Mapa del vector pQE-80L utilizado para la clonación del gen que codifica para la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 (Figura obtenida de QIAGEN, 2023)

Para el aislamiento del ADN plasmídico se utilizó el kit de extracción de ADN plasmídico NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) partiendo de 1ml de un cultivo crecido durante una noche en medio líquido LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.3.2.1. Amplificación del gen que codifica para la α -L-fucosidasa GH95Fuc25

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (BioRad) en un volumen total de 50 μ l, a partir de 1 μ l de DNA genómico (50 ng/ μ l) de la microbiota de una mezcla de heces de niños lactantes (Moya-González et al., 2022). La mezcla de reacción de PCR contenía además 10 μ l del tampón Thermo Scientific 5x Phusion HF, 2 μ l de una solución 10 μ M de cada oligonucleótido específico (Fuc25BamHI 5' - TTTTGGATCCGTTGAACAAAAGACAGAAACCG-3' y Fuc25HindIII 5'-TTTTAAGCTTTTATTCAATATGGAAAAGTTATAAG -3'), 4 μ l de una solución 2.5 mM de los 4 desoxi-nucleósidos trifosfatos (dNTPs) y 1 μ l (2 U) de la DNA polimerasa Phusion high-fidelity (Thermo Fisher Scientific), completándose con agua hasta un volumen total de 50 μ l. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: desnaturalización a 98 $^{\circ}$ C durante 3 minutos, seguido de 34 ciclos que están divididos cada uno en 3 tramos de 10 segundos a 98 $^{\circ}$ C (desnaturalización), 30 segundos con una temperatura de hibridación de los cebadores

específicos de 58°C y 4 minutos a 72°C (elongación). Finalmente se añadió un periodo de elongación final durante 7 minutos a 72°C. Las muestras se guardaron a -20°C. El producto de PCR se analizó en una electroforesis en gel de agarosa (Lee et al., 2012).

3.3.2.2. PCR de colonias

Las reacciones de PCR de colonias se llevaron a cabo en el termociclador mencionado arriba en volúmenes totales de 25 µL. La mezcla de reacción de PCR contenía células de cada colonia, 2,5 µL del tampón NZYTech 10X, 1 µL de una solución 10 µM de cada oligonucleótido específico (Fuc25BamHI 5' - TTTTGGATCCGTTGAACAAAAGACAGAAACCG-3' y Fuc25HindIII 5'-TTTTAAGCTTTTATTCAATATGGAAAAGTTATAAG -3'), 2 µL de una solución 2.5 mM de los 4 desoxi-nucleósidos trifosfatos (dNTPs), 1,5 µL de cloruro de magnesio y 1,5 µL de la DNA polimerasa Taq NZYTech, completándose con agua hasta un volumen total de 25 µL. Las condiciones del termociclador fueron iguales a las descritas arriba. Los productos de PCR se analizaron en una electroforesis en gel de agarosa (Lee et al., 2012).

3.3.3. Digestiones con enzimas de restricción

Se utilizaron las enzimas de restricción BamHI y HindIII (Thermo Fisher Scientific) para digerir el vector pQE80L y el fragmento de PCR conteniendo el gen que codifica para la α-L-fucosidasa GH95Fuc25. Se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las digestiones se llevaron a cabo con 2-5 U enzima/µg de DNA durante toda la noche a 37°C y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Lee et al., 2012).

3.3.4. Purificación de fragmentos de DNA después de la digestión con enzimas de restricción/PCR

Los fragmentos de DNA se purificaron mediante el kit de NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Mini kit for gel extraction and PCR clean up (Macherey-Nagel).

3.3.5. Reacciones de ligación

Las reacciones de ligación se realizaron manteniendo una proporción molar entre inserto y vector de 3:1. La reacción de ligación contenía 100 ng de vector (digerido y purificado) y 140 ng del inserto (producto de PCR digerido y purificado), 2,5µL de tampón de ligación 10x y 1µL (1,5U/µL) de la ADN ligasa (Roche), en un volumen total de 25 µL. Las reacciones de ligación se realizaron a 16°C durante la noche.

3.4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE GH95FUC25 CON UNA ETIQUETA DE POLI-HISTIDINA

Los productos de las reacciones de ligación se usaron para transformar *E. coli* DH10B por choque térmico (Froger y Hall, 2007). Los transformantes se seleccionaron en placas de agar LBA a 37°C con ampicilina (100 µg mL⁻¹). Posteriormente, se realizó una PCR de colonias para analizar que colonias habían incorporado el inserto. Se aisló el plásmido de los clones que tenían el inserto y se llevó a cabo su secuenciación. Ésta fue realizada por EUROFINS GENOMICS (2023) para confirmar la secuencia correcta de los insertos.

Se eligió un clon que contenía el inserto con la secuencia correcta del gen que codifica para la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 y se cultivó en 0,25 L de medio LB con ampicilina a 25 °C con agitación. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} de entre 0,7 y 1,2, se añadió IPTG (1 mM) y se continuó la incubación durante 5 h. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Na_2SO_4 50 mM, ditioneitol 0,5 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM). La suspensión se trató con 1 mg mL^{-1} de lisozima a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, el lisado celular se sonicó y los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 12.000 g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se cargó en una columna de Ni Sepharose 6 Fast Flow (columna de afinidad HisTrap, GE Healthcare) para purificar la proteína GH95Fuc25 etiquetada con Histidina y se utilizó el sistema de cromatografía Äkta Prime FPLC (GE Healthcare). Tras lavar las columnas con tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y Na_2SO_4 50 mM) que contenía imidazol 10 mM, las proteínas se eluyeron con un gradiente de imidazol 10-500 mM. Las fracciones que contenían las proteínas de interés se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Después se agruparon, se dializaron frente a Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, que contenía 20 % de glicerol, y se mantuvieron congeladas a -80 °C. Para determinar la concentración de proteínas se empleó el método de Bradford utilizando el reactivo proporcionado por Bio-Rad (Bradford, 1976). La concentración de proteínas en las alícuotas fue de $2 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.5. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA α -L-FUCOSIDASA GH95FUC25

Se utilizaron mezclas de reacción de 100 μL en placas de 96 pocillos, conteniendo cada una de ellas tampón Tris-HCl 100 mM (pH 6,0) y *p*-nitrofenol- α -l-fucopiranosido (*p* NP-fuc) 5 mM. Las reacciones se iniciaron añadiendo 10 μg de enzima y seguidamente se analizó la actividad a 37°C utilizando un lector de microplacas POLARstar Omega BMG Labtech, Offenburg (Alemania) en donde se midió el *p*-nitrofenol liberado siguiendo los cambios en la absorbancia a 404 nm. Para determinar el pH óptimo se utilizó un rango de pHs de tampón fosfato-citrato 100 mM (pH 3,0 a 8,5), mientras que para determinar la temperatura óptima se analizó en un rango de 30 a 55°C.

3.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA SOBRE FUCOSIL-OLIGOSACÁRIDOS NATURALES

Se utilizaron distintos sustratos para ensayar la capacidad de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 para hidrolizar sustratos naturales. Se emplearon mezclas de reacción de 10 μL conteniendo sustrato a 2mM en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 6) y 2 μg de enzima, las cuales se incubaron a 37°C durante la noche. Posteriormente, las reacciones se diluyeron 10 veces con agua milliQ y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución utilizando un sistema cromatográfico ICS3000 (Dionex) y una columna CARboPac PA100 con detección amperométrica, empleando un gradiente de NaOH de 10 a 100 mM durante 30 minutos a 27°C y un caudal de 1 mL/min. Finalmente, los productos de las reacciones se confirmaron mediante la comparación de sus tiempos de retención frente a carbohidratos estándar.

3.7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA SOBRE GLICOPROTEÍNAS NATURALES

La actividad de GH95Fuc25 sobre glicoproteínas naturales se analizó frente a la glicoproteína ácida (AGP) α -1 humana (Sigma-Aldrich), la lactoferrina bovina (Friesland Campina Domo) y la mucina porcina (Sigma-Aldrich). Se realizaron mezclas de reacción de 10 μ L con 0,5 μ g/ μ L de sustrato en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 6) y 2 μ g de enzima, las cuales se incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, las mezclas de reacción se diluyeron 10 veces con agua milliQ y se analizaron por cromatografía utilizando el sistema Dionex y la columna descritos anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE FUCOSIDASAS GH95 A PARTIR DEL METAGENOMA BACTERIANO DE NIÑOS LACTANTES

En un estudio anterior llevado a cabo por este mismo laboratorio, se realizó un análisis metagenómico de ADN aislado de muestras fecales de niños lactantes, lo que resultó en la identificación de 60.354 secuencias que contenían proteínas hipotéticas con funciones conocidas, llevando a la identificación de glicosidasas involucradas en la degradación de OLHs tales como β -galactosidasas, β -N-acetilhexosaminidasas, α -sialidasas y α -L-fucosidasas (Moya-González et al., 2022). En el presente trabajo nos centramos en las α -L-fucosidasas de la familia GH95, de las cuales se encontraron un total de 27 putativas α -L-fucosidasas utilizando el servidor dbCAN2 (Zhang et al., 2018).

Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes que codifican las hipotéticas α -L-fucosidasas se usaron en búsquedas BLAST en la base de datos nr (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2023), y mostraron los mejores resultados con α -L-fucosidasas GH95 anotadas en los genomas de las especies bacterianas *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides caccae*, *Bifidobacterium longum*, *Ruminococcus gnavus*, *Phocaeicola dorei* (anteriormente *Bacteroides dorei*) y *Phocaeicola vulgatus* (anteriormente *Bacteroides vulgatus*) (Tabla 1). Utilizando el programa de alineación de secuencias CLUSTAL Omega del EMBL-EBI (Madeira et al., 2019) se realizó una matriz del porcentaje de identidad de aminoácidos (Anexo 1). Esta reveló que cinco grupos de enzimas (Fuc35C/Fuc45B, Fuc1068/Fuc990/Fuc18/Fuc19, Fuc266/Fuc364, Fuc1769/Fuc2593 y Fuc37/Fuc163/Fuc400) de las 27 secuencias de α -L-fucosidasas GH95 mostraron una identidad de secuencia superior al 64%, lo que sugiere que las enzimas dentro de un mismo grupo tienen características similares y, por tanto, podrían tener especificidades de sustrato parecidas. Teniendo en cuenta, además, la homología con α -L-fucosidasas GH95 ya caracterizadas y la presencia de un péptido señal, se seleccionó la fucosidasa Fuc25 para un análisis más detallado. La presencia del péptido señal sugiere que la proteína es secretada al exterior celular y esta es una característica deseable para estudiar en un futuro el potencial antiviral de esta enzima. Así, el laboratorio donde se ha realizado este proyecto colabora con el laboratorio del Dr. Jesús Rodríguez de la Universidad de Valencia especializado en enteropatógenos (rotavirus y norovirus), y la fucosa presente en los AGSs de los glicoconjugados de las superficies celulares participa en los primeros pasos de la infección viral. Los AGSs actúan como receptores que son

reconocidos diferencialmente por distintos genotipos virales (Monedero et al., 2018). De esta forma, se puede estudiar si la eliminación de los residuos de fucosa influye en la unión y reconocimiento de estos virus. En este trabajo además de la selección de la α -L-fucosidasa Fuc25, denominada aquí GH95Fuc25, se ha clonado el gen que codifica para este enzima, se ha purificado la proteína y se ha caracterizado bioquímica y funcionalmente. La secuencia de la proteína deducida del análisis metagenómico se muestra en el Anexo 2.

Tabla 1. Putativas fucosidasas GH95 encontradas en el metagenoma microbiano del intestino de niños lactantes. Los números entre paréntesis hacen referencia a los aminoácidos que abarca tanto el dominio glicosil hidrolasa como el péptido señal. Y/- presencia o ausencia de péptido señal.

| α -L-fucosidasa | Dominio glicosil hidrolasa | Péptido señal | Especie bacteriana | nº aminoácidos |
|------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------------|----------------|
| Fuc1 | GH95(25-773) | - | Bacteroides thetaiotaomicron | 808 |
| Fuc18 | GH95(44-788) | Y(1-21) | Bacteroides thetaiotaomicron | 813 |
| Fuc19 | GH95(65-806) | Y(1-21) | Bacteroides caccae | 831 |
| Fuc20 | GH95(33-773)+GH95(928-1502) | Y(1-26) | Bacteroides caccae | 1551 |
| Fuc23 | GH95(44-852) | Y(1-30) | Ruminococcus gnavus | 2237 |
| Fuc25 | GH95(84-733) | Y(1-25) | Bacteroides caccae | 775 |
| Fuc35A | GH95(256-720) | Y(1-21) | Bacteroides caccae | 761 |
| Fuc35B | GH95(305-728) | - | Bacteroides caccae | 750 |
| Fuc35C | GH95(110-690) | Y(1-26) | Bacteroides caccae | 753 |
| Fuc37 | GH95(27-759) | Y(1-22) | Bacteroides thetaiotaomicron | 824 |
| Fuc42 | GH95(2-761) | - | Bifidobacterium longum | 782 |
| Fuc45A | GH95(21-798) | Y(1-21) | Bacteroides thetaiotaomicron | 811 |
| Fuc45B | GH95(112-690) | - | Bacteroides thetaiotaomicron | 752 |
| Fuc163 | GH95(20-751) | Y(1-20) | Phocaeicola dorei | 814 |
| Fuc180 | GH95(24-760) | Y(1-24) | Phocaeicola dorei | 824 |
| Fuc215 | GH95(41-819) | Y(1-36) | Ruminococcus gnavus | 2177 |
| Fuc247 | GH95(23-758) | Y(1-23) | Phocaeicola dorei | 825 |
| Fuc258 | GH95(299-962) | - | Bacteroides thetaiotaomicron | 1019 |
| Fuc266 | GH95(44-785) | - | Phocaeicola dorei | 818 |
| Fuc318 | GH95(45-756) | Y(1-22) | Phocaeicola dorei | 840 |
| Fuc400 | GH95(20-751) | Y(1-20) | Phocaeicola vulgatus | 814 |
| Fuc564 | GH95(45-785) | - | Phocaeicola vulgatus | 818 |
| Fuc679 | GH95(33-779) | - | Phocaeicola dorei | 793 |
| Fuc990 | GH95(44-793) | Y(1-20) | Phocaeicola dorei | 818 |
| Fuc1068 | GH95(2-637) | - | Phocaeicola vulgatus | 818 |
| Fuc1769 | GH95(21-652) | Y(1-21) | Phocaeicola dorei | 819 |
| Fuc2593 | GH95(21-652) | Y(1-21) | Phocaeicola vulgatus | 819 |

4.2. CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA α -L-FUCOSIDASA GH95FUC25

4.2.1. Clonación de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25

La estrategia que se ha seguido para clonar un fragmento de DNA genómico (DNAg), con un tamaño de 2256 pb, que contiene la secuencia codificante para la enzima GH95Fuc25 se muestra en la Figura 4. De forma esquemática, en primer lugar, se amplificó por PCR el gen que codifica para la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 utilizando DNAg de la microbiota de heces de niños lactantes y cebadores específicos de los extremos del fragmento a amplificar (Anexo 2) a los que se añadió la secuencia que reconocen las enzimas de restricción BamHI y HindIII. A continuación, se insertó el fragmento en el vector pQE-80L digerido con las mismas enzimas (Figura 3), que es un vector que se utiliza para expresar proteínas con una etiqueta de 6xHistidinas en el extremo N-terminal.

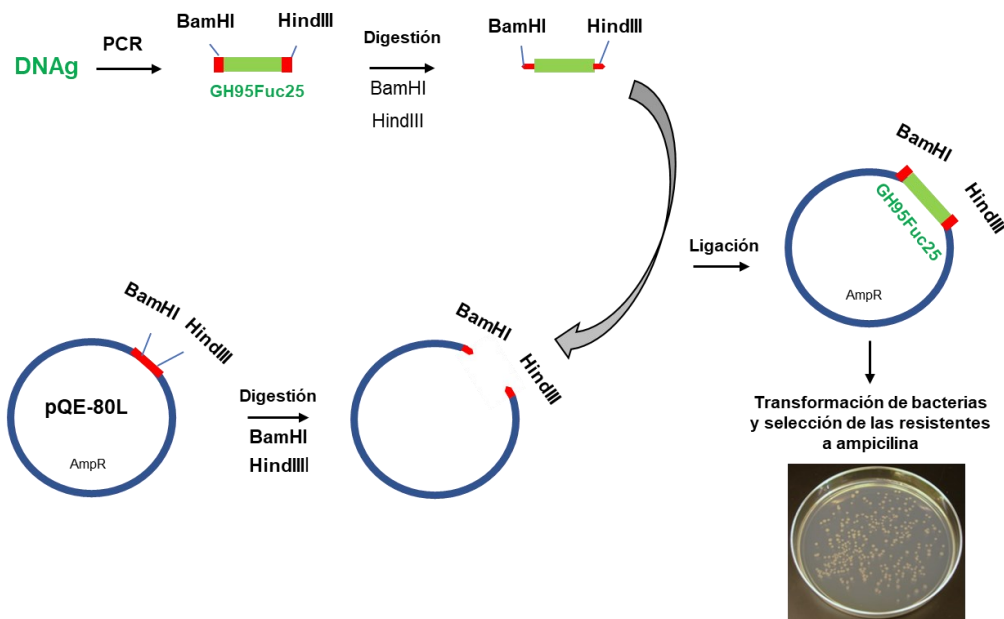


Figura 4. Estrategia de clonación de un fragmento de DNA genómico que codifica para la fucosidasa GH95Fuc25.

La amplificación del gen que codifica para la α -L-fucosidasa GH95Fuc95 se hizo por PCR tal como se describe en el apartado de Material y Métodos. Se utilizó DNAG de microbiota de heces de niños lactantes y los cebadores Fuc25BamHI y Fuc25HindIII (Figura 5A). Se obtuvo un producto de PCR con la masa molecular esperada de aproximadamente 2,3 Kb (Figura 5B).

