



**UNIDAD IZTAPALAPA**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Biotecnología**

**Estudio de la producción de fucosidasas intracelulares de  
bacterias ácido lácticas.**

Tesis que presenta

**I. A. Nayeli Barrón Álvarez**

Para obtener el grado de

**Especialidad en Biotecnología**

Asesoras

**M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz**

**Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero**

Lectora

**M. en B. Yolanda Escamilla Iozano**

**México, D.F.**

**Julio, 2013**



**UNIDAD IZTAPALAPA**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Departamento de Biotecnología**

**Estudio de la producción de fucosidasas intracelulares de bacterias ácido lácticas.**

Tesis que presenta

**I. A. Nayeli Barrón Álvarez**

Para obtener el grado de

**Especialidad en Biotecnología**

**Asesoras y firmas:**

**M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz**

**Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero**

**Lectora**

**M. en B. Yolanda Escamilla lozano** \_\_\_\_\_

**Julio 15, 2013**

**“La virtud como el arte, se consagra constantemente a la que es difícil de hacer y cuando más dura es la tarea, más brillante es el éxito.”**

**Platón.**

## **Agradecimientos.**

*A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de esta etapa, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.*

*A mis padres Héctor Barrón Galindo y Artemia Álvarez Meza por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, también por los consejos, paciencia y toda la felicidad que me han brindado. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida.*

*A mi hermana Elizabeth (Bt-chan) por estar siempre a mi lado y ayudarme en todos los momentos difíciles con su alegría y consejos, además por toda la motivación que me ha brindado.*

*A la Dra. Alma por su gran apoyo incondicional, paciencia y consejos que me brindo a lo largo de esta etapa, siempre esta agradecida.*

*A la Maestra Lore por todo el apoyo, disponibilidad, paciencia y consejos.*

*A la Dra Gaby por su apoyo y consejos.*

*A Deni por todo su amistad y su gran apoyo incondicional, además de sus consejos, por esas largas charlas, por su confianza y comprensión.*

*A todos mis compañeros de la PP 2 Viry, Julio, Oly, Oscar, Omar, Claudia, Yola, Alizul, Anita, Vere, Frank, Miguel, Alicia, Angélica, Nataly por hacer mi estancia un lugar de risas y buenos recuerdos que nunca olvidare.*

**Nayeli Barrón Álvarez**

**ÍNDICE GENERAL**

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS. ....	iii
ÍNDICE DE TABLAS. ....	iv
1. INTRODUCCIÓN. ....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Estructura de los oligosacáridos de la leche humana (OSLH).....	2
2.2 Efecto anti-infeccioso de los OSLH. ....	3
2.3 Producción <i>in vitro</i> de oligosacáridos fucosilados.....	5
2.3.1 Síntesis química. ....	5
2.3.2 Síntesis enzimática. ....	5
2.3.2.1 Glicosil transferasas.....	5
2.3.2.2 Glicosidasas. ....	5
2.4 $\alpha$ -Fucosidasas. ....	6
2.4.1 Mecanismo de acción de las $\alpha$ -fucosidasas.....	7
2.4.2 Fuentes de $\alpha$ -fucosidasas. ....	7
2.5 $\alpha$ - Fucosidasas de lactobacilos. ....	8
2.6 Métodos de extracción de enzimas.....	10
2.6.1 Características de la membrana celular. ....	10
2.6.2 Métodos mecánicos. ....	12
2.6.3. Métodos Físicos. ....	12
2.6.4 Métodos Químicos. ....	13
2.6.5 Métodos Biológicos. ....	13
2.7 Resistencia de lactobacilos a la lisozima. ....	16
3. HIPÓTESIS. ....	17
4. OBJETIVO GENERAL. ....	17
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES ....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 Bacterias lácticas. ....	17
5.2 Reactivos.....	17
5.3 Equipos. ....	18
5.4 Producción de $\alpha$ -fucosidasas a partir de bacterias lácticas.....	18
5.5 Determinación de $\alpha$ -fucosidasa.....	18
5.6 Determinación de lactasa. ....	19
5.7 Métodos de extracción de enzimas intracelulares.....	19
5.7.1 Ruptura Celular con perlas de vidrio. ....	19

---

5.7.2 Permeabilización de células con acetona.....	20
5.7.3 Lisis celular con lisozima.....	20
5.7.4 Formación de esferoplastos.....	20
5.8 Purificación de oligosacáridos de leche humana.....	21
6. RESULTADOS.....	22
6.1. Morfología de las bacterias lácticas.....	22
6.2 Ruptura celular de las bacterias lácticas con perlas de vidrio.....	22
6.3 Determinación de actividad específica de fucosidasa en células completas.....	24
6.4 Métodos de extracción de fucosidasa.....	24
6.4.1 Ruptura celular con perlas de vidrio.....	24
6.4.2 Lisis de <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> con acetona.....	25
6.4.3 Lisis de <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> con lisozima.....	26
6.4.3 Formación de esferoplastos.....	27
6.4 Purificación de oligosacáridos de leche humana.....	28
7. CONCLUSIÓN.....	29
8.1 Referencias electrónicas.....	32

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

Figura 1. Composición estructural de los oligosacáridos de la leche humana. ....	3
Figura 2 Efecto protector de los oligosacáridos de leche humana.....	3
Figura 3. Modelo de acción directa de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones.. ....	4
Figura 4. Esquema de la estructura externa de bacterias Gram positivas y Gram negativas. ....	11
Figura 5. Productos que pueden ser liberados después de la lisis enzimática de la célula.....	11
Figura 6. Clasificación de las técnicas para ruptura celular. ....	12
Figura 7. Estructura de la lisozima. ....	14
Figura 8. Mecanismo de acción de la lisozima.....	14
Figura 9. Catálisis ácido-base de los aminoácidos Glu 35 y Asp 52. ....	15
Figura 10. Micrografías de contraste de fase de <i>Lactobacillus reuteri</i> .....	16
Figura 11. Fotografía al microscopio de bacterias lácticas crecidas en MRS a 37°C por 24 h (100x). .....	22
Figura 12. Fotografía al microscopio de bacterias lácticas después de la ruptura celular con perlas de vidrio 0.1 mm de diámetro (100x). ....	23
Figura 13. Actividades específicas en las diferentes etapas para la formación de esferoplastos de <i>L. rhamnosus</i> GG.....	27
Figura 14. Cromatograma de los extractos de oligosacáridos obtenidos de la leche humana. ....	28

**ÍNDICE DE TABLAS.**

Tabla 1. Clasificación de fucosidasas en familias.....	7
Tabla 2. Especificidad de las $\alpha$ -L-fucosidasas.....	8
Tabla 3: Lactobacilos que en su genoma codifica para posibles fucosidasas.....	9
Tabla 4. Actividad específica de las enzimas AlfA, AlfB y AlfC con fucosilados naturales como sustratos.....	9
Tabla 5. Caracterización de las enzimas AlfA, AlfB y AlfC con PNP-Fuc como sustrato.....	10
Tabla 6 Actividad de fucosidasa intracelular y extracelular de las 6 cepas de bacterias lácticas. ....	24
Tabla 7. Actividad de fucosidasa en medio con glucosa y galactosa.....	24
Tabla 8 Actividad específica y % de liberación de lactasa intracelular de <i>L. rhamnosus</i> GG utilizando acetona y SDS.....	25
Tabla 9 Actividad específica de <i>L. rhamnosus</i> GG utilizando lisozima.....	26
Tabla 10 Concentración de azúcares de los extractos obtenidos de la leche humana. ....	29

## 1. INTRODUCCIÓN.

La leche materna contiene más de 130 oligosacáridos distintos que constituyen el tercer componente de ésta (5-14 g/L). Su concentración total disminuye a medida que avanza el periodo de lactancia, de modo que al año del parto contiene menos de la mitad que en las primeras semanas de vida (Miñana, 2007).

Los oligosacáridos (OS) más abundantes en la leche humana son libres, algunos son neutros y contienen fucosa en el extremo no reductor. Los OS fucosilados pueden tener un enlace  $\alpha$  (1-2) o  $\alpha$  (1-3) y  $\alpha$  (1-4) en los oligosacáridos ramificados, composición que varía según la procedencia de las madres y la etapa de la lactancia. Los oligosacáridos actúan como receptores competitivos sobre la superficie celular del intestino del huésped, previniendo así la adherencia de determinados patógenos. Así, los OS son un componente principal del sistema inmunológico innato por el cual la madre protege a su hijo de patógenos (entéricos o de otra localización) durante la lactancia (Miñana, 2007).

Las fucosidasas son enzimas hidrolíticas que catalizan la reacción de ruptura de enlaces glucosídicos de oligo y polisacáridos con un alto grado de estereoespecificidad. La capacidad de los microorganismos para producir enzimas capaces de hidrolizar diversos sustratos, juega un papel importante en su adaptación a nichos particulares. De esta manera, algunas bacterias intestinales son capaces de utilizar los oligosacáridos de la leche humana (OSLH) como fuente de carbono (Rodríguez-Díaz y col., 2011). Estas enzimas se pueden dividir en 2 grupos: exoglicosidasas que rompen el enlace glicosídico del extremo no reductor de los OS; y las endoglicosidasas que rompen el enlace glicosídico interno de los OS (Maitin y Rastall, 2006).

Las fucosidasas son usadas principalmente para estudiar la estructura de OS (tanto libres como conjugados) presentes en la superficie celular y que están involucrados en interacciones célula-proteína, célula-célula, mecanismos de adhesión, interacciones huésped-microorganismo, etc. Existen pocos reportes de  $\alpha$ -L-fucosidasas en lactobacilos, que es un grupo de bacterias probióticas habitantes naturales en el intestino humano. Análisis realizados del genoma de especies de lactobacilos reveló que únicamente *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* codifican para posibles fucosidasas (Morita y col., 2009; Rodríguez-Díaz y col., 2011).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad de la fucosidasa intracelular en bacterias lácticas empleando glucosa y galactosa como fuentes de carbono; además de proponer un método de extracción de la enzima.

## 2. ANTECEDENTES.

“La leche materna es considerada como un modelo de alimentación para los lactantes ya que provee de nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo; los beneficios que aportan diversos compuestos presentes en la leche, y en particular los oligosacáridos, van más allá de únicamente cubrir la ingesta diaria de alimento”. Los OSLH que son sintetizados en el aparato de Golgi de las células secretoras de los alveolos de las glándulas mamarias; constituyen el tercer componente de mayor concentración en la leche, después de la lactosa y los lípidos, pudiendo encontrarse como oligosacáridos libres o formando parte de algunos glicoconjugados unidos a lípidos o a proteínas (Domínguez-Vergara y col., 2009). En los últimos años los oligosacáridos se han estudiado por su efecto prebiótico, y se ha observado que también existen otros mecanismos propios de estos compuestos que pueden traer beneficios a la salud (Bode, 2009).

Los oligosacáridos consisten en 3 a 11 residuos de monosacáridos unidos por un enlace glicosídico; un oligosacárido prebiótico es un carbohidrato que permite cambios específicos en la composición y/o actividad de la microflora intestinal responsable del bienestar y de la salud de su hospedero. Estos compuestos no son digeridos por el humano y por tanto llegan intactos hasta el colon donde sirven de alimento para aquellas bacterias que expresan enzimas como la  $\alpha$ - y  $\beta$ - galactosidasa, la xilanasas y otras carbohidrasas. La principal ventaja del uso de prebióticos es que estimulan el crecimiento de las bacterias lácticas y bifidobacterias nativas del colon. Otra ventaja adicional es que los oligosacáridos son más fáciles de introducir en la formulación de un alimento, que los microorganismos, ya que estos últimos pueden perder su viabilidad durante el procesamiento y almacenamiento. En consecuencia los prebióticos pueden ser una estrategia más práctica y eficiente para modular la microbiota, que los probióticos (Domínguez-Vergara y col., 2009).

### 2.1 Estructura de los oligosacáridos de la leche humana (OSLH).

La leche humana madura contiene alrededor de 5-14 g/L de oligosacáridos libres. Los OSLH están compuestos por una combinación variable de: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc), y ácido siálico (Sia; N-acetil neuramínico [Neu5Ac]). La mayoría de los OSLH tienen una unidad de lactosa (Gal $\beta$ 1-4Glc) en el extremo reductor, mientras que la fucosa y el ácido siálico están situados en el extremo no reductor (Figura 1). Las cadenas de oligosacáridos tienen una longitud de 3 a 11 residuos de monosacáridos (Gudiel-Urbano, 2001).

