



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

**Departamento de Biotecnología**

**Síntesis de oligosacáridos fucosilados en medio convencional  
y no-convencional empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de  
*Thermotoga maritima***

**TESIS**

**Para obtener el grado de  
Doctora en Biotecnología**

**Presenta**

**M. en B. Mónica Alejandra Robles Arias**

**Matrícula: 2153806156**

**Directora de proyecto**

**Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero**

**Asesores**

**Dr. José Mariano García Garibay**

**Dr. Salvador Ramón Tello Solís**

**Iztapalapa, Ciudad de México, agosto 2021**



“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001466”

Este trabajo contó con el apoyo de CONACyT a través de la beca 592532.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00259

Matrícula: 2153806156

Síntesis de oligosacáridos fucosilados en medio convencional y no-convencional empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 29 del mes de agosto del año 2021 POR VÍA REMOTA ELÉCTRICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JOSE MARIANO GARCIA GARBAY  
DR. CARLOS ZEPACTONAL GOMEZ CASTRO  
DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA  
DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MONICA ALEJANDRA ROBLES ARIAS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REMSÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA GAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JOSE MARIANO GARCIA GARBAY

VOCAL

DR. CARLOS ZEPACTONAL GOMEZ CASTRO

VOCAL

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE  
SANTAMARIA

SECRETARIO

DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis de doctorado:

**Síntesis de oligosacáridos fucosilados en medio convencional y no-convencional empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima***

Presentada por:

**M. en B. Mónica Alejandra Robles Arias**

**Comité tutorial:**

**Directora:** Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

**Asesor:** José Mariano García Garibay

**Asesor:** Salvador Ramón Tello Solís

**Jurado de evaluación:**

Dr. José Mariano García Garibay

**Presidente**

Dr. Salvador Ramón Tello Solís

**Secretario**

Dr. Sergio Andrés Alatorre SantaMaría

**Vocal**

Dr. Carlos Zepactonal Gómez Castro

**Vocal**

**Ciudad de México a 27 de agosto de 2021**



## **Dedicatoria**

Mamá, gracias por tu confianza, tu apoyo y tu amor incondicional, por impulsarme a ser mejor cada día y a nunca rendirme, por todos esos momentos en los que has estado conmigo, gracias, te amo.

Hermanita, gracias por estar conmigo, por motivarme día a día, por todas las risas, por tu amor incondicional, por nunca dejarme y estar siempre conmigo, te amo mucho pequeña.

Gordita, gracias por alegrarme todos los días, por tu cariño, por venir a alegrar mi vida, te amo con todo mi corazón.

A ti papá porque nunca me has dejado sola, gracias por seguir siendo el mejor padre del mundo y sobre todo por esos hermosos momentos que pasamos como familia y que son los que me impulsan a seguir adelante.

A mi abuela, porque siempre que he necesitado algo ha estado, gracias abuelita por todo.

Carlos, gracias por tu amistad a lo largo de todos estos años, por tu ayuda siempre que he necesitado, por las risas compartidas, muchas gracias por todo.

Gracias madrina y Alex por estar al pendiente de mí y por haber compartido momentos tan especiales conmigo.

A mi marido, Roberto por estar conmigo durante este reto y darme ánimos para continuar y nunca rendirme, por tu comprensión y apoyo, te amo

Esta tesis de la dedico a ti hija, Chiara porque tu llegada me impulsa a ser mejor cada día. Te amo con todo mi corazón.

## **Agradecimientos**

Dra. Alma, gracias por su tiempo, sus consejos en este proyecto, por las pláticas a lo largo de todo este tiempo y su apoyo en momentos difíciles, gracias por todo.

Maestra Lorena, gracias por sus comentarios y apoyo en este proyecto, por los conocimientos transmitidos y por las pláticas que hemos tenido.

Gracias Dra. Gaby, Dr. Mariano y Dr. Sergio gracias por sus comentarios y aportes en este proyecto, pero sobre todo por haberme abierto las puertas de la PP2.

Dr. Salvador, gracias por las pláticas, los conocimientos transmitidos, por su dedicación a este proyecto.

Dr. Carlos, gracias por todo el conocimiento que compartió conmigo, el tiempo y aportes a este proyecto.

Les agradezco a todos los que me han ayudado a llegar hasta donde estoy.