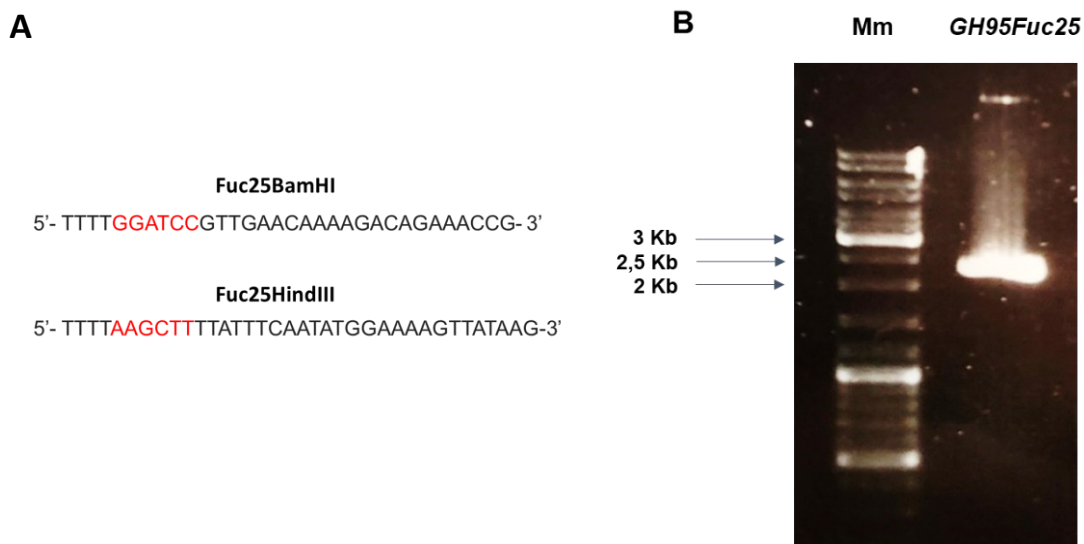


Figura 5. Amplificación por PCR del gen que codifica para la fucosidasa GH95Fuc25. A. Secuencia de nucleótidos de los cebadores utilizados en la PCR. Fuc25BamHI contiene una secuencia de nucleótidos específica del extremo 5' del fragmento del gen que codifica para la fucosidasa GH95Fuc25 a la que se añadió la secuencia de DNA que reconoce el enzima de restricción BamHI (en rojo) y Fuc25HindIII contiene una secuencia específica del extremo 3' del fragmento del gen que codifica para la fucosidasa GH95Fuc25 a la que se le añadió la secuencia de DNA que reconoce el enzima de restricción HindIII (en rojo). B. Producto de la reacción de PCR, obtenido con los cebadores que se muestran en A y DNAG de microbiota de heces de niños lactantes, tal como se indica en Material y Métodos, después de llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %.

Tanto el fragmento amplificado por PCR del gen que codifica para la enzima GH95Fuc25 como el vector pQE80L se digirieron con los enzimas de restricción BamHI y HindIII y se procedió a su ligación, tal como se indica en Material y Métodos. Con el producto de ligación se transformó la cepa DH10B de *E. coli* y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina. Se realizaron PCRs de colonias y, como se muestra en la Figura 6, dos colonias contenían un inserto del tamaño esperado (colonias 4 y 9). Se confirmó que la secuencia del inserto era correcta por secuenciación. A partir de aquí los clones derivados de las colonias 4 y 9 se denominaron 1 y 2.

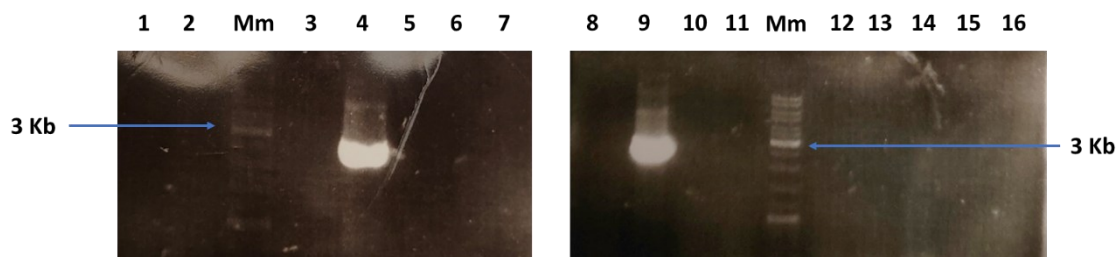


Figura 6. Geles de agarosa mostrando los productos del PCR de colonias resistentes a ampicilina obtenidas tras la ligación de pQE-80L y el gen que codifica para la enzima GH95Fuc25. La PCR se realizó como se indica en Material y Métodos utilizando los cebadores Fuc25BamHI y Fuc25HindIII. Los productos de PCR obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Mm, marcadores de masas moleculares de fragmentos de DNA.

4.2.2. Expresión y purificación de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25

Para analizar la expresión de la putativa α -L-fucosidasa GH95Fuc25 en los clones 1 y 2, se cultivaron las bacterias en presencia de IPTG y se hizo un extracto de proteínas que se analizó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Figura 7). Ambos clones expresaron una proteína con una movilidad electroforética consistente con una proteína de aproximadamente 80 kDa, siendo la masa molecular esperada de 86 kDa para la proteína recombinante 6xHis-GH95Fuc25.

Se eligió el clon procedente de la colonia 1 para purificar la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 etiquetada con poli-histidina (Figura 8), según se describe en Material y Métodos. Las fracciones que contenían la fucosidasa GH95Fuc25 purificada, se agruparon y se dializaron. Después, se hicieron alícuotas que se guardaron a -80°C en presencia de glicerol para su posterior utilización en la caracterización bioquímica de GH95Fuc25.

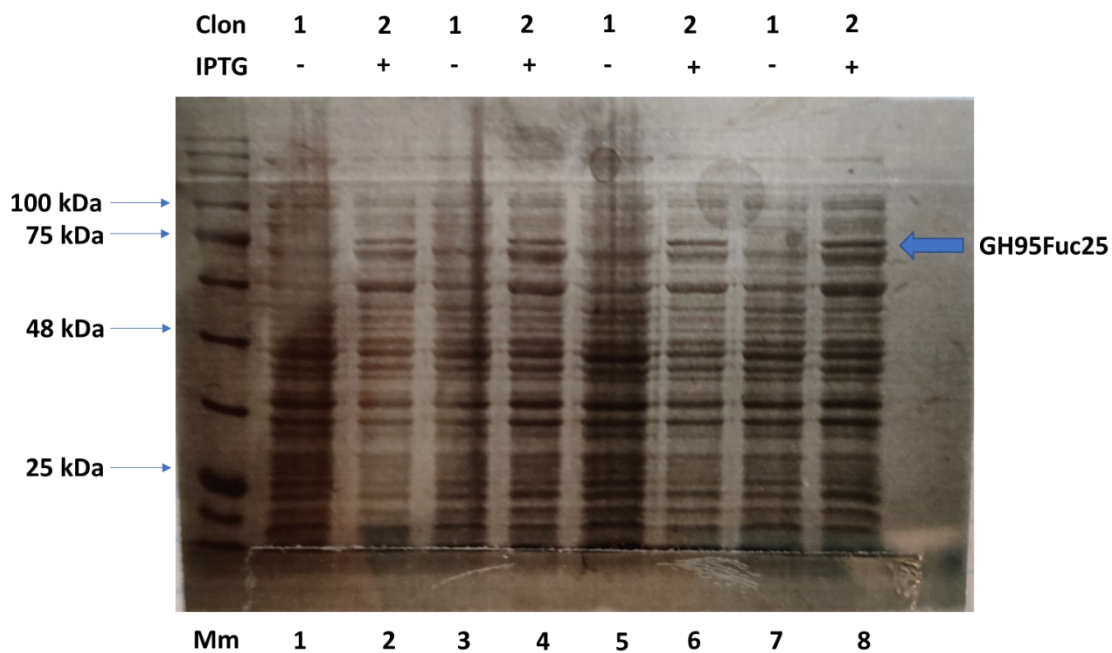


Figura 7. Análisis de la expresión de GH95Fuc25 en los clones 1 y 2 antes y después de inducir con IPTG. La inducción en los 2 clones se realizó a 25°C con IPTG 1mM durante 5 horas. Se recogieron alícuotas de los cultivos antes y después de la inducción. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en tampón de carga de electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se muestra el resultado de la electroforesis. Se cargaron proteínas correspondientes a 200 µL de cultivo en los pocillos 1-4 y a 400 µL en los pocillos 5-8 antes (-) y después (+) de la inducción con IPTG de los clones 1 y 2.