El ácido siálico se puede unir a la lactosa mediante un enlace  $\alpha$ -(2,3) y/o  $\alpha$ -(2,6) para formar 3'-sialil-lactosa y 6'-sialil-lactosa, respectivamente. La lactosa puede ser también fucosilada mediante enlaces  $\alpha$ -(1,2) y  $\alpha$ -(1,3) para formar 2'-fucosil-lactosa y 3'-fucosil-lactosa respectivamente. Los OSLH se pueden agrupar en cadenas cortas como trisacáridos (sialil-lactosa o fucosil-lactosa) y oligosacáridos complejos de alto peso molecular (Han y col., 2011).

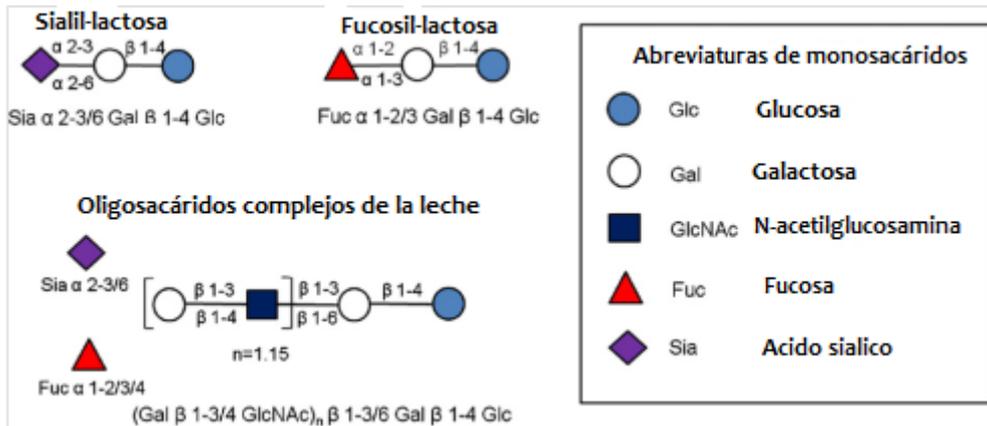


Figura 1. Composición estructural de los oligosacáridos de la leche humana (OSLH) (Han y col., 2011).

## 2.2 Efecto anti-infeccioso de los OSLH.

En la Figura 2 se engloban los efectos directo o anti-infeccioso e indirecto o prebiótico de los OSLH. El efecto directo permite excluir a los patógenos del tracto gastrointestinal a través del bloqueo de los sitios de adhesión en la mucosa. El efecto indirecto se genera por la estimulación selectiva del crecimiento de bacterias benéficas como son lactobacilos y bifidobacterias en el colon (Domínguez-Vergara y col., 2009). El efecto prebiótico de los OSLH, es probablemente el mecanismo más estudiado, sin embargo, aproximadamente el 90% de éstos no son metabolizados y se encuentran intactos en las heces de los lactantes, indicando que deben tener una función además de servir como sustrato para la microbiota (Domínguez-Vergara y col., 2009).

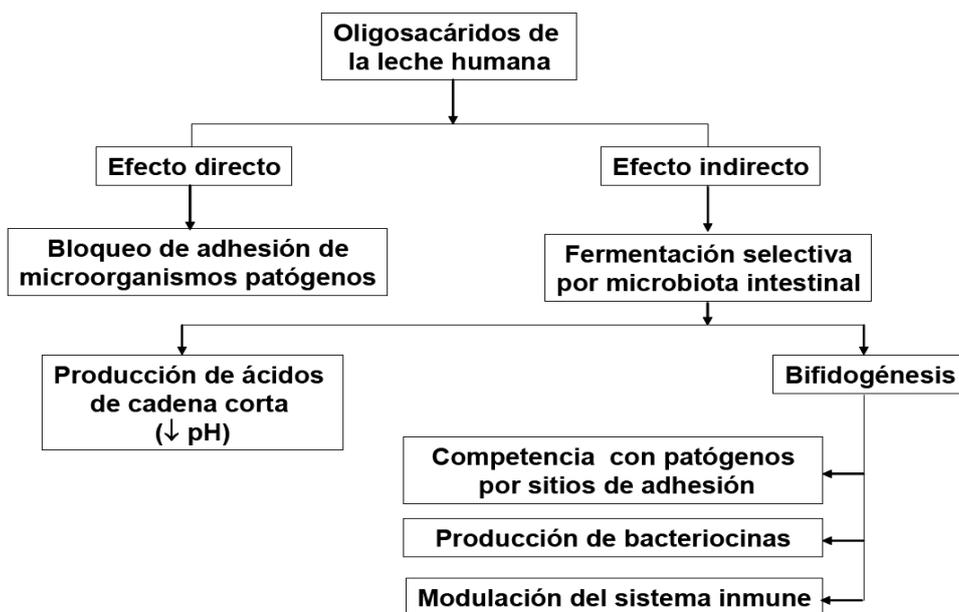


Figura 2 Efecto protector de los oligosacáridos de leche humana (Domínguez-Vergara y col., 2009).

Los efectos anti-infecciosos de los OSLH, se relacionan con su acción sobre la microflora intestinal benéfica del hospedero. Es decir, son el soporte en el crecimiento de los lactobacilos y las bifidobacterias, que permite excluir a los patógenos del tracto gastrointestinal a través de:

- la competencia por los sitios de adhesión en la mucosa,
- la disminución del pH, debida a la producción de los ácidos orgánicos y
- la producción de sustancias inhibitoras como las bacteriocinas.

Por otro lado, hay evidencia de que los lactobacilos y las bifidobacterias pueden modular el sistema inmune de su hospedero, desencadenando respuestas de defensa contra la infección. Una acción más específica y directa de los OSLH, para prevenir las infecciones, es su capacidad de actuar como análogos solubles de los receptores del tracto gastrointestinal, a los que se unen los microorganismos Gram negativos.

El principio se basa en el reconocimiento proteína-carbohidrato que se establece entre las lectinas microbianas y los glicoconjugados de la superficie celular. Lo anterior permite a las bacterias adherirse y posteriormente colonizar e invadir al epitelio intestinal. Este es el mecanismo que siguen, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Helicobacter jejuni*, y algunas especies de *Salmonella* y cepas de *Shigella*. La Figura 3 indica como el oligosacárido sería capaz de prevenir la adhesión bacteriana y por tanto la infección (Domínguez-Vergara y col., 2009).

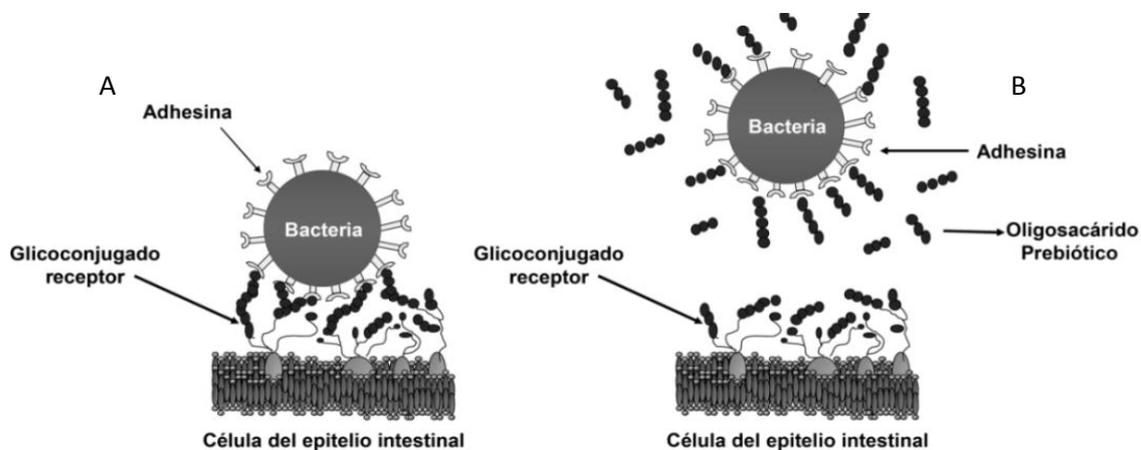


Figura 3. Modelo de acción directa de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones. A) Las adhesinas bacterianas reconocen a los receptores oligosacáridos en las células del epitelio intestinal. B). Inhibición de la adhesión bacteriana por prebióticos con estructuras similares a los glicanos *receptores* (Domínguez-Vergara y col., 2009).

Ruiz-Palacios (2003) demostró que los OS fucosilados son capaces de inhibir a *Campylobacter jejuni*, una de las principales causas de diarrea. La incidencia de diarrea causada por este patógeno se relaciona inversamente con el contenido de 2´fucosil-lactosa en la leche materna.

## 2.3 Producción *in vitro* de oligosacáridos fucosilados

### 2.3.1 Síntesis Química.

Tradicionalmente los OS son sintetizados por métodos químicos, pero éstos son complicados e involucran un gran número de pasos. Debido a que los carbohidratos tienen varios grupos hidroxilos de similar reactividad, se requieren numerosos pasos de protección y desprotección para alcanzar la regioselectividad deseada. A pesar de estas previsiones, siempre se produce una mezcla de isómeros de oligosacáridos, y además el número de pasos se incrementa al aumentar el tamaño del oligosacárido (se necesitan al menos siete pasos para un disacárido, y al menos 10 para un trisacárido) haciendo la síntesis de simples oligosacáridos un largo proceso. Este método necesita reactivos químicos caros y los rendimientos son muy bajos (Maitin y Rastall, 2006).

### 2.3.2 Síntesis Enzimática.

Las enzimas se pueden utilizar para sintetizar OS por reacciones más sencillas que las químicas. Para la síntesis enzimática se pueden emplear glicosiltransferasas y glicosidasas (Maitin y Rastall, 2006).

#### 2.3.2.1 Glicosiltransferasas.

Las Glicosiltransferasas (GTs) son enzimas involucradas en la biosíntesis de oligosacáridos y glicoconjugados. Estas enzimas catalizan transfiriendo un monosacárido de un sustrato donador (glicosil nucleótido) a un sustrato aceptor formando un enlace glicosídico con alta estereo y regioespecificidad. La reacción general que catalizan estas enzimas es:



Donde XDP-Gly es un azúcar nucleótido (sustrato donador; X= Guanidin o Uridin) y OH-aceptor (sustrato aceptor) puede ser un oligosacárido libre, conjugado con un lípido (glicolípido), proteína (glicoproteína) u otro tipo de moléculas (Maitin y Rastall, 2006).

#### 2.3.2.2 Glicosidasas.

Son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza en donde su función principal es la ruptura hidrolítica de los enlaces glicosídicos. Son más estables que las glicosiltransferasas, actúan fácilmente sobre sustratos y no necesitan cofactores. El mecanismo de hidrólisis incluye la unión de un sacárido sustrato (donador) a la enzima, formando un complejo intermedio enzima-sustrato, seguido de la hidrólisis del complejo para originar los productos (Palcic, 1999).

Las Glicosilhidrolasas (GH) son clasificadas con base en su similitud de secuencia de amino ácidos en unas 90 familias (Cobucci-Ponzano y col., 2008).

Estas enzimas se pueden dividir en 2 grupos: exoglicosidasas que rompen el enlace glicosídico del extremo no reductor de los OS y las endoglicosidasas que rompen el enlace glicosídico interno de los OS (Maitin y Rastall, 2006).

#### **2.4 $\alpha$ -Fucosidasas.**

Con base en la alineación de las secuencias de aminoácidos, las fucosidasas se clasifican en dos familias de Glicosilhidrolasas: la familia 29 (GH-29) y la familia 95 (GH-95). La especificidad de sustratos en la familia GH-29 es muy amplia, mientras que para la familia GH-95 es estricta a compuestos fucosilados que presenten enlace  $\alpha$ -(1-2) (Ashida y col., 2009).