## Lista de abreviaturas

<b>2'-FL</b>	2'-Fucosillactosa
<b>3-FL</b>	3-Fucosillactosa
<b>3'-SL</b>	3'-Sialillactosa
<b>6'-SL</b>	6'-Sialillactosa
<b>a<sub>w</sub></b>	Actividad de agua
<b>AR</b>	Actividad residual
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>C<math>\alpha</math></b>	Carbono alfa
<b><math>\Delta G</math></b>	Energía libre de Gibbs
<b><math>\Delta H</math></b>	Entalpía
<b>DM</b>	Dinámica molecular
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DMF</b>	Dimetil formamida
<b><math>\Delta S</math></b>	Entropía
<b>E<sub>a</sub></b>	Energía de activación
<b>Fuc</b>	Fucosa
<b>FUT2</b>	$\alpha$ 1,2-fucosil transferasa
<b>FUT3</b>	$\alpha$ 1,3/4-fucosiltransferasa
<b>Gal</b>	Galactosa
<b>GDP</b>	Guanosina-difosfato
<b>Glc</b>	Glucosa
<b>GlcNac</b>	N-acetilglucosamina
<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>GH</b>	Glicosil hidrolásas
<b>GOS</b>	Galactooligosacáridos
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>K<sub>b</sub></b>	Constante de unión
<b>LNFP I</b>	Lacto-N-fucopentaosa I
<b>LNT</b>	Lacto-N-tetraosa
<b>Log P</b>	Coefficiente de partición
<b>NeuAc</b>	Ácido N-acetilneuramínico
<b>OLH</b>	Oligosacáridos de la leche humana
<b>pNP-Fuc</b>	<i>para</i> -Nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido
<b>r<sub>H</sub></b>	Tasa de hidrólisis
<b>RMSD</b>	Raíz de la desviación estándar cuadrática
<b>RMSD<sub>prom</sub></b>	Promedio de la raíz de la desviación estándar cuadrática
<b>RMSF</b>	Raíz de la fluctuación estándar cuadrática
<b>RMSD<sub>prom</sub></b>	Promedio de la raíz fluctuación estándar cuadrática
<b>r<sub>T</sub></b>	Tasa de síntesis
<b>Sia</b>	Ácido siálico

## Resumen

La leche humana es el alimento ideal en los primeros meses de vida del infante y su composición está adaptada a sus necesidades nutricionales. En la leche humana se encuentran oligosacáridos fucosilados, los cuales tienen diversos efectos benéficos en la salud de los infantes. Debido a las ventajas anteriormente mencionadas, el objetivo de este trabajo fue aumentar el rendimiento de síntesis de oligosacáridos fucosilados, evaluando los parámetros de pH, temperatura y actividad de agua ( $a_w$ ) en la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*. La fucosidasa presentó un intervalo de pH óptimo de 6-8 para la actividad hidrolítica y de 7-10 para la actividad de transglicosilación. Además, al aumentar la temperatura se observó un incremento tanto en la actividad hidrolítica como de transglicosilación, obteniéndose la mayor actividad enzimática a 95 °C. Asimismo, la productividad más alta en la síntesis de oligosacáridos fucosilados (3.54 mM/h) se registró a pH 8 y 95 °C empleando *p*NP-fucosa (3.5 mM) como sustrato donador y lactosa (438 mM) como sustrato aceptor.

Posteriormente se evaluó el efecto de la  $a_w$ , la cual se disminuyó mediante la adición de dimetil sulfóxido (DMSO), acetona y acetonitrilo. En el medio de reacción con acetona ( $a_w$  0.97, 0.95 y 0.93) y acetonitrilo ( $a_w$  0.96, 0.93 y 0.91) se obtuvo una actividad hidrolítica mayor al 100% respecto al ensayo control (medio acuoso), mientras que con DMSO a  $a_w < 0.99$ , la actividad hidrolítica disminuyó. Por otro lado, la adición de cosolventes influyó en la actividad de transglicosilación, obteniéndose un rendimiento menor en la síntesis de oligosacáridos fucosilados en el orden de acetona > DMSO > acetonitrilo (0.51 > 0.42 > 0.18 mM/h). La adición de acetona y DMSO favoreció la actividad de transglicosilación sobre la actividad hidrolítica, esto se comprobó al obtenerse una tasa de transglicosilación/hidrólisis ( $r_{S/H}$ ) de 1.21 y 1.43, respectivamente. Por el contrario, en el medio con acetonitrilo la actividad hidrolítica prevalece ( $r_{S/H}$  0.59), no obstante, con todos los solventes se obtuvo una mayor  $r_{S/H}$  respecto al ensayo control (0.39).