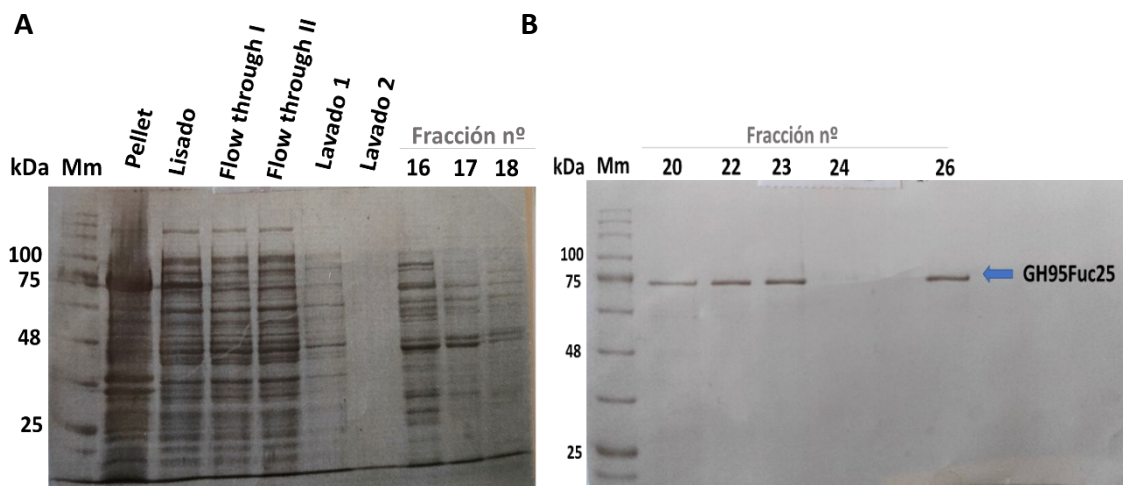


Figura 8. Purificación de la fucosidasa GH95Fuc25 aislada a partir del metagenoma microbiano de niños lactantes. Se utilizó una columna Ni Sepharose 6 Fast Flow y el sistema de cromatografía Äkta Prime FPLC (GE Healthcare) para purificar la proteína GH95Fuc25 etiquetada con poli-histidina, tal como se indica en Material y Métodos. Resultado de la electroforesis SDS-PAGE de distintas fracciones obtenidas. Las fracciones que van desde la 16 hasta la 25 se eluyeron con un gradiente de imidazol 10-500 mM. La fracción 26 se eluyó con imidazol 2M. En la figura B se pueden apreciar 4 fracciones en las que GH95Fuc25 está purificada.

4.3. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA α -L-FUCOSIDASA GH95FUC25

La actividad de la enzima purificada se analizó en primer lugar frente al sustrato sintético 4-Nitrofenil- α -L-fucopiranosido (*p* NP-fuc), midiendo la aparición de *p*-nitrofenol, tal y como se describe en Material y Métodos. La enzima fue capaz de hidrolizar este sustrato y producir *p*-nitrofenol siendo su pH óptimo de 6.0 (Figura 9) y su temperatura óptima de 40°C (Figura 10).

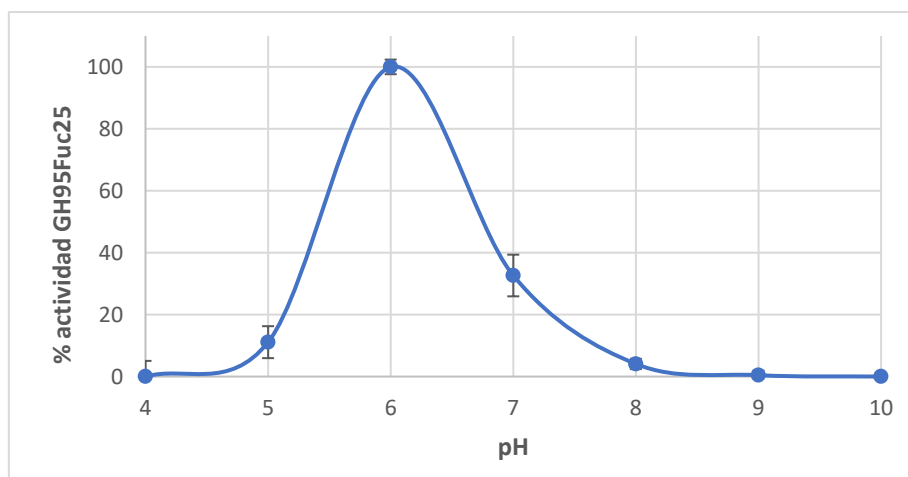


Figura 9. Representación del % de actividad de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 en función del valor de pH ensayado. Cada valor representa la media de tres medidas diferentes y las barras de error corresponden a la desviación estándar de las distintas mediciones.

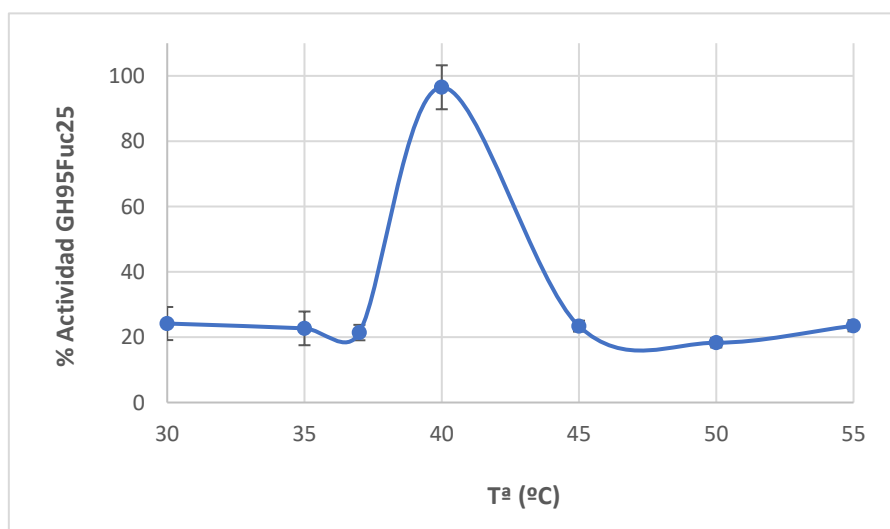


Figura 10. Representación del % de actividad de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 en función de la temperatura ensayada. Cada valor representa la media de tres medidas diferentes y las barras de error corresponden a la desviación estándar de las distintas mediciones.

Los parámetros cinéticos de la enzima para el sustrato *p*NP-fuc se determinaron a su pH y temperatura óptimas utilizando la representación de Lineweaver-Burk (el inverso de la velocidad frente al inverso de la concentración de sustrato) y se obtuvo una velocidad máxima ($v_{m\acute{a}x}$) de 14,4 nmoles/min/mg y una K_m de 3,13 mM (Anexo 3).

4.4. ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA α -L-FUCOSIDASA GH95FUC25

Para analizar la especificidad de sustrato de la α -L-fucosidasa purificada, se probó su actividad hidrolasa en AGSs tipo 1 (que contienen lacto-*N*-biosa; β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc) y tipo 2 (que contienen *N*-acetil-lactosamina; β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc), los antígenos Lewis a (Le^a) y Lewis x (Le^x) y los OLHs 2'-fucosil-lactosa (2'FL) y 3-fucosil-lactosa (3FL) (Figuras 11 y 12). El % de liberación de fucosa por parte de la enzima GH95Fuc25 de cada compuesto aparece reflejado en la Tabla 3.

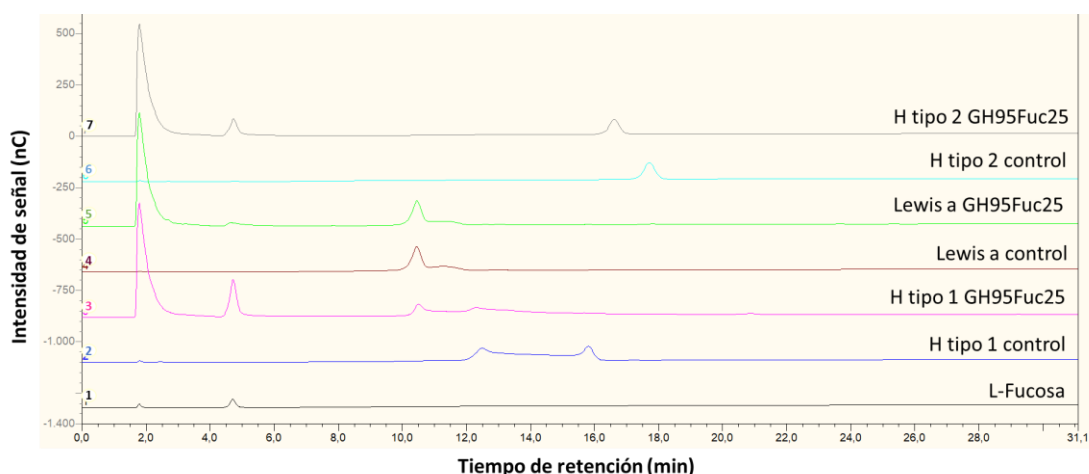


Figura 11. Hidrólisis de los antígenos sanguíneos H tipo 1, Lewis a y H tipo 2 por la α -L-fucosidasa GH95Fuc25. La figura muestra los cromatogramas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante el sistema Dyonex del compuesto estándar de L-fucosa (cromatograma 1) y los diferentes sustratos testados con y sin enzima: H-tipo1 (cromatogramas 2 y 3), Lewis a (cromatogramas 4 y 5) y H-tipo 2 (cromatogramas 6 y 7).