La familia 29 de Glicosilhidrolasas (GH-29) como la  $\alpha$ -fucosidasa EC 3.2.1.51 de plantas, vertebrados y microorganismos, algunos patógenos de plantas y humanos. Son enzimas exoglicosidasas capaces de romper el enlace alfa de los residuos de L-fucosil del extremo no reductor de fucosil-oligosacáridos; en donde los enlaces más comunes son  $\alpha$ -(1-6) de la galactosa y  $\alpha$ -(1-3),  $\alpha$ -(1-4) y  $\alpha$ -(1-6) de los residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Cobucci-Ponzano y col., 2008).

Las enzimas que pertenecen a la familia GH-29 obedecen un mecanismo de retención del enlace glicosídico, que suelen tener dos ácidos carboxílicos catalíticos en sus sitios activos y realizar un doble desplazamiento en el que un intermediario  $\alpha$ -L-fucosil se forma y luego es hidrolizado (Cobucci-Ponzano y col., 2008)

Las enzimas que pertenecen a la familia GH-95 obedecen un mecanismo de inversión del enlace glicosídico y se da en un solo paso que consiste en un simple desplazamiento con la asistencia de un ácido o base en el sitio activo a partir de dos cadenas laterales de aminoácidos, ácidos normalmente glutámico o aspártico, que se encuentran normalmente en la posición 6-11 (Cobucci-Ponzano y col., 2008), (<http://www.cazy.org>).

En la Tabla 1 se observan las características de las familias GH-29 y GH-95, y se indica el número de clasificación EC (clasificación de enzimas de acuerdo a la academia de Bioquímica de la IUPACC), en donde la primera cifra indica la clase principal de la enzima, la segunda cifra denota la subclase dentro de cada grupo, la tercera cifra designa la subclase y la cuarta cifra es el número de serie arbitrario asignado a su sub-subclase (Voet y Voet, 2004).

	Familia GH-29	Familia GH-95
EC	3.2.1.51	3.2.1.51 y 3.2.1.63
Mecanismo	Retención	Inversión
Estructura 3D	( $\beta/\alpha$ )	( $\alpha/\alpha$ )
Núcleo catalítico/base	Asparagina	Asparagina activado por Acido aspartico
Donador de protones	Glutamina	

Tabla 1. Clasificación de fucosidasas en familias. Datos obtenidos de Carbohydrate-Active Enzyme s.f <http://www.cazy.org>

#### 2.4.1 Mecanismo de acción de las $\alpha$ -fucosidasas

En la mayoría de los casos, la hidrólisis del enlace glicosídico es catalizada por dos residuos de aminoácidos de la enzima: un ácido general (donador de protones) y un nucleófilo (acceptor). Dependiendo de la posición espacial de estos residuos catalíticos, la hidrólisis se produce a través de la conservación o inversión global de la configuración del carbono anomérico (<http://www.cazy.org>).

En el mecanismo de retención las enzimas actúan mediante un mecanismo de dos etapas en donde dos residuos se ven involucrados, uno actúa como nucleófilo y el otro como un ácido. En el primer paso el nucleófilo ataca el centro anomérico, dando como resultado la formación del complejo intermediario con un carácter ácido, provisto por el carboxilo. En el segundo paso el ahora desprotonado carboxilo actúa como base y se une a una molécula de agua para hidrolizar el complejo intermediario (<http://www.cazy.org>).

En el mecanismo de inversión, los residuos catalíticos de un ácido donan un protón al carbón anomérico mientras que el residuo catalítico de la base elimina un protón de una molécula de agua, aumentando su nucleofilia facilitando su ataque al centro anomérico (Vuong y Wilson, 2010).

#### 2.4.2 Fuentes de $\alpha$ -fucosidasas.

En la naturaleza existen fucosidasas con diferentes especificidades, son exo-glicosidasas que hidrolizan el residuo L-fucosil del extremo no reductor de fucosil-oligosacáridos. La  $\alpha$ -L-fucosidasa (EC 3.2.1.51) es capaz de hidrolizar varios tipos de enlaces  $\alpha$ -fucósidos así como sustratos sintéticos; (Rodríguez-Díaz y col., 2011). En la Tabla 2, se muestran diferentes fucosidasa con sus especificidades y su clasificación EC.

La  $\alpha$ -L-fucosidasa lisosomal humana es capaz de hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -fucosil (1-2, 1-3, 1-4 y 1-6) y también sustratos sintéticos como el p-nitrofenil fucósido (PNP-Fuc). Las enzimas microbianas de *Thermotoga maritima* y *Sulfolobus solfataricus* actúan en la síntesis de  $\alpha$ -fucósidos pero no se han probado con oligosacáridos naturales.

Enzima	EC	Fuente de enzima
$\alpha$ -L-fucosidasa	3.2.1.51	<i>Penicillium multicolor</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Thermotoga maritima</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Bos taurus</i> .
$\alpha$ -(1-2)-L-fucosidasa	3.2.1.63	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis</i> .
$\alpha$ -(1-3/4)-L-fucosidasa	3.2.1.111	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Prunus dulcis</i> , <i>Streptomyces sp</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> .
$\alpha$ -(1-6)-L-fucosidasa	3.2.1.127	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> .

Tabla 2. Especificidad de las  $\alpha$ -L-fucosidasas. Datos obtenidos de las base de datos de Kegg s.f. ([www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)), BRENDA s.f. (<http://www.brenda-enzymes.info>).

## 2.5 $\alpha$ - Fucosidasas de lactobacilos.

La capacidad de los microorganismos para producir enzimas capaces de hidrolizar diversos sustratos, juega un papel importante en la adaptación a nichos particulares. De esta manera, algunas bacterias intestinales son capaces de utilizar los OSLH como fuente de carbono (Rodríguez-Díaz y col., 2011). Análisis realizados del genoma de especies de lactobacilos (Tabla 3) reveló que únicamente *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* codifican posibles fucosidasas (Morita y col., 2009; Rodríguez-Díaz y col., 2011).

Microorganismo	Cepa	Referencia
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	Maze y col., 2010
	BD-11	Lianzhong y col., 2011
	BL-23	Maze y col., 2010
	LC-2W	Chen y col., 2011
	Zhang	Wei y col., 2010
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 8530	Maze y col., 2010
	GG	Morita y col., 2009
	LC 705	Kankainen y col., 2009

Tabla 3: Lactobacilos que en su genoma codifica para posibles fucosidasas (<http://www.cazy.org/>)

Rodríguez-Díaz y col. (2011) clonaron y purificaron tres fucosidasas (AlfA, AlfB y AlfC) codificadas en el genoma de *Lactobacillus casei* BL23, estas enzimas muestran actividad sobre el PNP-Fuc, esto confirma la especificidad de la enzima. Estas enzimas fueron incapaces de actuar sobre la lactosa, melibiosa, lactulosa, maltosa o maltotriosa; por lo contrario, como se muestra en la Tabla 4, fueron capaces de hidrolizar sustratos fucosilados presentando diferentes actividades que son dependientes del tipo de enlace y la longitud del oligosacárido.

Oligosacárido	Estructura	Actividad ( $\mu\text{mol}$ de fucosa/ mg de enzima/ min) <sup>a</sup>		
		AlfA	AlfB	AlfC
Disacárido Antígeno H	Fu $\alpha$ 1-2Gal	-	0.132	0.002
Trisacárido Antígeno H tipo II	Fu $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc	-	0.033	-
2'-Fucosilactosa	Fu $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4Glc	-	0.072	-
3'-Fucosilactosa	Gal $\beta$ 1-4(Fu $\alpha$ 1-3)Glc	-	-	-
Trisacárido Lewis X	Gal $\beta$ 1-4(Fu $\alpha$ 1-3)GlcNAc	-	-	-
Trisacárido Lewis A	Gal $\beta$ 1-3(Fu $\alpha$ 1-4)GlcNAc	-	-	-
Trisacárido Lewis B	Fu $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-3(Fu $\alpha$ 1-4)GlcNAc	-	-	-
3'-Fucosil-GlcNAc	Fu $\alpha$ 1-3GlcNAc	-	27.5	0.0004
4'-Fucosil-GlcNAc	Fu $\alpha$ 1-4GlcNAc	-	0.032	0.008
6'-Fucosil-GlcNAc	Fu $\alpha$ 1-6GlcNAc	0.440	-	13.62

<sup>a</sup>-, actividad no encontrada

Tabla 4. Actividad específica de las enzimas AlfA, AlfB y AlfC con fucosilados naturales como sustratos (Rodríguez-Díaz y col., 2011)

En la Tabla 5 se pueden observar  $K_m$ , pH óptimo y temperatura óptima de las fucosidasas AlfA, AlfB y AlfC empleando como sustrato PNP-Fuc.

Enzima	$K_m$ (mM)	pH óptimo	Temp óptima (°C)
AlfA	0.27	7.5	39
AlfB	2.9	7	41
AlfC	5.2	7	41

Tabla 5. Caracterización de las enzimas AlfA, AlfB y AlfC con PNP-Fuc como sustrato (Rodríguez-Díaz y col., 2011)

Rodríguez-Díaz y col. (2012) reportaron que *Lactobacillus casei* BL23 produce  $\alpha$ -fucosidasa AlfB y que es intracelular debido a que el microorganismo crece en presencia de 3' fucosil-glucosamina (Fuc- $\alpha$ -1,3-GlcNAc) como fuente de carbono (que forma parte del antígeno de Lewis X), este disacárido se agota en la fase estacionaria. Se encontró L-fucosa en el medio de cultivo con lo cual concluyen que *Lactobacillus casei* no puede fermentar dicho azúcar, sin embargo metaboliza la acetilglucosamina (GlcNAc).

A pesar del hecho de que numerosas especies de lactobacilos colonizan el tracto gastrointestinal, el análisis de las secuencias genómicas que codifican  $\alpha$ -L-fucosidasas están presentes solo en las cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* LC2W, *Lactobacillus casei* BD-II, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (Rodríguez-Díaz y col., 2012).

Debido a que la fucosidasa es intracelular, se pretende buscar un método eficaz para la obtención de la enzima.

## 2.6 Métodos de extracción de enzimas.

### 2.6.1 Características de la membrana celular.

Las paredes celulares de las bacterias son rígidas y porosas, debido a que poseen una elevada presión osmótica interna y frecuentemente pueden hallarse expuestas a diferentes condiciones ambientales externas. Las paredes de las células Gram positivas y Gram negativas poseen una característica molecular en común: en ambas existe un rígido esqueleto de peptidoglicano o mureína. La unidad básica que se repite en la estructura del peptidoglicano es la del disacárido constituido por N-acetil-D-glucosamina y el ácido N-acetilmurámico (Figura 4). En las células Gram positivas la capa de peptidoglicano es mucho más gruesa que en las células Gram negativas (Tejeda, 2011).

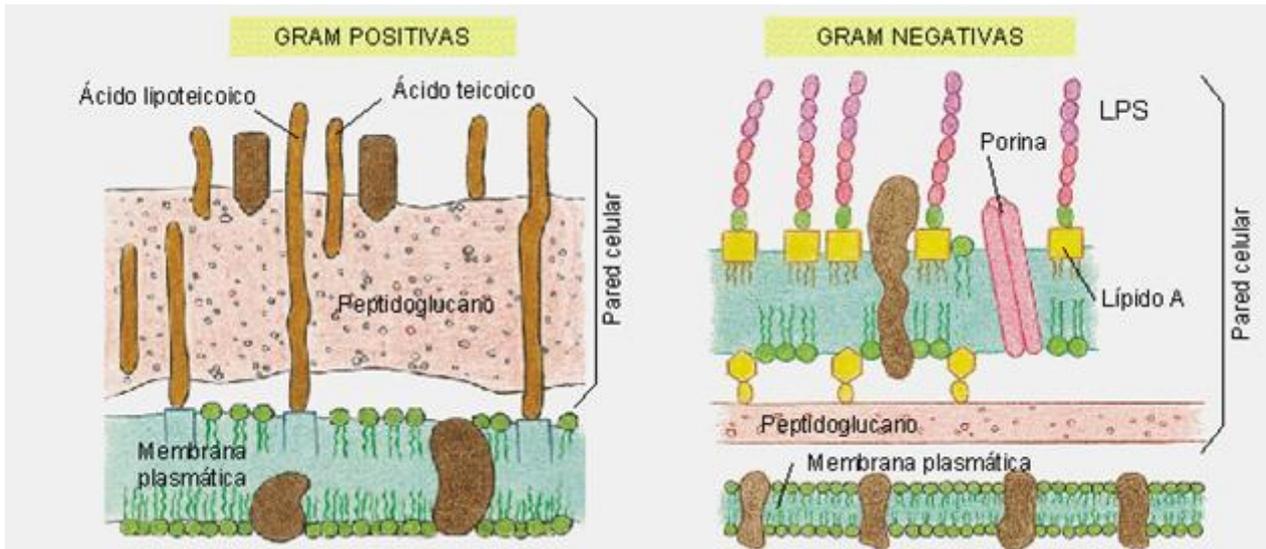


Figura 4. Esquema de la estructura externa de bacterias Gram positivas y Gram negativas.  
<http://microbiologiaujap2012.blogspot.mx/2012/03/la-tincion-de-gram-normal-0-21-false.html>

En la lisis enzimática y la disrupción de las células microbianas se han encontrado un número de importantes aplicaciones (Figura 5). Éstas incluyen la liberación de polisacáridos de la pared celular, de la membrana intracelular, enzimas unidas a la pared (Andrews y Asenjo, 1987).