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la temperatura en la estructura de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* mediante simulación de dinámica molecular (DM). En las DM realizadas a 60-90 °C no se observaron cambios significativos en los valores del promedio de RMSD ( $RMSD_{prom}$ ) indicando la estabilidad de la enzima en ese intervalo de temperaturas, sin embargo, a 95 °C se registró un incremento significativo en el  $RMSD_{prom}$  y promedio de RMSF ( $RMSF_{prom}$ ) reflejando cambios conformacionales importantes en la estructura de la enzima. Además, los resultados obtenidos indican que la temperatura contribuye a los cambios en la estructura secundaria de la enzima, ocasionando una disminución en el contenido de  $\alpha$ -hélices con el subsecuente aumento de conformación irregular, lo que explicaría la pérdida de actividad enzimática a temperaturas elevadas (200 °C). Asimismo, la temperatura influye en la estructura secundaria del sitio activo de la enzima, el cual puede adoptar diferentes conformaciones: abierta, intermedia o cerrada. Finalmente, con la técnica de acoplamiento molecular se observaron diferencias en la interacción de la  $\alpha$ -L-fucosidasa con los ligandos L-fucosa y *p*NP-Fuc, reflejándose en una menor energía libre de unión y una mayor afinidad de la enzima por el sustrato conforme se incrementó la temperatura.

## Abstract

Human milk is the ideal food during the first months in the new-born life with his composition adapted to their nutritional needs. Fucosylated oligosaccharides are found in human milk and have diverse beneficial effects on the health of infants. In this work, the effect of pH, temperature and water activity ( $a_w$ ) on both the hydrolytic and transglycosylation activity on the synthesis of fucosylated oligosaccharides was evaluated by using the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*. The fucosidase show an optimum pH range of 6-8 for hydrolytic activity and 7-10 for transglycosylation activity. In addition, when temperature was raised, an increase on both the hydrolytic and transglycosylation activities was observed, obtaining the highest enzymatic activity at 95 ° C. Additionally, the highest productivity in the synthesis of fucosylated oligosaccharides (3.54 mM/h) was obtained at pH 8 and 95 ° C by using *p*NP-fucose (3.5 mM) as donor substrate and lactose (438 mM) as acceptor substrate.

Subsequently, the effect of  $a_w$  was evaluated;  $a_w$  was decreased by the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone and acetonitrile. In the reaction medium with acetone ( $a_w$  0.97, 0.95 0.93) and acetonitrile ( $a_w$  0.96, 0.93 and 0.91), a hydrolytic activity greater than 100% was obtained with respect to the control (water media), while with DMSO at  $a_w$  <0.99, the hydrolytic activity decreased. On the other hand, addition of solvents affected the transglycosylation activity, as the yield of fucosylated oligosaccharides synthetized was in the order of acetone > DMSO > acetonitrile (0.51 > 0.42 > 0.18 mM/h). With the addition of DMSO and acetone, transglycosylation activity was favoured over the hydrolytic one, this by obtaining a transglycosylation/hydrolysis rate ( $r_{S/H}$ ) of 1.21 and 1.43, respectively; on the contrary, in the medium with acetonitrile, the hydrolytic activity prevailed ( $r_{S/H}$  0.59), however, all solvents allowed to obtain a higher  $r_{S/H}$  compared to the control (0.39).

Additionally, the effect of temperature on the structure of the  $\alpha$ -L-fucosidase of *T. maritima* was evaluated by molecular dynamics simulation (DM). In the DM at 60-90 °C, no significant changes were observed in the average RMSD ( $RMSD_{avg}$ ) values, indicating the stability of the enzyme in that range of temperatures. However, at 95 °C there was a significant increase on both, the  $RMSD_{avg}$  and average RMSF ( $RMSF_{avg}$ ) values, which reflect important conformational changes in the enzyme structure. Furthermore, results indicate that temperature contributes to changes in the secondary structure of the enzyme, causing a decrease in the content of  $\alpha$ -helices with the subsequent increased in irregular conformation, which would explain the loss of enzymatic activity at high temperatures (200 °C). Likewise, the temperature influences the secondary structure of the active site of the enzyme, which can adopt different conformations: open, intermediate or closed. Finally, with the molecular docking technique, differences were observed in the interaction of  $\alpha$ -L-fucosidase with the ligand L-fucose and *p*NP-Fuc, as the temperature increased a lower free binding energy and higher affinity of the enzyme for the corresponding substrate was observed.

## Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b> .....	2
2.1	Leche humana .....	2
2.2	Oligosacáridos en leche humana .....	2
2.3	Fuco-oligosacáridos .....	5
2.4	Efectos benéficos de los OLH en la salud de los lactantes .....	5
2.4.1	Efecto prebiótico .....	5
2.4.2	Efecto anti-infeccioso .....	6
2.4.3	Efecto inmunomodulador .....	6
2.4.4	Maduración del sistema nervioso central .....	7
2.5	Síntesis de fuco-oligosacáridos .....	7
2.5.1	Síntesis <i>in vivo</i> .....	7
2.5.2	Síntesis química .....	9
2.5.3	Síntesis enzimática .....	9
2.5.4	Fermentación .....	10
2.6	Fucosidasas .....	11
2.6.1	$\alpha$ -L-fucosidasa de <i>Thermotoga maritima</i> .....	12
2.6.1.1	Estructura de $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	13
2.7	Parámetros que influyen en el rendimiento de síntesis enzimática de fuco-oligosacáridos... 14	
2.7.1	Especificidad y selectividad .....	14
2.7.2	Especificidad del donador .....	14
2.7.3	Especificidad del aceptor .....	15
2.7.4	Actividad de agua .....	16
2.7.4.1	Efecto de los solventes en las reacciones de transglicosilación .....	17
2.8	Métodos computacionales .....	17
2.8.1	Dinámica molecular (DM) .....	18
2.8.1.1	Programas de dinámica molecular .....	18
2.8.1.1.1	Software NAMD .....	19
2.8.2	Acoplamiento molecular .....	19
2.8.2.1	Programas de acoplamiento molecular .....	19
<b>3</b>	<b>Corolario</b> .....	20
<b>4</b>	<b>Objetivo general</b> .....	22
4.1	Objetivos particulares .....	22