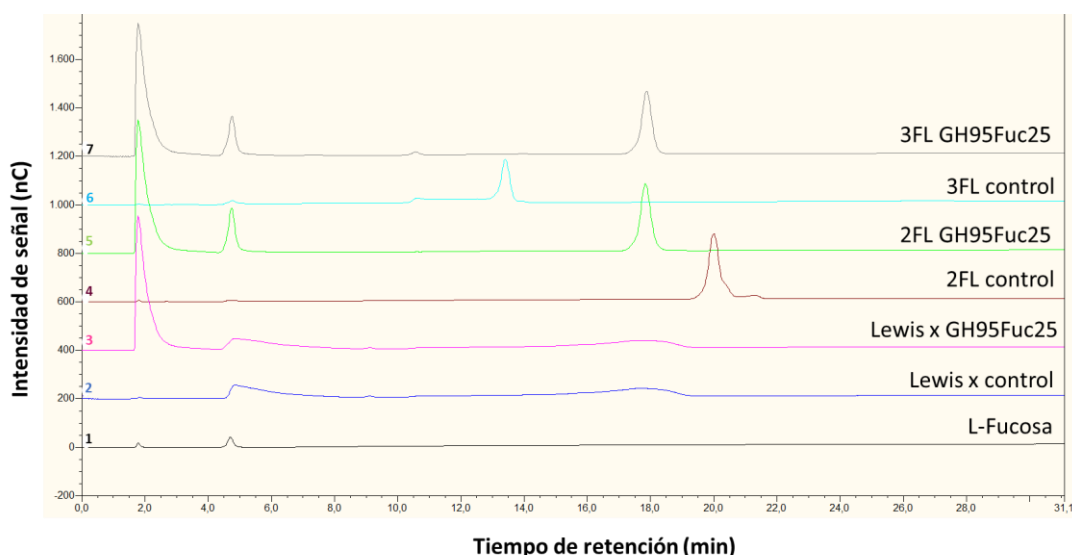
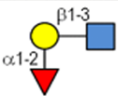
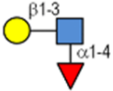
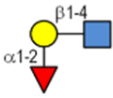
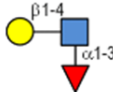
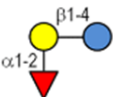
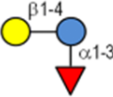


Figura 12. Hidrólisis del antígeno sanguíneo Lewis x y los OLHs 2'-fucosil-lactosa (2'FL) y 3-fucosil-lactosa (3FL) por la α -L-fucosidasa GH95Fuc25. La figura muestra los cromatogramas de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante el sistema Dyonex del compuesto estándar de L-fucosa (cromatograma 1) y los diferentes sustratos testados con y sin enzima: Lewis x (cromatogramas 2 y 3), 2'FL (cromatogramas 4 y 5) y 3FL (cromatogramas 6 y 7).

Tabla 2. Porcentaje de hidrólisis de fucosil-oligosacáridos naturales por parte de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25 aislada del metagenoma microbiano de niños lactantes¹.

| Sustrato ² | Estructura | %hidrólisis GH95Fuc25 |
|-----------------------|---|-----------------------|
| H tipo 1 |  | 100 |
| Lewis a |  | 34 |
| H tipo 2 |  | 85 |
| Lewis x |  | 0 |
| 2' FL |  | 100 |
| 3FL |  | 100 |

● Glucose
● Galactose
■ N-acetylglucosamine
▲ Fucose
◆ Sialic acid

¹Las reacciones de hidrólisis se realizaron con una concentración de oligosacáridos de 2mM, a 30°C durante 16h.

²H tipo 1, antígeno sanguíneo H tipo 1; Lewis a, antígeno de Lewis a; H tipo 2, antígeno sanguíneo H tipo 2; Lewis x, antígeno de Lewis x; 2'-FL, 2'-fucosil-lactosa; 3-FL, 3-fucosil-lactosa.

Los resultados muestran que esta fucosidasa es capaz de hidrolizar totalmente la fucosa presente en el antígeno sanguíneo tipo 1 y en un porcentaje muy elevado (>85%) la del antígeno sanguíneo tipo 2. Además, es capaz de hidrolizar totalmente la fucosa de los oligosacáridos de la leche humana (2'-fucosil-lactosa y 3-fucosil-lactosa). Estos resultados indican que la enzima GH95Fuc25 puede hidrolizar residuos de fucosa terminales α -1,2 (como se aprecia en el % de hidrólisis de H tipo 1 y el oligosacárido 2'FL de la leche humana). No obstante, debido a que no es capaz de hidrolizar totalmente el residuo de fucosa presente en el antígeno H tipo 2 (a pesar de estar unido por un enlace α -1,2 a la galactosa), sugiere que la N-acetilglucosamina (GlcNAc) unida por enlace β -1,4 a la galactosa dificulta la eliminación de fucosa por parte de GH95Fuc25. Por otra parte, la fucosidasa no es capaz de hidrolizar fucosa terminal unida por enlace α -1,3 (no es capaz de hidrolizar Lewis x) cuando está unida por este enlace a la GlcNAc, pero sí cuando está unida por este enlace a la galactosa (hidroliza eficientemente 3FL), y tiene una baja especificidad por residuos de fucosa α -1,4 (como se observa en el bajo % de hidrólisis de Lewis a).

4.5. ACTIVIDAD DE LA α -L-FUCOSIDASA GH95FUC25 SOBRE GLICOPROTEÍNAS

Se analizó la actividad de la α -L-fucosidasa caracterizada sobre glicoproteínas específicas, incluyendo la ácida α -1 humana, la lactoferrina bovina y la mucina porcina. Para ello, se midió la capacidad de GH95Fuc25 de liberar L-fucosa de estas proteínas glicosiladas (Figura 13). Los

resultados muestran que la enzima GH95Fuc25 es capaz de hidrolizar la fucosa de todas las glicoproteínas analizadas.

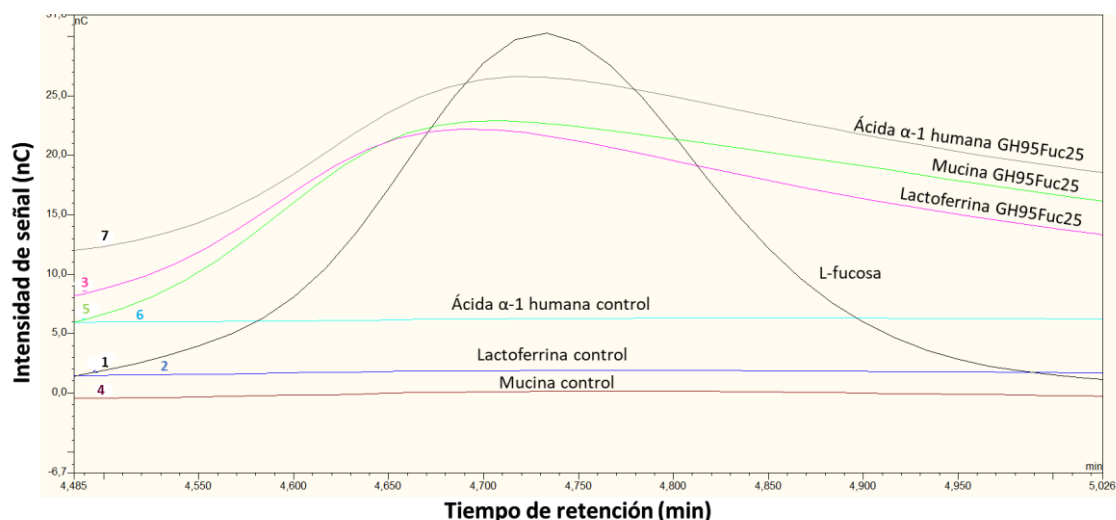


Figura 13. Hidrólisis de las glicoproteínas ácido α -1 humana, mucina porcina y lactoferrina bovina por parte de GH95Fuc25. La figura muestra los cromatogramas HPLC (sistema Dyonex) del compuesto estándar de L-fucosa (cromatograma 1) y las diferentes glucoproteínas testadas con y sin enzima: ácido α -1 humana (cromatogramas 6 y 7), mucina porcina (cromatogramas 4 y 5) y lactoferrina bovina (cromatogramas 2 y 3).

5. DISCUSIÓN

Los glicanos fucosilados presentes en la leche humana contribuyen a dar forma a la estructura de la microbiota intestinal del lactante, lo que puede tener un efecto importante sobre la salud en las primeras etapas de la vida, pero también durante toda la vida (Orczyk-Pawiłowicz et al., 2020). La capacidad de utilizar esos sustratos se basa en la expresión de una amplia gama de glicosidasas, entre las que se encuentran las α -L-fucosidasas con actividades específicas, que proceden de las bacterias intestinales (Wan et al., 2020). En este trabajo se ha caracterizado la α -L-fucosidasa GH95Fuc25, identificada a través de un análisis metagenómico de muestras de heces de niños lactantes, expandiendo el conocimiento sobre el repertorio enzimático del catabolismo de compuestos fucosilados de la microbiota del lactante. La α -L-fucosidasa caracterizada deriva del género bacteriano *Bacteroides caccae* y su pH óptimo es de 6, lo que es coherente con la actividad en el tracto gastrointestinal inferior humano, hecho que además coincide con el pH óptimo de la mayoría de las fucosidasas de la familia GH95 caracterizadas, cuyos pHs óptimos se sitúan principalmente entre 6 y 7 (Larsbrink et al., 2014; Sela et al., 2012; Wu et al., 2021). La temperatura óptima de las fucosidasas GH95 es muy amplia, pero la GH95Fuc25 se sitúa dentro del rango habitual con una temperatura óptima de 40°C, ya que se han caracterizado fucosidasas con temperaturas óptimas desde 25°C (Silchenko et al., 2022) hasta 60°C (Fan et al., 2016; Katayama et al., 2005), habiendo una caracterizada con una temperatura óptima de 37°C (Sela et al., 2012). El valor de Km obtenido (3,13 mM) para el sustrato *p* NP-fuc es bastante similar al de otras fucosidasas GH95 caracterizadas (Wu et al., 2021; Sela et al., 2012).