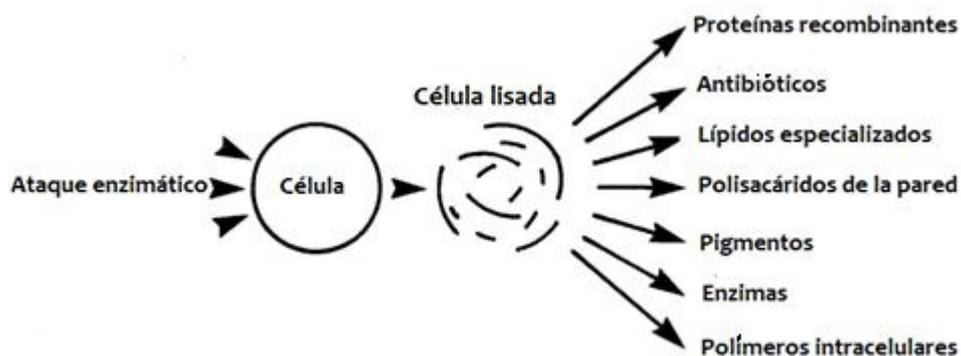
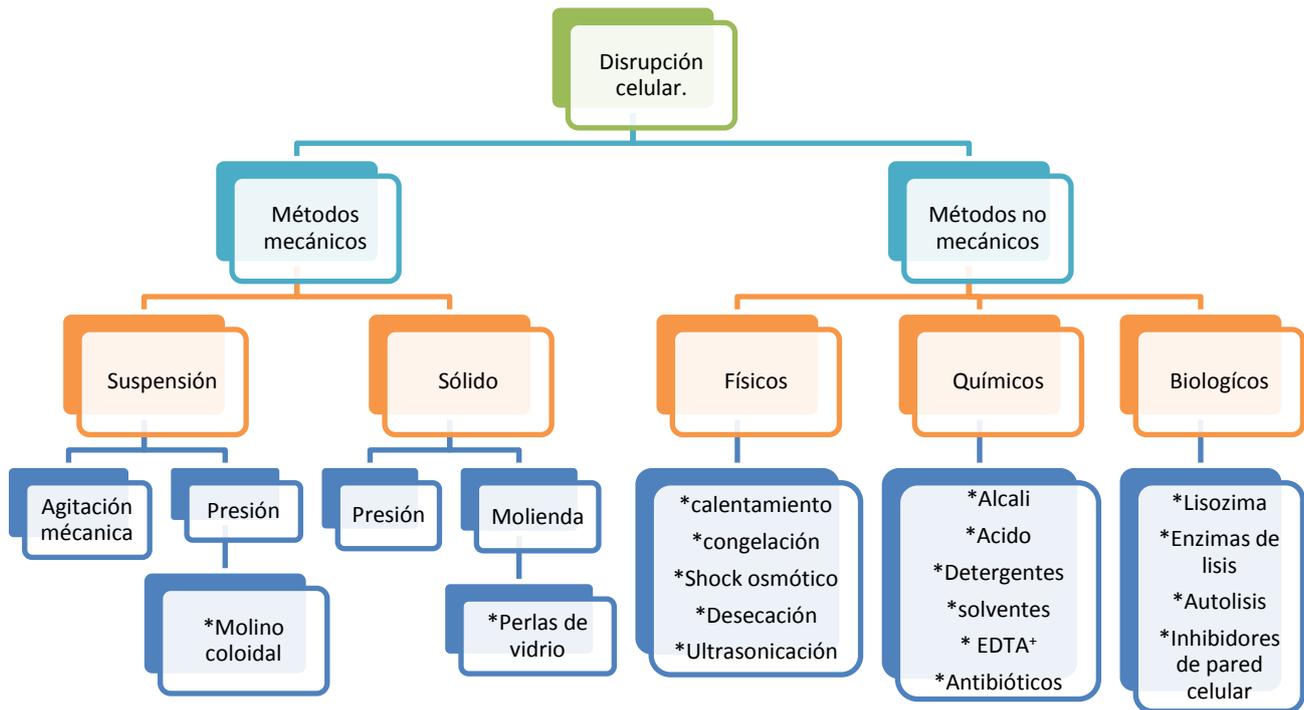


Figura 5. Productos que pueden ser liberados después de la lisis enzimática de la célula (Andrews y Asenjo 1987).

En términos generales, los procesos que se han aplicado a la disrupción de células bacterianas pueden clasificarse como: mecánicos, físicos, químicos o biológicos (Figura 6) (Harrison, 1991).



<sup>+</sup> Ácido etilendiaminotetraacético

Figura 6. Clasificación de las técnicas para ruptura celular (Harrison, 1991).

### 2.6.2 Métodos Mecánicos.

Las técnicas empleadas son: molienda húmeda en molinos de perlas agitadas a alta velocidad (esfuerzo de corte sólido) y la homogeneización a alta presión (esfuerzo de corte líquido). La desintegración celular no es una tarea fácil si se considera la alta resistencia mecánica de las paredes celulares y el tamaño pequeño de los microorganismos (1-10  $\mu\text{m}$ ). Para poder alcanzar rendimientos altos, esto es, obtener un grado de desintegración celular mayor a 90%, con frecuencia se requieren 2-3 pasos tanto en el homogeneizador como en el molino (Tejeda, 2011).

Algunas desventajas comunes en la ruptura mecánica incluyen la inversión de capital y los costos de energía (Harrison, 1991).

### 2.6.3. Métodos Físicos.

Es una de las técnicas más antiguas de la ruptura celular utilizados en los procesos de extracción. En esta técnica se provoca la lisis de la pared celular ya sea por una expansión de la misma por la diferencia de concentraciones en el interior y exterior de la célula (shock osmótico) (Tejeda, 2011), o por la formación de cristales grandes por congelación causando un daño más extenso a las células (Harrison, 1991).

#### 2.6.4 Métodos Químicos.

La sensibilidad de los microorganismos a diversas enzimas líticas varía en gran medida con la fase de crecimiento y las condiciones de la fermentación. Ácidos, álcalis, tenso activos y solventes han sido utilizados para la lisis celular; el uso de solventes y detergentes son los más utilizados para la obtención de enzimas intracelulares, ya que estos evitan una alteración estructural de las enzimas de interés (Tejeda, 2011).

Solventes: En la permeabilización con solventes orgánicos, las células ya no son viables. El efecto del método depende en gran medida de la concentración del agente y el tiempo que se requiere para el procedimiento de permeabilización (Hansruedi, 1982).

Se ha sugerido que el tratamiento de las células con acetona mejora la ruptura mecánica. Bhaduri y Damchick (1983) propusieron un método sencillo para la ruptura de las bacterias con acetona. El tratamiento consiste en poner dos volúmenes de una suspensión bacteriana Gram-positiva con un volumen de acetona a 4 ° C durante 5 minutos seguido por tratamiento con 0.1 volúmenes de SDS al 1%, con este tratamiento se demostró una liberación similar de la proteína que utilizando sonicación o la agitación con perlas de vidrio.

Detergentes: El tratamiento de células bacterianas con dodecil sulfato sódico (SDS) es reconocido para la liberación de los constituyentes celulares en la biología molecular. Por consiguiente, pueden ser útiles en la ampliación de la ruptura celular (Harrison, 1991).

El SDS actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, provocando que estas moléculas protéicas pierdan su estructura terciaria y cuaternaria. Esto ocurre porque el SDS se une a las zonas apolares del polipéptido. Las proteínas reaccionan con SDS a relativamente alta concentración, pero se ha demostrado que 0.4 % de SDS es el nivel mínimo necesario para saturar los sitios de unión de la proteína, sin embargo, se emplea 1 % para lograr un margen de seguridad (García, 2000).

#### 2.6.5 Métodos Biológicos.

El uso de enzimas para lisar las células tiene ventajas debido a su especificidad biológica, condiciones suaves de operación, bajos requerimientos de energía, baja inversión de capital y evitar las duras condiciones físicas, tales como tensiones altas de cizallamiento y el daño mínimo al producto está garantizado (Harrison, 1991).

Existen tres tipos de enzimas bacteriolíticas que han sido identificadas:

- 1.-**Glicosidasas:** dividen las cadenas de polisacáridos de la cadena principal del peptidoglicano. Por ejemplo la lisozima.
- 2.- **Acetilmuramil-L-alanina:** amidasas que rompen la unión de polisacárido-polipeptido.
- 3.- **Endopeptidasas:** dividen las cadenas de polipéptidos dentro del peptidoglicano.

La lisozima es la enzima más utilizada para la lisis de las paredes celulares, está formada por una cadena polipeptídica de 129 aminoácidos (14.6kd) con cuatro enlaces disulfuro. La molécula tiene forma más o menos helicoidal, compuesta por varias hélices alfa y una lámina beta extendida formada por tres hojas beta (Figura 7).

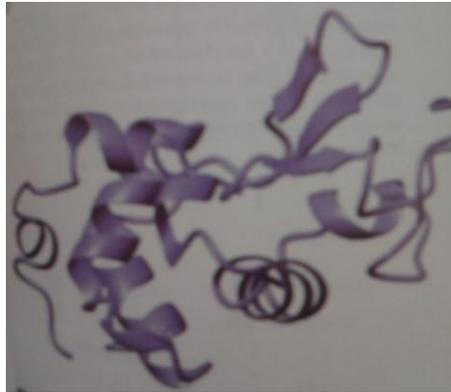


Figura 7. Estructura de la lisozima (Yurkanis, 2008).

Es una enzima que cataliza la hidrólisis de algunos polisacáridos, en especial los que forman las paredes celulares de las bacterias (Horton y col., 2008). Estas paredes celulares están formadas por unidades alternadas de ácido N-acilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG) unidas por enlaces  $\beta$ -1,4'-glucosídico (Figura 8) (Yurkanis, 2008).

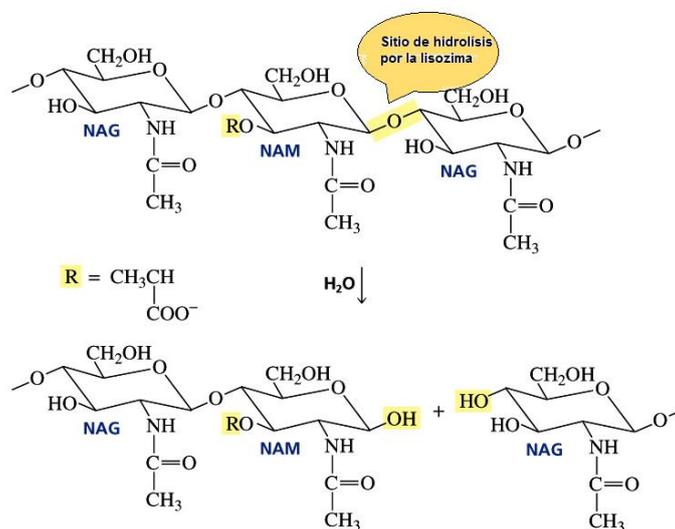


Figura 8. Mecanismo de acción de la lisozima (Yurkanis, 2008).

