**Resumen**

La leche humana contiene una gran cantidad de oligosacáridos, libres o unidos a lípidos y proteínas, y su función fisiológica es mayoritariamente desconocida. Estos oligosacáridos son resistentes a la digestión y una gran proporción llega al intestino del lactante, donde pueden ser substratos para la microbiota. La lacto-N-biosa (LNB) y la galacto-N-biosa (GNB) son las estructuras tipo-1 que forman el núcleo de los oligosacáridos de la leche humana (OLH) y de las glicoproteínas de la mucina, respectivamente. Los dos azúcares son fermentados por especies del género *Bifidobacterium*, pero no hay datos acerca de su utilización por el género *Lactobacillus*. Tampoco hay información para este género acerca del metabolismo de la N-acetil-lactosamina (LacNAc), que constituye la cadena de azúcar tipo-2 en los OLH, y de la lacto-N-triosa, que forma parte de la estructura de la lacto-N-tetraosa, uno de los OLH más abundantes.

*Lactobacillus casei* es una bacteria láctica aislada de numerosos nichos ambientales como leche, carne, materia vegetal y los tractos reproductivos y gastrointestinales de animales y humanos, incluyendo el intestino de niños lactantes. Además, algunas cepas se utilizan como cultivos iniciadores en la industria láctea y también como probióticos. Esta característica ha llevado a que una de las aplicaciones más recientes de esta especie sea su adición a fórmulas maternizadas. En este estudio se ha utilizado la cepa de *L. casei* BL23, porque tiene propiedades probióticas, se puede manipular genéticamente y se dispone de la secuencia de su genoma.

La capacidad de *L. casei* de prevalecer en el sistema gastrointestinal dependerá en parte de su versatilidad metabólica para utilizar los carbohidratos disponibles. En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que la cepa *L. casei* BL23 se puede cultivar en presencia de LNB, GBN, LacNAc, y lacto-N-triosa como fuentes de carbono. En el metabolismo de la LNB, GNB y también N-acetilgalactosamina (GalNAc) está implicado el operon *gnbREFGBCDA*. El análisis de actividades enzimáticas y de mutantes para estos genes demostró que esos tres carbohidratos son transportados por el mismo sistema fosfotransferasa de azúcares dependiente de fosfoenolpiruvato (PTSGnb), y que la fosfo--galactosidasa GnbG hidroliza ambos disacáridos. Sin embargo, la N-acetilgalactosamina-6P deacetilasa (GnbF) y la galactosamina-6P isomerasa/deaminasa (GnbE) están implicadas en la fermentación de la GNB, pero no de la LNB. La utilización de ésta depende del gen *nagA*, que codifica para una N-acetilglucosamina-6P deacetilasa. Análisis transcripcionales demostraron que el operon *gnb* está regulado por inducción del substrato mediada por el represor transcripcional GnbR, el cual se une a una región de DNA de 26 pares de bases que contiene secuencias invertidas repetidas exhibiendo un núcleo conservado 2T/2A. Por encima del operon *gnb*, hay dos genes *bnaG* y *manA*, que codifican para el precursor de una -N-acetilglucosaminidasa y una manosa-6P isomerasa. Se ha demostrado que BnaG es un enzima extracelular unido a la pared celular y que está implicado en el metabolismo de la lacto-N-triosa. Ésta es hidrolizada por BnaG en lactosa y N-acetilglucosamina (GlcNAc). El enzima ManA está implicada en el metabolismo de la manosa presente en el disacárido 3’-N-acetilglucosaminil-manosa, el cual es también una fuente de carbono para *L. casei* BL23. Por último, en esta cepa se ha demostrado que la LacNAc es transportada y fosforilada por el PTS de la lactosa e hidrolizada intracelularmente por la fosfo--galactosidasa LacG en galactosa-6P y GlcNAc. Análisis transcripcionales demostraron que el operon *lac*, además de por lactosa, está también inducido por LacNAc.

Para intentar comprender mejor el metabolismo y potencial bioactivo de los OLH se necesitan cantidades adecuadas de éstos, las cuales, dadas las dificultades implícitas a su obtención de la leche humana o por síntesis química, dependerán del desarrollo de aproximaciones enzimáticas. Además, los oligosacáridos son abundantes en la leche humana pero no en las fórmulas infantiles. Con el objeto de disponer de LNB y GNB en cantidad suficiente para ensayar su actividad biológica, se han sintetizado *in vitro* ambos disacáridos utilizando para ello la capacidad de transglicosidación de la glicosil hidrolasa GnbG aislada de *L. casei*. Las reacciones de transglicosidación se escalaron, los productos resultantes se purificaron, y se obtuvieron rendimientos de 10.7 ± 0.2 g/l de LNB y 10.8 ± 0.3 g/l de GNB.

Ambos disacáridos fueron utilizados *in vitro* para determinar sus propiedades prebióticas potenciales con 33 cepas de *Lactobacillus* correspondientes a 13 especies diferentes. Se determinó que 21 de las cepas, correspondientes a las especies *L. casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus johnsonii* fueron capaces de metabolizar tanto GNB como LNB. Experimentos de hibridación de DNA demostraron que el metabolismo de estos disacáridos en las cepas de *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. zeae* depende de una fosfo--galactosidasa homóloga a GnbG.

Existen evidencias científicas recientes que les atribuyen a los OLH propiedades inmunomoduladoras, así que se han determinado éstas *in vitro* para LNB y GNB, y para dos fucosiloligosacáridos (Fuc-α-1,3-GlcNAc y Fuc-α-1,6-GlcNAc) sintetizados anteriormente en nuestro laboratorio. Se ha demostrado que los cuatro disacáridos son capaces de incrementar significativamente la producción de IFN-γ en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC). El Fuc--1,6-GlcNAc además fue capaz de reducir significativamente la producción de IL13. Estos resultados sugieren un efecto estimulante del sistema inmune y en el caso particular del Fuc-α-1,6-GlcNAc un efecto polarizador de la respuesta inmune Th1/Th2 hacia poblaciones Th1.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han permitido ampliar los conocimientos sobre la síntesis, el metabolismo por especies del género *Lactobacillus*, y las propiedades inmunomoduladorasde oligosacáridos específicos presentes en la leche humana y en la mucosa. Esto podría contribuir a entender mejor la posible función de los OLH en la colonización por esas especies del tracto gastrointestinal de los niños, y en la estimulación de la respuesta inmune.