Las GH95 caracterizadas hasta la fecha han mostrado una gran especificidad de sustrato, actuando preferentemente sobre enlaces de fucosa α -1,2 (Shani et al., 2022, Léonard et al., 2008). La fucosidasa caracterizada en este trabajo es capaz de hidrolizar completamente los residuos de fucosa terminales α -1,2 presentes en el antígeno H tipo 1 y el oligosacárido de la leche humana 2'FL. GH95Fuc25 hidroliza también el enlace α -1,3 presente en la 3FL, pero no en el antígeno sanguíneo Lewis x, sugiriendo que la GlcNAc presente en este oligosacárido interfiere con la hidrólisis de la fucosa. Por otra parte, GH95Fuc25 muestra actividad sobre enlaces de fucosa α -1,4 (presente en Lewis a) con baja eficiencia. A pesar de que la especificidad por los enlaces α -1,4 y α -1,3 no sea una característica frecuente en las fucosidasas GH95 caracterizadas hasta la fecha, es de destacar que, a diferencia de GH95Fuc25, todas las enzimas GH95 descritas con capacidad de hidrolizar Lewis a también hidrolizan Lewis x (Wu et al., 2021, Fan et al., 2016).

Con respecto a la actividad de GH95Fuc25 sobre glicoproteínas, ésta es capaz de hidrolizar la fucosa de todas las glicoproteínas analizadas. Así, libera fucosa de la mucina porcina para la que se han descrito que tiene residuos de fucosa unidos a la galactosa por un enlace α -1,2 (Yamada et al., 2007), y la GH95Fuc25 tiene actividad sobre este enlace presente en la 2'FL y en los antígenos sanguíneos H tipo 1 y 2.

Proyectos como el realizado en este trabajo fin de grado tienen un gran potencial biotecnológico ya que los glicoconjugados fucosilados desempeñan funciones fundamentales en una amplia gama de procesos fisiológicos, incluidas las respuestas inmunitarias, la fertilización, la metástasis tumoral y las interacciones huésped-microbioma. En particular, se ha descrito que los patrones de fucosilación de N-glicanos séricos humanos son indicadores de respuestas inmunológicas de distintas enfermedades y son utilizados cada vez más como biomarcadores de enfermedades como el cáncer (Pinho et al., 2015), la infección por *Helicobacter pylori* (Liu et al., 2009) o la diabetes (Thanabalasingham et al., 2013). Así pues, la caracterización de α -L-fucosidasas de microorganismos con distintas especificidades de sustrato es de gran interés ya que estas enzimas pueden utilizarse como exoglicosidasas para detectar estos biomarcadores de glicanos (Demus et al., 2022; Wu et al., 2023). Estas enzimas también pueden utilizarse en la ingeniería de glicosilación de proteínas con el objetivo de modular la fucosilación en diferentes glicoproteínas, como por ejemplo los anticuerpos. Específicamente se está estudiando su uso en anticuerpos terapéuticos ya que se ha descrito una mayor efectividad de los anticuerpos terapéuticos afucosilados en algunos tratamientos de cáncer (Pereira et al., 2018). Otra aplicación de las α -L-fucosidasas es su utilización para la síntesis enzimática de glicanos fucosilados de interés como los OLHs (Wan et al., 2020) Por otra parte, como se ha mencionado anteriormente, el laboratorio donde se ha realizado este proyecto colabora con el laboratorio del Dr. Jesús Rodríguez, de la Universidad de Valencia, especializado en enteropatógenos (rotavirus y norovirus). Como los AGSs son reconocidos diferencialmente por distintos genotipos virales (Monedero et al., 2018), en un futuro se pretende estudiar específicamente el potencial antiviral de α -L-fucosidasa GH95Fuc25 caracterizada en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

- 1) Se ha clonado y expresado en *Escherichia coli* el gen que codifica para una α -L-fucosidasa (GH95Fuc25) de *Bacteroides caccae* perteneciente a la familia GH95 a partir del metagenoma de la microbiota de heces de niños lactantes.
- 2) GH95Fuc25 se ha expresado con una etiqueta de poli-histidina en el extremo N-terminal, lo que ha permitido su purificación a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad.
- 3) GH95Fuc25 se ha caracterizado bioquímicamente y ha demostrado tener un pH óptimo de 6, una temperatura óptima de 40°C, una K_m de 3,13 mM y una velocidad máxima de 14,4 nmoles/min/mg.
- 4) GH95Fuc25 ha mostrado diferente especificidad de sustrato hacia oligosacáridos de la leche humana (OLHs) y antígenos de los grupos sanguíneos (AGSs), siendo capaz de hidrolizar eficientemente el antígeno del grupo sanguíneo H tipo 1 y tipo 2, y los OLHs 2'-fucosil-lactosa y 3-fucosil-lactosa. Hidroliza el antígeno Lewis a con baja eficiencia y no hidroliza el antígeno Lewis x.
- 5) GH95Fuc25 es capaz de hidrolizar residuos de fucosa presente en las glicoproteínas ácida α -1 humana, lactoferrina bovina y mucina porcina.

7. REFERENCIAS

- BRADFORD M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- BROWNE, H. P., SHAO, Y., & LAWLEY, T. D. (2022). Mother-infant transmission of human microbiota. *Current opinion in microbiology*, 69, 102173.
- CAZY (2023). <http://www.cazy.org/>
- DEMUS, D., URBANOWICZ, P. A., GARDNER, R. A., WU, H., JUSZCZAK, A., ŠTAMBUK, T., MEDVIDOVIĆ, E. P., OWEN, K. R., GORNIK, O., JUGE, N., & SPENCER, D. I. R. (2022). Development of an exoglycosidase plate-based assay for detecting α 1-3,4 fucosylation biomarker in individuals with HNF1A-MODY. *Glycobiology*, 32(3), 230–238.
- EUROFINS GENOMICS (2023). <https://eurofinsgenomics.eu/>
- FAN, S., ZHANG, H., CHEN, X., LU, L., XU, L., & XIAO, M. (2016). Cloning, characterization, and production of three α -L-fucosidases from *Clostridium perfringens* ATCC 13124. *Journal of basic microbiology*, 56(4), 347–357.
- FROGER, A., & HALL, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (6), 253.
- IOANNOU, A., KNOL, J., & BELZER, C. (2021). Microbial Glycoside Hydrolases in the First Year of Life: An Analysis Review on Their Presence and Importance in Infant Gut. *Frontiers in microbiology*, 12, 631282.
- KATAYAMA, T., FUJITA, K., & YAMAMOTO, K. (2005). Novel bifidobacterial glycosidases acting on sugar chains of mucin glycoproteins. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(5), 457–465.
- LAEMMLI U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- LARSBRINK, J., THOMPSON, A. J., LUNDQVIST, M., GARDNER, J. G., DAVIES, G. J., & BRUMER, H. (2014). A complex gene locus enables xyloglucan utilization in the model saprophyte *Cellvibrio japonicus*. *Molecular microbiology*, 94(2), 418–433.
- LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, C. Y., & KIM, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (62), 3923.
- LÉONARD, R., PABST, M., BONDILI, J. S., CHAMBAT, G., VEIT, C., STRASSER, R., & ALTMANN, F. (2008). Identification of an *Arabidopsis* gene encoding a GH95 α 1,2-fucosidase active on xyloglucan oligo-mand polysaccharides. *Phytochemistry*, 69(10), 1983–1988.
- LIU, T. W., HO, C. W., HUANG, H. H., CHANG, S. M., POPAT, S. D., WANG, Y. T., WU, M. S., CHEN, Y. J., & LIN, C. H. (2009). Role for α -L-fucosidase in the control of *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), 14581–14586.

MADEIRA, F., PARK, Y. M., LEE, J., BUSO, N., GUR, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, *47*(W1), W636–W641.

MONEDERO, V., BUESA, J., & RODRÍGUEZ-DÍAZ, J. (2018). The Interactions between Host Glycobiology, Bacterial Microbiota, and Viruses in the Gut. *Viruses*, *10*(2), 96.