### Mecanismo de acción.

En el centro catalítico encontramos dos aminoácidos ácidos. Se trata de una catálisis ácido-base, en la que intervienen dos aminoácidos ácidos: el ácido glutámico 35 (Glu 35) y el ácido aspártico 52 (Asp 52), estos se encuentran a ambos lados del enlace glicosídico  $\beta$ -1,4. El entorno de cada uno de estos aminoácidos es diferente. Esta hidrólisis consiste de 2 reacciones consecutivas (Figura 9):

- ★ Primer paso de la reacción: El Asp 52 (se encuentra rodeado de grupos polares, por lo que a pH fisiológico se encuentra ionizado) actúa como catalizador nucleofílico y ataca al carbón anomérico (C-1) del residuo de NAM desplazando al grupo saliente. Mientras que el Glu 35 está en una región apolar (lo que le permite estar protonado a pH fisiológico) actúa como catalizador ácido, protonado al grupo saliente y con ello haciéndolo una base más débil y un mejor grupo saliente.

Cuando se sustituye Glu 35 por Asp 52, la enzima solo tiene actividad débil; si se sustituye Glu 35 por Ala, aminoácido que no puede actuar como catalizador ácido, la actividad de la enzima se pierde por completo.

- ★ Segundo paso de la reacción: Glu 35 actúa como catalizador básico para aumentar la nucleofilia del agua.

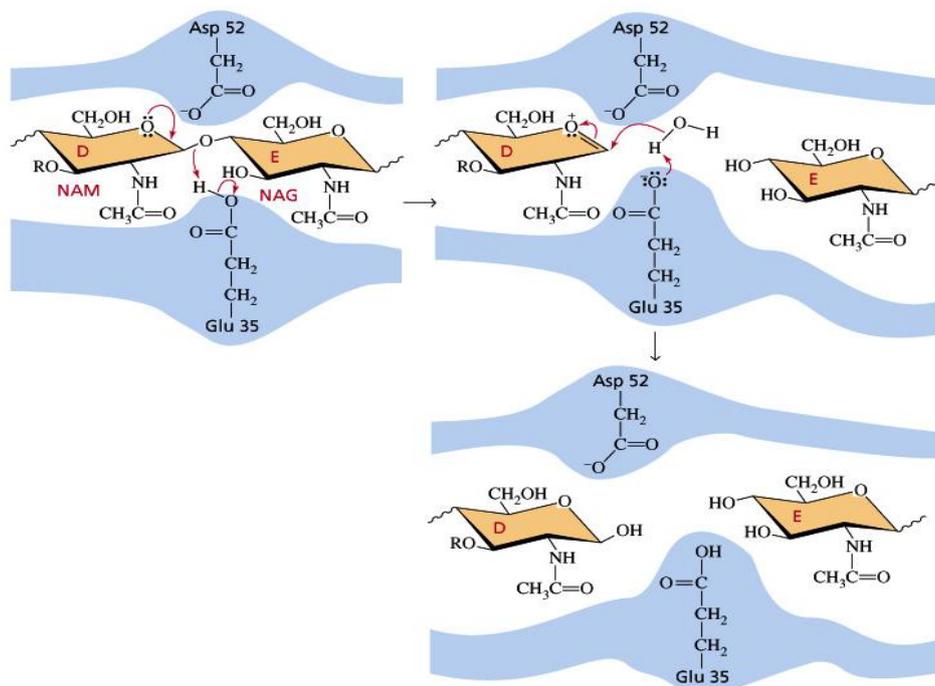


Figura 9. Catálisis ácido-base de los aminoácidos Glu 35 y Asp 52 (Yurkanis, 2008).

El entorno de cada uno de los residuos determina su papel en el proceso catalítico. Glu 35 y Asp 52 son fundamentales en la acción catalítica. El pH tiene influencia en este mecanismo de catálisis porque cuando este aumenta el Glu se ioniza, mientras que si el pH disminuye es el Asp el que se protona.

En el centro activo se une un hexasacárido con la alternancia NAG-NAM-NAG-NAM-NAG-NAM por medio de puentes de hidrógeno con distintos grupos de los residuos aminoácidos de la proteína. El cuarto residuo D (NAM) se distorsiona hacia una conformación de media silla, debido a que no se producirán contactos desfavorables entre el grupo CH<sub>2</sub>OH (del C6) y la proteína (Yurkanis, 2008).

### 2.7 Resistencia de lactobacilos a la lisozima.

El principal argumento presentado para explicar la diferencia observada en la sensibilidad a la lisozima es el espesor mucho mayor y densidad de la pared celular bacteriana en los microorganismos Gram-positivos (Chassy y Giuffrida, 1980).

Neujahr y col. (1973) observaron la resistencia de *Lactobacillus fermenti* a la lisozima sólo en las células tomadas de la fase estacionaria de crecimiento, mientras que las células de la fase exponencial son mucho más sensibles a la lisozima.

Thorne (1970) tuvo éxito en la preparación de esferoplastos de *Lactobacillus casei* por la acción simultánea de la tripsina y la lisozima. Los protoplastos de lactobacilos se definen como formas osmóticamente frágiles, esféricas obtenidos después del tratamiento de las células con enzimas que degradan las paredes. Los esferoplastos, en contraste, son formas osmóticamente frágiles que permanecen en forma de bacilo después del tratamiento con enzimas que degradan las paredes (Figura 10) (Connell y col., 1988).

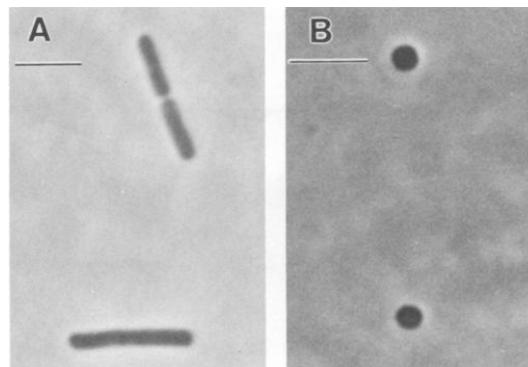


Figura 10. Micrografías de contraste de fases de *Lactobacillus reuteri*. (A) forma de bacilos de las células o esferoplastos. (B) la forma esférica de protoplastos. 2  $\mu$ m (Connell y col., 1988).

### 3. HIPÓTESIS.

Es posible obtener fucosidasas intracelulares a partir de bacterias ácido lácticas dado que estas son capaces de crecer a partir de los oligosacáridos de la leche humana en el intestino de los lactantes.

### 4. OBJETIVO GENERAL.

- ★ Determinar la actividad de  $\alpha$ -fucosidasa intracelular en bacterias lácticas.

#### 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ★ Estudiar el efecto de glucosa y galactosa como fuentes de carbono en la síntesis de fucosidasa intracelular de bacterias lácticas.
- ★ Seleccionar un método de extracción de  $\alpha$ -fucosidasa.
- ★ Purificar e hidrolizar oligosacáridos de leche humana.

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 5.1 Bacterias lácticas.

Las cepas de bacterias lácticas evaluadas fueron previamente aisladas de productos comerciales:

- ★ *Lactobacillus casei* IMAU60214 (GenBank: GU550098) aislado de “Bio4” de Lala®
- ★ *Lactobacillus helveticus* IMAU70129 (GenBank: GU550099) aislado de “Chamyto” de Nestle®
- ★ *Lactobacillus rhamnosus* GG (GenBank: GU550100) aislado de cápsulas de “Culturelle”.
- ★ *Lactobacillus rhamnosus* KLDS (GenBank: GU550102) aislado de la fórmula láctea “NAN” de Nestle®.
- ★ *Lactobacillus casei Shirota* (GenBank: GU550103) aislado del producto “Yakult” de la compañía Yakult®.
- ★ *Lactobacillus delbrueckii ss. bulgaricus* NCFB-2772

Las cepas mencionadas se activaron en caldo MRS a 37° C por 24 h y se resembraron cada semana; se conservaron en refrigeración a 4° C.

#### 5.2 Reactivos.

- ★ 2-Nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (ONP-G; Sigma Aldrich)
- ★ 2-Nitrofenil (ONP; Sigma Aldrich)
- ★ 4-Nitrofenil  $\alpha$ -L-fucopiranosido (PNP-Fuc; Sigma Aldrich)
- ★ 4-Nitrofenil (PNP; Sigma Aldrich)
- ★ D- glucosa (Sigma Aldrich)

- ★ D-galactosa (Sigma Aldrich)
- ★ Caldo y Agar MRS (Fuca Analytical)
- ★ Extracto de Levadura (BDBioxon)
- ★ Peptona de caseína (BDBioxon)
- ★ Lisozima (Sigma L)
- ★ Tris (Bio-Rad)

### 5.3 Equipos.

- ★ Espectrofotómetro UV- 1601 (Shimadzu, Tokyo)
- ★ Centrifuga J2-MI (Bekman, CA)
- ★ Disruptor celular Mini-Beadbeater (Biospec, USA)
- ★ HPLC (Lab Alliance, USA)
- ★ Columna Rezex RHM-monosacaridos H+ 300x 7.8 mm 8 micrones (Phenomenex, Torrance CA)
- ★ Detector (Light Scaterin ELS 1000, USA)

### 5.4 Producción de $\alpha$ -fucosidasas a partir de bacterias lácticas.

Para producir fucosidasas se hicieron fermentaciones de 30 mL cada una con las bacterias lácticas en medio MRS (descrito posteriormente) con dos diferentes fuentes de carbono al 2% (glucosa y galactosa), a 37° C por 24 h, el crecimiento se midió por densidad óptica a 600 nm y de este cultivo se sembró a otro medio de cultivo con la misma fuente de carbono a 37° C por 24 h.

#### 5.4.1 Composición del medio MRS.

- ★ Peptona de caseína 10 g/L
- ★ Extracto de carne 8 g/L
- ★ Extracto de levadura 4 g/L
- ★ Fuente de carbono 20 g/L
- ★ Fosfato dibásico de potasio 2 g/L
- ★ Sulfato de magnesio 0.2 g/L
- ★ Sulfato de manganesio 0.05 g/L
- ★ Citrato de amonio 2 g/L
- ★ Tween 80 1mL/L

### 5.5 Determinación de $\alpha$ -fucosidasa.

Los sobrenadantes obtenidos de los métodos de extracción de fucosidasa intracelular y el sobrenadante obtenido de la fermentación se filtraron con membranas de 0.22  $\mu$ m. Se tomaron 0.1 mL de sobrenadante, se adicionaron a 0.9 mL de sustrato PNP-Fuc (1mg/mL), se incubó a 37° C y se midió la absorbancia a 420 nm cada 15 minutos durante 2 horas (esto se hizo por triplicado).

Se realizó una curva patrón de 4-Nitrofenol (PNP) a diferentes concentraciones en un intervalo de 0 a 100  $\mu\text{M}$  en solución amortiguadora de fosfatos (esto se hizo por triplicado) y se midió en espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm

Una unidad enzimática (U) se definió como los micromoles de PNP liberados por minuto a 37 °C a pH 7.

La actividad específica se entiende como la unidad enzimática por miligramo de biomasa.

### **5.6 Determinación de lactasa.**

Se utilizó la actividad de lactasa como indicador, ya que algunas bacterias lácticas producen esta enzima de manera intracelular (Bury y col., 2000).

El sobrenadante obtenido de los métodos de extracción de fucosidasa intracelular se filtró con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se tomaron 0.1 mL de sobrenadante que se adicionaron a 0.9 mL de ONP-G como sustrato (1 mg/mL) y se incubó a 37° C; se midió la absorbancia a 420 nm cada 15 minutos durante 2 horas (esto se hizo por triplicado). Se realizó una curva patrón de 2-Nitrofenol (ONP) a diferentes concentraciones en un intervalo de 0 a 100  $\mu\text{M}$  en solución amortiguadora de fosfatos (esto se hizo por triplicado) y se midió a una longitud de onda de 420 nm.

### **5.7 Métodos de extracción de enzimas intracelulares.**

#### **5.7.1 Ruptura Celular con perlas de vidrio.**

Se centrifugó el caldo de la fermentación a 10 000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH7, 0.1 M), se centrifugó a 5 000 rpm por 15 minutos en cada lavado. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (pH 7, 0.1 M) para obtener una suspensión celular de 400 mg/mL.

Se llenaron viales de 2 mL con la mitad del volumen de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro y con 1 mL de la suspensión celular (obtenida de la fermentación) y se ajustó el volumen a 1.5 mL con amortiguador de fosfatos.

Se rompieron las células con el Mini-BeadBeater a una velocidad de 4 800 rpm por 5 ciclos de 2 minutos; los viales se pusieron en baño de hielo entre cada ciclo; se realizaron frotis y se observaron al microscopio para verificar la ruptura celular. Se centrifugaron las células con las perlas a 10 000 rpm por 20 minutos obteniéndose el sobrenadante intracelular.

### 5.7.2 Permeabilización de células con acetona.

Se centrifugó el caldo de la fermentación a 10 000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7, 0.1 M), se centrifugó a 5 000 rpm por 15 minutos en cada lavado. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (pH 7, 0.1 M) para obtener una suspensión celular de 100 mg/mL.

Por cada 2 volúmenes de suspensión celular se adicionó 1 volumen de acetona a 4° C se agitó durante 30, 60 y 120 minutos, seguido de la adición de SDS al 1% por 30 minutos a 4° C.

### 5.7.3 Lisis celular con lisozima.

Se centrifugó el caldo de la fermentación a 10 000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7, 0.1 M), se centrifugó a 5 000 rpm por 15 minutos en cada lavado. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (0.1 M a pH 6.5, 7.0, 7.5) que contenía una concentración de 1 mg/mL de lisozima para obtener una suspensión celular de 100 mg/mL la cual se incubó a 25° C y 37° C durante 1 hora. Una vez terminado el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 5,000 rpm durante 20 minutos obteniéndose el sobrenadante de lisis y las células lisadas.

También se realizó una lisis celular utilizando la combinación lisozima en solución amortiguadora de Tris-HCl a pH 8 y pH 9 que contenía una concentración de 1 mg/mL de lisozima para obtener una suspensión celular de 100 mg/mL. Esta suspensión se incubó a 37° C durante 24 horas, terminado el tiempo de incubación, las células se colocaron en viales de 2 ml con la mitad del volumen de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro y con 1.5 mL de suspensión de las células lisadas.

Se rompieron las células con el Mini-BeadBeater para lograr una mayor liberación de la enzima, a una velocidad de 4 800 rpm por 5 ciclos de 2 minutos; los viales se pusieron en baño de hielo entre cada ciclo. Se centrifugaron las células con las perlas a 10 000 rpm por 20 minutos obteniéndose el sobrenadante de lisis.

### 5.7.4 Formación de esferoplastos.

Para la formación de esferoplastos se siguió el proceso que se detalla a continuación:

Se centrifugó el caldo de la fermentación a 10 000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7, 0.1 M), se centrifugó a 5 000 rpm por 15 minutos en cada lavado. Las células se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (pH 7, 0.1 M) que contenía 1 mg/mL de lisozima para obtener una suspensión celular de 100 mg/mL.

La mezcla de células y lisozima se incubó a 37° C por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos, al sobrenadante llamado fluido de lisozima (restos de paredes celulares) se le determinó actividad de lactasa y al pellet (células sin pared o esferoplastos) se le

realizó un choque osmótico con agua destilada fría estéril por 10 minutos a 4° C, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante obtenido llamado fluido osmótico fue analizado para actividad de lactasa. El nuevo pellet (membranas intracelulares) se resuspendió en Tris-HCl a pH 8 y 1.5 mL de la suspensión se colocaron en viales de 2 mL con la mitad del volumen de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro.

Los viales con la suspensión fueron sometidos a 4 ciclos de 30 segundos con el mini-beadbeater a una velocidad de 4 800 rpm, colocándose en baño de hielo entre cada ciclo. Una vez terminados los 4 ciclos se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 minutos para separar las perlas y los restos celulares obteniéndose el sobrenadante de la ruptura.

### 5.8 Purificación de oligosacáridos de leche humana.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los OSLH y en particular los OS fucosilados, son muy importantes para la salud humana especialmente la de los lactantes además se ha observado que en presencia de estos las bacterias lácticas son capaces de desarrollarse en el intestino humano. Por ello se purificaron los OSLH para cuantificar la cantidad de oligosacáridos presentes con la finalidad de que en estudios posteriores se investigue el efecto de su uso como fuente de carbono para el crecimiento de bacterias lácticas en la producción de fucosidasas. La metodología para la purificación y cuantificación de los OSLH se describe a continuación.

La leche se centrifugó a 10 000 rpm por 40 minutos a 4°C para quitar la mayor cantidad de grasa, el sobrenadante es filtrado al vacío con fibra de vidrio para quitar los restos de grasa; se hizo una precipitación de las proteínas con acetona fría a 4° C por 30 minutos, se centrifugó a 10 000 rpm por 30 minutos a 4° C, se evaporó la acetona residual al extracto desproteinizado en campana de extracción con agitación por 2 horas, pasado este tiempo se ajustó el pH a 5.2 con HCl 0.1 M. Para eliminar la lactosa en el extracto desproteinizado se hizo una hidrólisis utilizando  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* a 37° C por 24 horas y se obtuvo lo que se denomina extracto crudo de oligosacáridos.

Los monosacáridos obtenidos (glucosa y galactosa) de la hidrólisis de la lactosa se removieron mediante fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* var. chevaliere por 20 horas a 30° C, y se obtuvieron los oligosacáridos purificados parcialmente.

Se hizo crecer la levadura durante 24 horas a 30°C en un medio conteniendo 12.5 mg/mL de glucosa, 5 mg/mL de extracto de levadura y 5 mg/mL de sulfato de amonio y se dejó a 30° C por 24 horas, se centrifugó el medio de fermentación a 10 000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se obtuvieron las células que fueron utilizadas para la remoción de los monosacáridos del extracto crudo de oligosacáridos.

Se analizaron los oligosacáridos por HPLC con una columna Rezex RHM-monosacáridos; se utilizó como eluyente agua destilada, desionizada y filtrada, con un flujo de 0.3 mL/min, la columna se mantuvo a una temperatura de 75° C y el detector trabajó con un flujo de nitrógeno 1.5 psi, a una temperatura de 90° C del nebulizador y a 110° C la temperatura de evaporación.

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Morfología de las bacterias lácticas.

Se realizaron fermentaciones en caldo MRS de las diferentes bacterias lácticas y se observó su morfología (Figura 11). Se observa que son bacilos cortos y uniformes, Gram positivo, no tienen motilidad, además son catalasa negativa, tienen un grosor de 0.5-0.8  $\mu\text{m}$ , anaerobias facultativas, no formadoras de esporas (Ramírez, 2011).

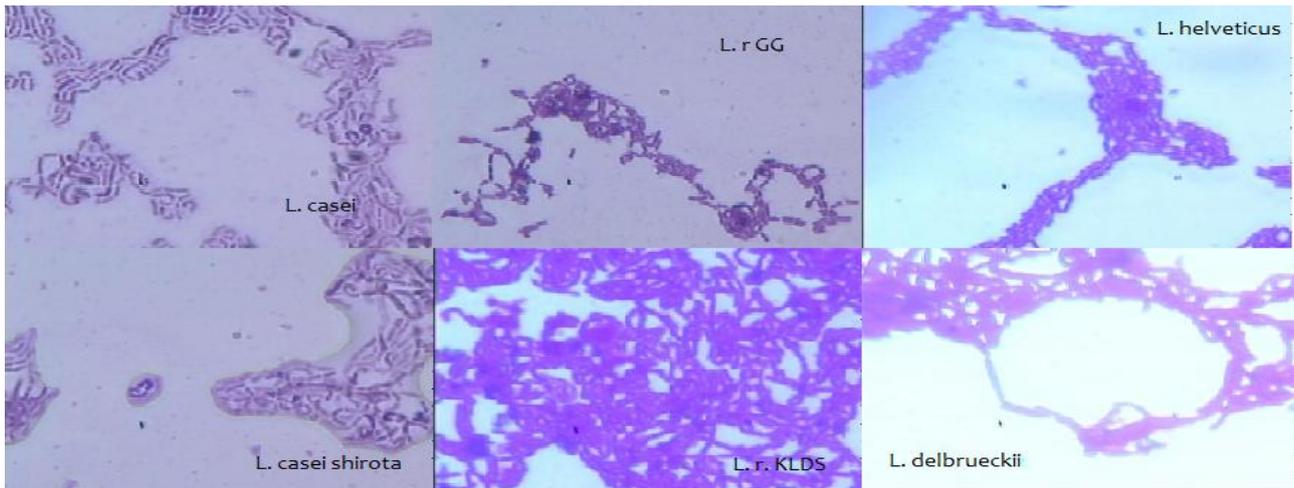


Figura 11. Fotografía al microscopio de bacterias lácticas (arriba se muestran *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus*; abajo se muestran *Lactobacillus casei* shirota, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS y *Lactobacillus delbrueckii*) crecidas en MRS a 37°C por 24 h (100x).

### 6.2 Ruptura celular de las bacterias lácticas con perlas de vidrio.

Una vez conocida la morfología de las bacterias lácticas seleccionadas, se procedió a la ruptura celular con perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro y se observó al microscopio para comprobar la ruptura celular (Figura 12). Se observan que ya no tienen forma de bacilos, aunque algunas parecen un poco hinchadas y están dispersas.

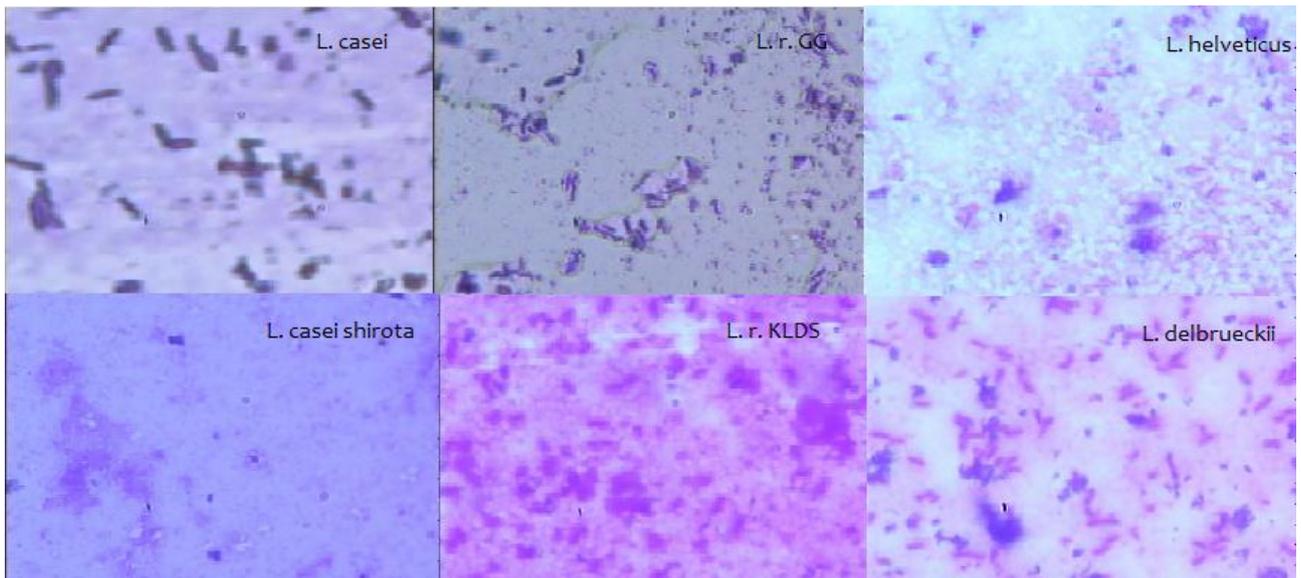


Figura 12. Fotografía al microscopio de bacterias lácticas (arriba se muestran *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus helveticus*; abajo se muestran *Lactobacillus casei* shirota, *Lactobacillus rhamnosus* KLDS y *Lactobacillus delbrueckii*) después de la ruptura celular con perlas de vidrio 0.1 mm de diámetro (100x).