MOYA-GONZÁLVEZ, E. M., Peña-Gil, N., Rubio-Del-Campo, A., Coll-Marqués, J. M., GOZALBO-ROVIRA, R., MONEDERO, V., RODRÍGUEZ-DÍAZ, J., & YEBRA, M. J. (2022). Infant Gut Microbial Metagenome Mining of α -L-Fucosidases with Activity on Fucosylated Human Milk Oligosaccharides and Glycoconjugates. *Microbiology spectrum*, *10*(4), e0177522.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2023).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ORCZYK-PAWIŁOWICZ, M., & LIS-KUBERKA, J. (2020). The Impact of Dietary Fucosylated Oligosaccharides and Glycoproteins of Human Milk on Infant Well-Being. *Nutrients*, *12*(4), 1105.

PEREIRA, N. A., CHAN, K. F., LIN, P. C., & SONG, Z. (2018). The "less-is-more" in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *mAbs*, *10*(5), 693–711.

PINHO, S. S., & REIS, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature reviews. Cancer*, *15*(9), 540–555.

QIAGEN 2013. Visto 5 de febrero 2023.

<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c3b71572-4d82-4671-a79b-96357fe926d1&lang=en>

SELA, D. A., GARRIDO, D., LERNO, L., WU, S., TAN, K., EOM, H. J., Joachimiak, A., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2012). Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 α -fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied and environmental microbiology*, *78*(3), 795–803.

SHANI, G., HOEFLINGER, J. L., HEISS, B. E., MASARWEH, C. F., LARKE, J. A., JENSEN, N. M., WICKRAMASINGHE, S., DAVIS, J. C., GOONATILLEKE, E., EL-HAWIET, A., NGUYEN, L., KLASSEN, J. S., SLUPSKY, C. M., LEBRILLA, C. B., & MILLS, D. A. (2022). Fucosylated Human Milk Oligosaccharide Foraging within the Species Bifidobacterium pseudocatenulatum Is Driven by Glycosyl Hydrolase Content and Specificity. *Applied and environmental microbiology*, *88*(2), e0170721.

SILCHENKO, A. S., RUBTSOV, N. K., ZUEVA, A. O., KUSAYKIN, M. I., RASIN, A. B., & ERMAKOVA, S. P. (2022). Fucoidan-active α -L-fucosidases of the GH29 and GH95 families from a fucoidan degrading cluster of the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*. *Archives of biochemistry and biophysics*, *728*, 109373.

THANABALASINGHAM, G., HUFFMAN, J. E., KATTLA, J. J., NOVOKMET, M., RUDAN, I., GLOYN, A. L., HAYWARD, C., ADAMCZYK, B., REYNOLDS, R. M., MUZINIC, A., HASSANALI, N., PUCIC, M., BENNETT, A. J., ESSAFI, A., POLASEK, O., MUGHAL, S. A., REDZIC, I., PRIMORAC, D., ZGAGA, L., KOLCIC, I., ... WRIGHT, A. F. (2013). Mutations in HNF1A result in marked alterations of plasma glycan profile. *Diabetes*, *62*(4), 1329–1337.