En las Figuras 11 y 12 se puede apreciar cómo cambia la morfología de las bacterias lácticas con este método en donde los tiempos de operación son muy cortos y además implica la homogenización de las células. Estudios de ruptura celular usando disruptores celulares se han llevado a cabo en levaduras y bacterias Gram-positivas (Bury y col., 1999). Este proceso es muy complejo y está influenciado por una amplia gama de parámetros relacionados con el número de ciclos, la energía de los impactos que tiene lugar, la hidrodinámica y la mezcla.

Estos parámetros incluyen el diámetro de las perlas, la densidad y la carga, la concentración de células, la velocidad de flujo, la velocidad de agitación y la temperatura, además del tiempo de residencia, naturaleza y el estado de la envoltura celular y el tamaño del microorganismo ([www.biospec.com/product/28/mini\\_beadbeater](http://www.biospec.com/product/28/mini_beadbeater)).

### 6.3 Determinación de actividad específica de fucosidasa en células completas.

Se crecieron las cepas de bacterias lácticas en medio MRS y se midió la actividad de fucosidasa en las células completas de las seis cepas seleccionadas para comprobar si estaba presente la enzima y en el sobrenadante de la fermentación para evaluar la fucosidasa extracelular.

Cepa	Actividad específica (U/mg de biomasa)	
	Células completas	Extracelular
<i>L. rhamnosus GG</i>	$4.5 \times 10^{-5}$	0.00
<i>L. rhamnosus KLDS</i>	$3.0 \times 10^{-5}$	$2.06 \times 10^{-6}$
<i>L. casei</i>	$2.0 \times 10^{-4}$	$8.11 \times 10^{-6}$
<i>L. casei Shirota</i>	$4.0 \times 10^{-5}$	0.00
<i>L. helveticus</i>	$6.0 \times 10^{-5}$	0.00
<i>L. delbrueckii</i>	$5.0 \times 10^{-5}$	0.00

Tabla 6 Actividad de fucosidasa intracelular y extracelular de las 6 cepas de bacterias lácticas.

En la Tabla 6 se observa que todas las cepas presentan actividad de fucosidasa intracelular pero la que tiene la mayor actividad específica es la cepa de *L. casei* con  $2 \times 10^{-4}$  U/mg de biomasa y también presenta baja actividad específica extracelular con  $8.11 \times 10^{-6}$  U/mg de biomasa.

### 6.4 Métodos de extracción de fucosidasa.

#### 6.4.1 Ruptura celular con perlas de vidrio

Se hicieron crecer las cepas de bacterias lácticas en los medios que contenían glucosa y galactosa como fuente de carbono para comparar la actividad de fucosidasa de las diferentes cepas, utilizando perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro para la ruptura celular.

Cepa	Medio glucosa (MRS)	Medio galactosa (MRS)
	Intracelular	
	Actividad específica (U/mg de biomasa)	
<i>L. rhamnosus GG</i>	$3.90 \times 10^{-5}$	$1.18 \times 10^{-5}$
<i>L. rhamnosus KLDS</i>	$2.75 \times 10^{-5}$	$6.91 \times 10^{-6}$
<i>L. casei</i>	$1.67 \times 10^{-5}$	$2.35 \times 10^{-5}$
<i>L. casei Shirota</i>	$1.84 \times 10^{-5}$	$1.40 \times 10^{-5}$
<i>L. helveticus</i>	$2.07 \times 10^{-5}$	$1.19 \times 10^{-5}$
<i>L. delbrueckii</i>	$6.60 \times 10^{-6}$	$6.41 \times 10^{-6}$

Tabla 7. Actividad de fucosidasa en medio con glucosa y galactosa.

En la Tabla 7 se observa que la bacteria que tiene la actividad específica más alta intracelular en glucosa es *L. rhamnosus GG* con  $3.90 \times 10^{-5}$  U/mg de biomasa. Mientras que la bacteria que presenta una mayor actividad específica intracelular en medio con galactosa es *L. casei* con  $2.35 \times 10^{-5}$  U/mg de biomasa; lo que nos indica que dichos microorganismo produjeron fucosidasa en estos medios de cultivo.

Estos resultados se pueden comparar con lo que reportó Rodríguez-Díaz y col. (2012), en donde se comprueba que *Lactobacillus casei* BL23 produce de forma intracelular tres fucosidasas.

Como se encontró una mayor actividad de fucosidasa en *L. rhamnosus GG* en glucosa, este fue utilizado para evaluar otros métodos de la liberación de la enzima como son acetona, SDS, lisozima y Tris-HCl.

#### 6.4.2 Lisis de *Lactobacillus rhamnosus GG* con acetona.

Se midió la actividad de lactasa en células completas de *Lactobacillus rhamnosus GG* desarrolladas en medio MRS, teniendo una actividad específica de 0.0585 U/mg de biomasa; como se sabe que esta enzima es intracelular se tomará esta actividad como referencia para comprobar la ruptura o lisis celular. Se calculó el porcentaje de liberación de lactasa tomando como el 100% de extracción la suma de las actividades específicas de las células lisadas y el sobrenadante de lisis.

Tratamiento	Condiciones		Actividad específica (U/mg de biomasa)		Liberación de lactasa (%)
	tiempo	Temperatura	Células lisadas	sobrenadante de lisis	
Acetona	30 min	4 °C	0.208	0.004	1.88
Acetona-SDS 30 min	30 min	4 °C	0.091	0.040	30.53
Acetona	1 hora	4 °C	0.111	0.066	37.28
Acetona-SDS 30 min	1 hora	4 °C	0.378	0.117	23.64
Acetona	2 horas	4 °C	0.143	0.079	35.58

Tabla 8 Actividad específica y % de liberación de lactasa intracelular de *L. rhamnosus GG* utilizando acetona y SDS.

En la Tabla 8 se muestra la actividad específica de las células lisadas, del sobrenadante de lisis y el porcentaje de liberación de lactasa; se observa que en la extracción con acetona 1 hora-SDS 30 minutos es la que presenta la mayor actividad específica en el sobrenadante de lisis; también las actividades específicas que presentan las células lisadas son altas comparada con la actividad de las células completas, esto puede deberse a que hay una mayor difusión y exposición de los sitios activos al sustrato que este caso es ONPG, lo que indica que la enzima permanece en los restos celulares.

En cuanto al porcentaje de liberación, se observa que la utilización de acetona 1 hora y acetona 2 horas son los métodos que liberan la mayor cantidad de enzima con 37.28% y 35.58% respectivamente.

### 6.4.3 Lisis de *Lactobacillus rhamnosus* GG con lisozima.

Se midió la actividad específica de lactasa en las células lisadas y en sobrenadante de la lisis utilizando diferentes condiciones como son temperatura, pH y tiempos de incubación. Se calculo el porcentaje de liberación de lactasa tomando como el 100% de extracción la suma de las actividades específicas de las células lisadas y el sobrenadante de lisis.

Condiciones				Actividad específica (U/mg de biomasa)		Liberación de lactasa (%)
	tiempo (h)	pH	Temperatura (°C)	Células lisadas	Sobrenadante de lisis	
Lisozima	1	6.5	25	0.156	0.004	2.5
Lisozima	1	7.5	25	0.150	0.010	6.25
Lisozima	1	6.5	35	0.134	0.038	22.09
Lisozima	1	7	35	0.106	0.006	5.35
Lisozima	1	7.5	40	0.195	0.040	17.02
Lisozima-Tris-HCl	24	8	37	0.072	0.181	71.54
Lisozima-Tris-HCl	24	9	37	0.051	0.078	60.46

Tabla 9 Actividad específica de *L. rhamnosus* GG utilizando lisozima.

En la Tabla 9, se observa que prácticamente no hay actividad en el sobrenadante de lisis cuando se utiliza lisozima 1 hora en los diferentes pH y temperaturas. La actividad más alta en el sobrenadante de lisis es cuando se utiliza la combinación de lisozima-Tris-HCl a pH 8 con 0.181 U/mg de biomasa y existe una baja actividad en las células lisadas lo que indica que la enzima se pudo extraer. En cuanto al porcentaje de liberación, se observa que la utilización de Lisozima-Tris-HCl 24 horas pH 8 37°C y Lisozima-Tris-HCl 24 horas pH 9 37°C son los métodos que liberan la mayor cantidad de enzima con 71.54% y 60.46% respectivamente.

Por otro lado las actividades específicas en las células lisadas es muy alta comparada con la actividad específica que se determinó en las células completas con 0.0585 U/mg de biomasa, esto podría deberse a que la membrana desarrolla agujeros hidrófobos, que se traduce en una mayor permeabilidad de la membrana celular permitiendo la entrada del sustrato con mayor facilidad (Agyei, 2013).

### 6.4.3 Formación de esferoplastos.

Se calculó la actividad específica de lactasa de los diferentes fluidos obtenidos durante la formación de esferoplastos de *Lactobacillus rhamnosus* GG utilizando la combinación lisozima-Tris-HCl pH 8 (Figura 13).

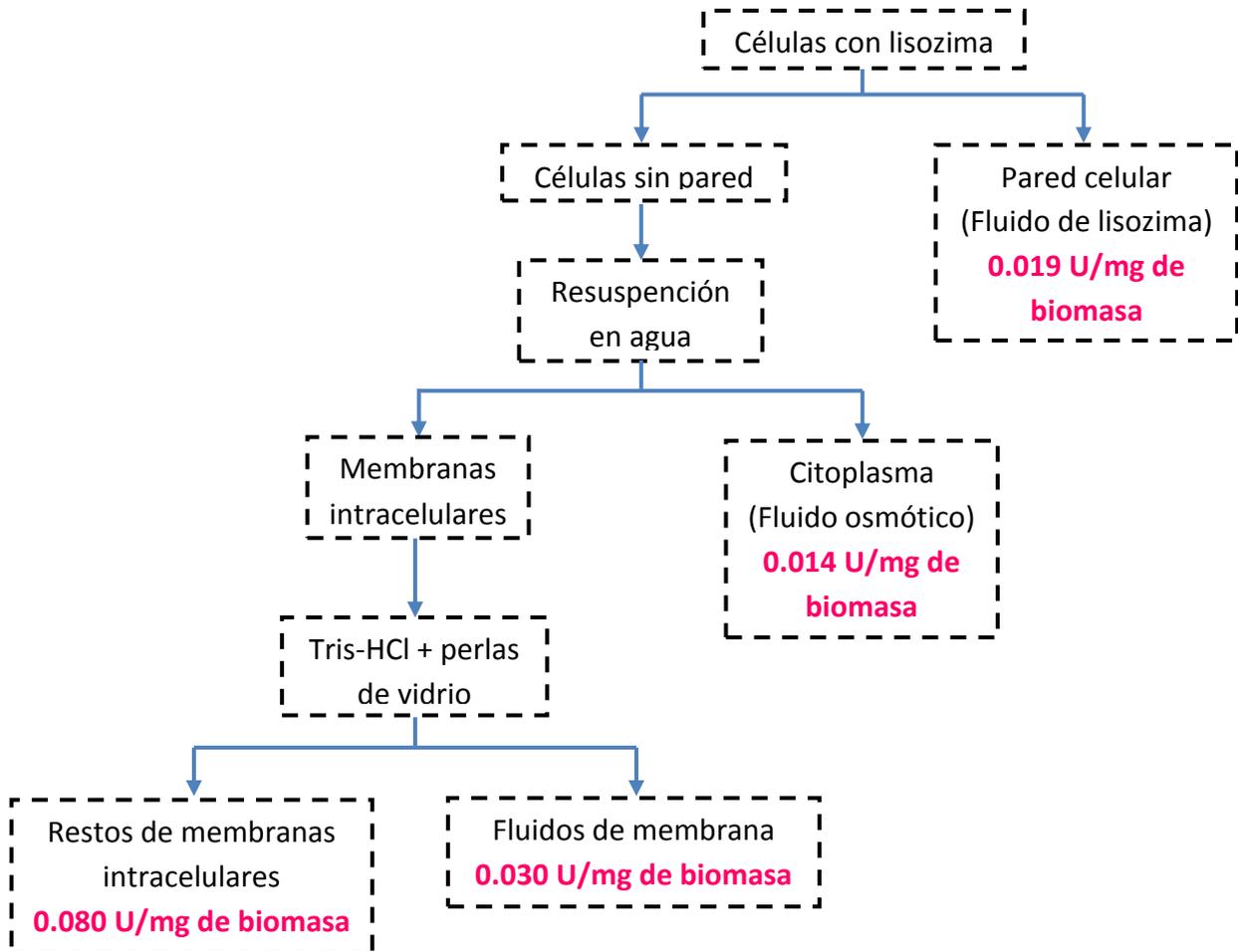


Figura 13. Actividades específicas en las diferentes etapas para la formación de esferoplastos de *L. rhamnosus* GG.