- WAN, L., ZHU, Y., ZHANG, W., & MU, W. (2020). α -L-Fucosidases and their applications for the production of fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(13), 5619–5631.
- WU, H., OWEN, C. D., & JUGE, N. (2023). Structure and function of microbial α -l-fucosidases: a mini review. *Essays in biochemistry*, 67(3), 399–414.
- WU, H., REBELLO, O., CROST, E. H., OWEN, C. D., WALPOLE, S., BENNATI-GRANIER, C., NDEH, D., MONACO, S., HICKS, T., COLVILE, A., URBANOWICZ, P. A., WALSH, M. A., ANGULO, J., SPENCER, D. I. R., & JUGE, N. (2021). Fucosidases from the human gut symbiont *Ruminococcus gnavus*. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 78(2), 675–693.
- YAMADA, K., Hyodo, S., MATSUNO, Y. K., KINOSHITA, M., MARUYAMA, S. Z., OSAKA, Y. S., CASAL, E., LEE, Y. C., & KAKEHI, K. (2007). Rapid and sensitive analysis of mucin-type glycans using an in-line flow glycan-releasing apparatus. *Analytical biochemistry*, 371(1), 52–61.
- ZHANG, H., YOHE, T., HUANG, L., ENTWISTLE, S., WU, P., YANG, Z., BUSK, P. K., XU, Y., & YIN, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic acids research*, 46(W1), W95–W101.
- ZHANG, S., LI, T., XIE, J., ZHANG, D., PI, C., ZHOU, L., & YANG, W. (2021). Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota. *Microbial cell factories*, 20(1), 108.
- ZIVKOVIC, A. M., GERMAN, J. B., LEBRILLA, C. B., & MILLS, D. A. (2011). Human milk glycomiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(Suppl 1), 4653–4658.
- ZÚÑIGA, M., MONEDERO, V., & YEBRA, M. J. (2018). Utilization of Host-Derived Glycans by Intestinal *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Species. *Frontiers in microbiology*, 9, 1917.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Matriz de porcentaje de identidad de aminoácidos de las α -L-fucosidasas encontradas en el metagenoma microbiano de niños lactantes. Las fucosidasas con una identidad de aminoácidos superior al 64% están sombreadas del mismo color. La matriz se generó utilizando el programa de alineación de secuencias CLUSTAL Omega de EMBL-EBI (Madeira et al., 2019)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 1: NODE_318 | 100.00 | 20.03 | 20.55 | 22.54 | 22.83 | 17.11 | 16.84 | 20.87 | 19.42 | 21.27 | 19.11 | 23.08 | 22.95 | 22.21 | 22.11 | 17.85 | 20.00 | 20.00 | 20.00 | 18.20 | 19.20 | 18.87 | 18.87 | 20.26 | 20.61 | 20.76 | 20.41 | 20.26 | |
| 2: NODE_319 | 20.03 | 100.00 | 64.34 | 25.65 | 23.31 | 17.49 | 18.57 | 19.79 | 18.86 | 17.02 | 19.46 | 20.24 | 20.24 | 20.51 | 20.46 | 18.72 | 18.72 | 19.20 | 19.20 | 19.20 | 18.58 | 18.20 | 18.20 | 21.04 | 21.08 | 21.23 | 21.23 | 20.06 | |
| 3: NODE_319 | 20.55 | 64.34 | 100.00 | 25.38 | 24.30 | 17.16 | 16.57 | 18.35 | 17.02 | 17.47 | 20.00 | 19.28 | 19.70 | 19.16 | 17.85 | 17.85 | 17.82 | 17.82 | 17.82 | 17.82 | 18.93 | 18.93 | 18.93 | 21.83 | 21.83 | 21.83 | 20.60 | 19.28 | |
| 4: NODE_319 | 22.24 | 25.65 | 25.38 | 100.00 | 45.84 | 19.84 | 19.20 | 21.65 | 20.85 | 22.44 | 22.69 | 22.98 | 23.04 | 23.42 | 23.42 | 19.27 | 21.20 | 20.78 | 20.50 | 20.78 | 21.11 | 19.13 | 19.17 | 22.01 | 22.29 | 21.89 | 23.36 | 20.12 | |
| 5: NODE_319 | 22.83 | 23.31 | 24.30 | 45.84 | 100.00 | 18.87 | 19.47 | 23.28 | 21.20 | 22.35 | 21.68 | 23.90 | 22.47 | 23.23 | 23.35 | 19.60 | 20.20 | 19.42 | 19.12 | 19.12 | 21.28 | 19.46 | 19.46 | 23.97 | 23.17 | 21.91 | 23.78 | 21.50 | |
| 6: NODE_20 | 17.11 | 17.49 | 17.16 | 19.84 | 18.87 | 100.00 | 27.30 | 24.65 | 20.32 | 21.11 | 22.76 | 26.59 | 26.23 | 25.85 | 26.06 | 23.85 | 23.30 | 23.10 | 23.10 | 26.40 | 26.32 | 26.32 | 23.38 | 23.17 | 23.17 | 23.05 | 23.61 | 21.80 | |
| 7: NODE_579 | 16.84 | 18.17 | 16.17 | 18.30 | 19.47 | 27.30 | 100.00 | 24.76 | 21.60 | 23.47 | 22.09 | 24.92 | 25.21 | 24.79 | 25.04 | 21.88 | 21.20 | 23.06 | 23.06 | 26.78 | 26.82 | 26.82 | 24.27 | 23.81 | 23.25 | 23.42 | 24.28 | 21.50 | |
| 8: NODE_248 | 20.87 | 19.79 | 19.35 | 21.65 | 23.28 | 24.65 | 24.76 | 100.00 | 33.00 | 38.37 | 38.66 | 41.83 | 38.82 | 39.68 | 40.79 | 30.04 | 30.23 | 30.58 | 30.58 | 38.29 | 38.29 | 38.29 | 34.53 | 33.09 | 35.68 | 35.81 | 36.03 | 35.04 | |
| 9: NODE_23 | 19.42 | 18.84 | 17.88 | 20.59 | 21.20 | 20.32 | 21.60 | 33.00 | 100.00 | 47.49 | 35.25 | 35.16 | 33.50 | 33.87 | 33.04 | 25.84 | 30.07 | 30.38 | 30.38 | 30.24 | 31.38 | 30.56 | 30.56 | 29.25 | 30.56 | 30.56 | 31.21 | 28.69 | |
| 10: NODE_215 | 21.47 | 17.05 | 17.02 | 20.85 | 22.35 | 21.71 | 23.47 | 38.37 | 47.49 | 100.00 | 36.74 | 39.32 | 37.44 | 36.32 | 37.76 | 26.74 | 28.24 | 28.34 | 28.34 | 31.38 | 31.38 | 31.38 | 33.76 | 33.60 | 34.49 | 34.49 | 33.82 | 31.18 | |
| 11: NODE_25 | 19.11 | 19.04 | 17.47 | 22.84 | 21.88 | 22.76 | 22.09 | 38.66 | 35.25 | 36.74 | 100.00 | 35.25 | 38.28 | 39.30 | 40.14 | 28.42 | 28.26 | 28.26 | 28.26 | 34.05 | 34.05 | 34.05 | 33.33 | 33.04 | 35.05 | 35.19 | 37.38 | 34.93 | |
| 12: NODE_1068 | 23.08 | 20.34 | 20.00 | 22.89 | 23.80 | 26.99 | 24.92 | 41.85 | 35.16 | 39.32 | 35.25 | 100.00 | 56.23 | 74.32 | 74.28 | 29.13 | 34.61 | 34.61 | 34.61 | 34.23 | 34.23 | 34.23 | 35.94 | 35.94 | 35.94 | 35.94 | 37.03 | 36.76 | |
| 13: NODE_990 | 22.95 | 20.21 | 19.28 | 22.29 | 22.47 | 26.23 | 25.21 | 38.82 | 33.00 | 37.44 | 38.28 | 56.23 | 100.00 | 71.76 | 72.26 | 28.49 | 33.52 | 33.52 | 33.52 | 33.38 | 33.38 | 33.38 | 37.92 | 37.11 | 37.44 | 37.45 | 37.17 | 35.81 | |
| 14: NODE_18 | 22.21 | 20.48 | 19.70 | 23.04 | 23.23 | 25.83 | 24.79 | 39.68 | 33.87 | 36.92 | 39.30 | 74.32 | 71.76 | 100.00 | 85.31 | 29.10 | 32.14 | 32.14 | 32.14 | 33.38 | 33.38 | 33.38 | 37.06 | 37.01 | 37.14 | 37.45 | 37.45 | 34.21 | |
| 15: NODE_18 | 22.11 | 20.69 | 19.16 | 23.62 | 23.35 | 26.06 | 25.04 | 40.79 | 33.04 | 37.76 | 40.14 | 74.32 | 72.26 | 85.31 | 100.00 | 28.36 | 33.36 | 33.36 | 33.36 | 33.47 | 33.47 | 33.47 | 37.66 | 37.69 | 38.56 | 38.56 | 35.54 | 34.21 | |
| 16: NODE_42 | 17.83 | 18.72 | 17.93 | 19.37 | 19.60 | 23.63 | 21.88 | 30.04 | 25.84 | 26.74 | 28.42 | 29.13 | 28.49 | 29.10 | 28.96 | 100.00 | 27.04 | 26.40 | 26.13 | 26.13 | 26.23 | 26.23 | 31.22 | 31.22 | 31.22 | 31.26 | 31.90 | 31.90 | |
| 17: NODE_1 | 20.00 | 20.81 | 17.92 | 21.40 | 20.40 | 22.80 | 21.40 | 30.23 | 30.07 | 28.54 | 32.86 | 34.61 | 33.42 | 33.44 | 33.44 | 100.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 34.78 | 34.15 | 35.03 | 35.03 | 34.24 | 33.33 | |
| 18: NODE_266 | 20.00 | 18.40 | 17.89 | 20.79 | 19.42 | 22.80 | 21.40 | 30.23 | 30.38 | 28.54 | 32.86 | 34.61 | 33.42 | 33.44 | 33.44 | 100.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 34.78 | 34.15 | 35.03 | 35.03 | 34.24 | 33.33 | |
| 19: NODE_264 | 20.00 | 18.40 | 17.89 | 20.40 | 19.12 | 23.10 | 22.78 | 30.30 | 30.24 | 31.89 | 32.62 | 34.05 | 33.38 | 33.47 | 33.47 | 100.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 34.78 | 34.15 | 35.03 | 35.03 | 34.24 | 33.33 | |
| 20: NODE_45A | 19.97 | 18.40 | 17.03 | 19.75 | 19.46 | 26.32 | 24.27 | 34.69 | 30.56 | 32.30 | 35.18 | 39.37 | 37.92 | 38.06 | 38.06 | 34.93 | 33.78 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 31.61 | |
| 21: NODE_1769 | 18.87 | 18.40 | 17.03 | 19.75 | 19.46 | 26.32 | 24.27 | 34.69 | 30.56 | 32.30 | 35.18 | 39.37 | 37.92 | 38.06 | 38.06 | 34.93 | 33.78 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 31.61 | |
| 22: NODE_249B | 18.87 | 18.40 | 17.03 | 19.75 | 19.46 | 26.32 | 24.27 | 34.69 | 30.56 | 32.30 | 35.18 | 39.37 | 37.92 | 38.06 | 38.06 | 34.93 | 33.78 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 34.31 | 31.61 | |
| 23: NODE_37 | 20.46 | 21.08 | 18.83 | 22.01 | 22.87 | 23.38 | 23.81 | 35.09 | 33.76 | 33.33 | 40.04 | 37.44 | 37.44 | 37.44 | 37.44 | 100.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 21.80 |
| 24: NODE_183 | 20.61 | 21.08 | 18.83 | 22.29 | 22.21 | 23.17 | 23.23 | 35.68 | 34.49 | 36.03 | 38.54 | 37.43 | 37.43 | 37.43 | 37.43 | 100.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 21.80 |
| 25: NODE_400 | 20.41 | 21.23 | 18.80 | 21.89 | 21.81 | 23.17 | 23.23 | 35.61 | 34.49 | 36.19 | 38.38 | 37.17 | 37.17 | 37.17 | 37.17 | 100.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 21.80 |
| 26: NODE_180 | 20.41 | 21.23 | 20.60 | 23.36 | 23.78 | 23.09 | 23.42 | 36.03 | 35.21 | 35.82 | 37.38 | 37.03 | 37.03 | 37.03 | 37.03 | 100.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 25.00 | 21.80 |
| 27: NODE_247 | 20.66 | 20.06 | 19.28 | 20.12 | 21.60 | 23.61 | 24.28 | 35.04 | 28.69 | 31.18 | 34.93 | 36.76 | 35.89 | 34.21 | 34.21 | 31.90 | 33.33 | 33.33 | 33.33 | 33.48 | 33.48 | 33.48 | 45.87 | 45.88 | 50.74 | 50.62 | 60.78 | 100.00 | |

ANEXO 2. Secuencia deducida de aminoácidos de la α -L-fucosidasa GH95Fuc25. Se resalta en amarillo el péptido señal que se ha eliminado en la proteína recombinante GH95Fuc25 expresada en *E.coli*.

```

1      MLLRRNFIKS ICVLLLFAGP VAGVEQKTET VPMRLWYDRP ATNWMTSALP IGGELGALF
61     FGGVESEQIL FNEKTLWTGS TTTRGAYQKF GDVWIHFDGQ EDVREYRREL SLDEAIGKVS
121    YTSAGTHYLR EYFASRPDEV IVLRLSTPKA GKKNLFSVSL ADGRPGTRQE ITKDGILFRR
181    KLDLLSYEAQ LKVINEGGTL VADSNKLCVN AANSVLILLT AATNYDLSSA TYVGETSGQL
241    HKRLTDRLAR ASAKGYDQLK STHLNDYQSL FNRVRFDLRT AAKTGGKIGM KTEIPSVPTN
301    ELVRLHKEAL YLDMLYFQYG RYLMIASSRG MNLPNNLQGI WNGDNAPPWE CDIHSNINIQ
361    MNYWPAEVCN LSECHEPFIR YIATEALRPG GSWQQLARSE GLRGWTVNTQ NNIFGYTDWN
421    INRPANAWYC MHLWKHYAYT QDINYLRVA YPVMRSTCEY WFDRLQLTAD GVLLAPAEWS
481    PEHGPWEDGV AYAQQLVWQL FSETMQAVRV LRGAGIPLDA DFVRKLSEKL KRLDNGVTLG
541    AWEQIREWRE DSQKLDTLGN PRRHLSQLIA LYPGNQISYY KDAKYADAAK RTLESRGDLG
601    TGWSRAWKIA AWARLQDGEH AYRLLKSALD FSTLTVISMD NDQGGVYENL FDSHPPFQID
661    GNFGATAGIA EMLLQSHQGF IHLLPALPSV WANGSVTGLR AEGDFTFTME WNAGRLTQCA
721    VTSGHGGEER IYCPAARWLK VKNSKGEKIT VSSIDKDVIS FSTVKGETYN FSILK

```

ANEXO 3. Cinética enzimática de Lineweaver-Burk de GH95Fuc25. Se representa la inversa de la velocidad (moles/min/mg) frente a la inversa de la concentración de sustrato (mM). Se ensayaron tres concentraciones de sustrato diferentes (0'625, 1'25 y 2'5 mM).