Se observa que las actividades específicas reportadas en cada una de las etapas son muy similares, pero la actividad en el centrifugado es un poco más alta con 0.080 U/mg de biomasa comparada con las actividades de los fluidos y el sobrenadante de lisis; lo que nos indica que la enzima aun permanece dentro de la membrana.

#### 6.4 Purificación de oligosacáridos de leche humana.

Se purificaron los oligosacáridos de la leche humana con el objetivo de utilizarlos como fuente de carbono para el crecimiento de las bacterias lácticas; además de su hidrólisis ácida con el fin de identificar a los monosacáridos que componen estos OSLH.

Se cuantificaron los azúcares de la leche humana de los extractos mediante HPLC, obteniéndose el cromatograma mostrado en la Figura 14.

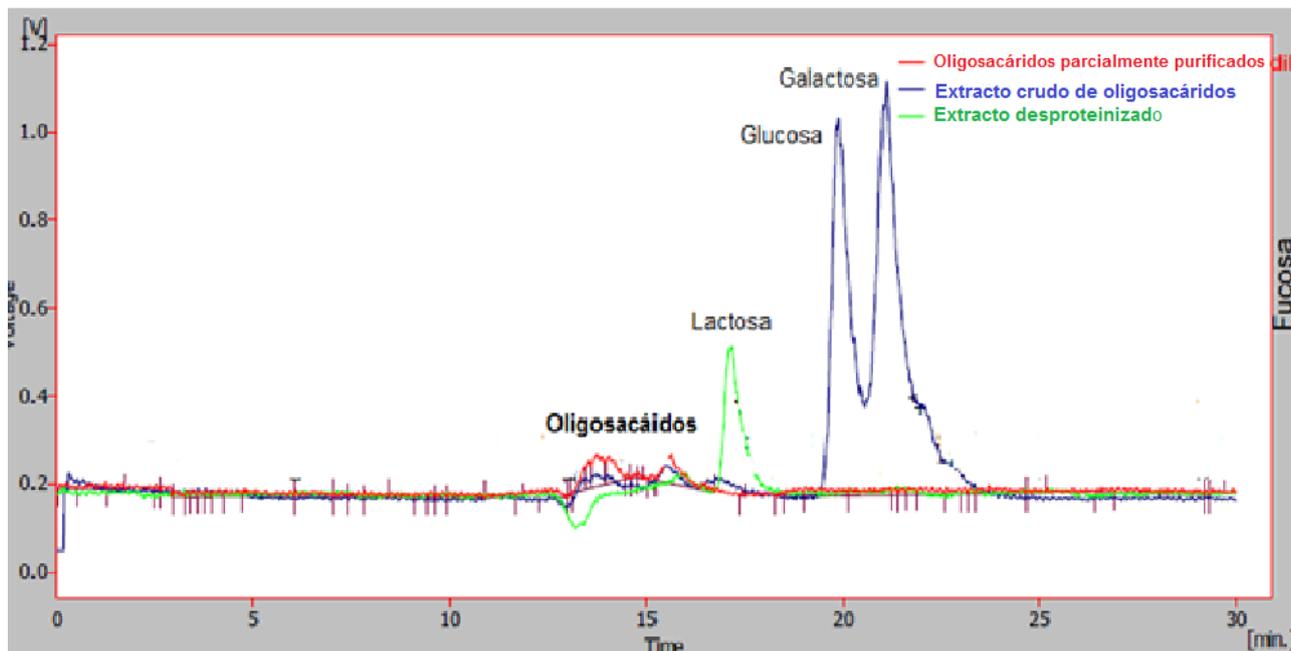


Figura 14. Cromatograma de los extractos de oligosacáridos obtenidos de la leche humana.

Se observa que en el extracto desproteinizado (color verde) solo quedan los oligosacáridos y la lactosa propia de la leche, mientras que en el extracto crudo de oligosacáridos (color azul) se ha eliminado toda la lactosa utilizando  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* formándose como resultado de la hidrólisis glucosa y galactosa; de el extracto crudo de oligosacáridos se eliminaron los monosacáridos mediante la fermentación con las células de *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevaliere*, dejando solo los oligosacáridos de leche humana parcialmente purificados (color rojo).

En la Tabla 10 se muestra la concentración de azúcares de cada extracto obtenido en la purificación de oligosacáridos de la leche, en el extracto crudo de oligosacáridos se observó un incremento de los oligosacáridos esto pudo deberse a que la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* agregada para hidrolizar la lactosa, pudo haber catalizado la síntesis de galactooligosacáridos. Sin embargo los oligosacáridos parcialmente purificados obtenidos después de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* var *chevaliere* disminuyeron, lo que podría deberse a que la levadura consumió estos galactooligosacáridos producidos por la enzima.

Azúcar	Tratamiento		
	Extracto desproteinizado (mg/mL)	Extracto crudo de oligosacáridos (mg/mL)	Oligosacáridos parcialmente purificados (mg/mL)
Oligosacáridos	3.62	5.34	3.83
Lactosa	32.09	0.00	0.00
Glucosa	1.04	11.60	0.00
Galactosa	0.66	18.68	0.00

Tabla 10 Concentración de azúcares de los extractos obtenidos de la leche humana.

Como ya se había mencionado, en la leche materna hay aproximadamente 5-14 g/L de oligosacáridos, su concentración es mayor en el calostro y disminuyen conforme avanza el periodo de lactancia, (Chirido y col., 2011) ; como se observa en la Tabla 10 el contenido de oligosacáridos es muy bajo (3.83 g/L), lo cual indica que probablemente no es una leche madura.

## 7. CONCLUSIÓN.

Se encontró actividad de fucosidasa intracelular en las seis cepas de bacterias lácticas estudiadas. Las cepas que presentan una mayor actividad de fucosidasa intracelular son *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei*, siendo la cepa seleccionada para la extracción de fucosidasa *Lactobacillus rhamnosus* GG.

La mejor fuente de carbono para la producción de fucosidasa intracelular es la glucosa ya que en esta se obtuvieron las mayores actividades específicas.

La combinación de lisozima-Tris-HCl 24 horas pH 8 y acetona 1 hora son los métodos que extraen la mayor cantidad de la enzima de la cepa seleccionada de lactobacilos.

Se logró establecer una metodología eficaz para la purificación parcial de los oligosacáridos de la leche humana.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Agyei, D., Lim, W., Zass, M., Tan, D. y Danquah M.K. (2013) Bioanalytical evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis 313 cell-envelope proteinase extraction. *Chemical Engineering Science* 95: 323–330.
- Andrews, B.A., Asenjo, J.A. (1987) Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *TIBTECH* 5, 273–277.
- Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T. (2009) Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology*, 19(9), 1010–1017.
- Bhaduri, S., Damchick, P.M. (1983) Simple and rapid method for the disruption of bacteria for protein studies. *Appl. Environ Microbiol.* 46(4), 941-943.
- Bode, L. (2009). Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition reviews*, 67 Suppl 2, 183–191.
- Bury, D., Jelen, P., Kalab, M. (2000) Cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2, 23–29.
- Connell, H., Lemmon, J., Tannock, G.W. (1988) Formation and regeneration of protoplasts and spheroplasts of gastrointestinal strains of *Lactobacilli*. *Applied and environmental microbiology* 54(6), 1615–8.
- Chassy, B. M., Giuffrida. (1980) Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. *Applied and environmental microbiology* 39(1): 153–8.
- Chirido, F. G., Men, A.M., Mart, P., Sosa, P., Toca., Trifone, L., Vecchiarelli, C. (2011) Prebióticos en salud infantil. *Arch Argent Pediatr* 109(1), 49–55.
- Chen, C., Ai, L., Zhou, F., Wang, L., Zhang, H., Chen, W. (2011) Complete Genome Sequence of the Probiotic Bacterium. *Society*, 193(13), 3419-3420.
- Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Rossi, M., y Moracci, M. (2008) The alpha-L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 12(1), 61–68.
- Domínguez-Vergara, A., Vázquez-Moreno. L., R. G. (2009) Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales, 59(Mi), 358–368.
- García, P.H.M. (2000) Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag* 1(2), 31–41.
- Gudiel, M. G. I. (2001) Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y desarrollo del lactante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4), 1–8.

- Han, N. S., Kim, T. J., Park, Y. C., Kim, J., Seo, J.H. **(2011)**. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology advances*, 1–11.
- Harrison, T.L. **(1991)** Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recover of intracellular products. *Biotech* 9, 217–240.
- Hansruedi, F. **(1982)** Permeabilized Cells. *Analytical biochemistry* 120, 211–234.
- Horton, R., Moran, L., Scrimgeour, G. **(2008)** Principios de bioquímica. Editorial Pearson. Cuarta edición. 171-181.
- Maitin, V., Rastall, R. A. **(2006)** Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides: Progress and Recent Trends. En: Functional foods and biotechnology. Compilado por Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin. R. Editorial CRC. Nueva York. 473-500.
- Miñana, I. V. (2007). Oligosacáridos en la leche humana. *Acta Pediátrica Española*. 65(3), 129-133.
- Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Murakami, M., Taylor, T. D., Igimi, S., Hattori, M. **(2009)** Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Journal of bacteriology*, 191(24), 7630–7641.
- Neujahr, H., Borstad, B., Logardt, I. **(1973)** *Lactobacillus fermenti* to Lysozyme Factors Affecting the Resistance of *Lactobacillus fermenti* to Lysozyme. *Journal of Bacteriology*, 116(2), 694-700.
- Palcic, M. M. **(1999)** Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Current opinion in biotechnology*, 10(6), 616–624.
- Ramírez, R. J. C., Petra, R., Velázquez, M., Ulloa, J. A., Arce, F. **(2011)** Bacterias lácticas: Importancia en los alimentos y sus efectos en la salud. *Medicina Veterinaria*, 7 (2), 1-16.
- Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V., Yebra, M.J. **(2011)** Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Applied and environmental microbiology*, 77(2), 703–705.
- Rodríguez-Díaz, J., Rubio, C.A., Yebra, M.J. **(2012)** *Lactobacillus casei* ferments the N-acetylglucosamine moiety of fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Applied and environmental microbiology*, 78(13), 4613-4622.
- Ruiz-Palacios, G. **(2003)** *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc- $\alpha$ -1,2Gal- $\beta$ -1,4GlcNAc) and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of Biological Chemistry*.
- Tejeda, A. **(2011)**. Bioseparaciones. Ed. Pearson. 2ª edición, 157-167.
- Thorne, Kareen J I. **(1970)** Spheroplasts of *Lactobacillus casei* and the cellular distribution of bactoprenol. *Journal Cell Science* (7), 755-785.

Voet, D., Voet, J.G. (2004). Bioquímica. Ed. Paramericana. 3ª edición, 482.

Vuong, T. V., Wilson, D.B. (2010). Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnology and bioengineering*, 107(2), 195–205. doi:10.1002/bit.22838

Yurkanis ,B. P. (2008). Química Orgánica. Editorial Pearson. Quinta Edición. 1087-1089.

### 8.1 Referencias electrónicas.

<http://www.cazy.org/GH29.html>. Visitado el 04 de Julio del 2013, 13:45 pm.

[http://www.brenda-enzymes.info/php/result\\_flat.php4?ecno=3.2.1.111](http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.111). Visitado el 04 de Julio del 2013, 14:00 pm.

[http://www.biospec.com/product/28/mini\\_beadbeater/](http://www.biospec.com/product/28/mini_beadbeater/). Visitado el 04 de Julio del 2013, 14:20 pm.

<http://microbiologiaujap2012.blogspot.mx/2012/03/la-tincion-de-gram-normal-0-21-false.html>. Visitado el 25 de mayo del 2013, 19:36 pm.