<b>5 Hipótesis</b> .....	22
<b>6 Justificación</b> .....	23
<b>7 Plan general de trabajo</b> .....	24
<b>8 Materiales y métodos</b> .....	25
8.1 Efecto del pH en la actividad hidrolítica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	25
8.2 Efecto del pH en la actividad de transglicosilación de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	25
8.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad hidrolítica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i>	25
8.4. Efecto de la temperatura en la actividad de transglicosilación de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. marítima</i> .....	26
8.5 Termo-estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	26
8.6 Estimación de la $a_w$ en el sistema de reacción Agua:Solvente.....	27
8.7 Efecto de la $a_w$ en la estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	28
8.8 Efecto de la $a_w$ en la actividad hidrolítica de $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	28
8.9 Efecto de la $a_w$ en la actividad de transglicosilación .....	29
8.10 Cuantificación de oligosacáridos fucosilados mediante HPLC.....	29
8.11 Análisis estadístico.....	30
8.12. Producción de las dinámicas moleculares.....	30
8.13. Procedimiento del acoplamiento molecular .....	30
<b>9 Resultados y análisis</b> .....	<b>31</b>
9.1 Efecto del pH en la actividad hidrolítica y de transglicosilación de $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	31
9.2 Efecto de la temperatura en la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	33
9.3 Termo-estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	35
9.4 Síntesis de oligosacáridos fucosilados.....	37
9.5 Estimación de la actividad de agua en el sistema de reacción agua:solvente .....	40
9.6 Estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> a distintas $a_w$ .....	40
9.7 Efecto de la $a_w$ sobre la actividad hidrolítica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	42
9.8 Efecto de la $a_w$ en la síntesis de fucooligosacáridos .....	43
9.9 Estudio del efecto de la temperatura en la estructura de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> mediante dinámica molecular.....	46
9.9.1 Raíz de la desviación estándar cuadrática (RMSD).....	46
9.9.2 Raíz de la fluctuación estándar cuadrática (RMSF) .....	48
9.9.3 Estructura secundaria.....	51
9.9.4 Conformación del sitio activo .....	54
9.10 Análisis del acoplamiento molecular.....	56

<b>10 Conclusiones</b> .....	<b>63</b>
<b>11 Perspectivas</b> .....	<b>64</b>
<b>12 Bibliografía</b> .....	<b>65</b>
<b>13 Anexo</b> .....	<b>78</b>
13.1 Curva patrón de 4-nitrofenol ( <i>p</i> NP) empleada para la cuantificación de <i>p</i> NP liberado en la reacción de hidrólisis catalizada por la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	78
13.2 Curva patrón de rafinosa empleada para la cuantificación de oligosacáridos fucosilados en la reacción de transfucosilación catalizada por la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	79
13.3 Autodock convierte la energía libre de unión en $K_i$ .....	80
13.4 RMSD de la estructura cristalográfica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> a 200 °C.....	82
13.5 RMSF de la estructura cristalográfica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> a 200 °C. ....	82
13.6 RMSD de los residuos catalíticos de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> a 200 °C.....	83
13.7 Efecto de la temperatura en la formación del complejo entre la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> y L-fucosa.....	84
13.8 Efecto de la temperatura en la formación del complejo entre la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> y <i>p</i> NP-fucosa. ....	85
13.9 Artículos publicados .....	86



## 1. Introducción

La leche humana es el alimento ideal en los primeros meses de vida del recién nacido y su composición está adaptada a sus necesidades nutricionales. En la leche humana se encuentran oligosacáridos fucosilados, los cuales tienen diversos efectos benéficos en la salud de los infantes entre los que destacan su actividad prebiótica, efecto anti-infeccioso, inmunomodulador, además de ser una fuente importante de nutrientes para el desarrollo cognitivo.

Los oligosacáridos fucosilados pueden ser sintetizados mediante tres vías: *in vivo* y mediante síntesis química y enzimática. En la síntesis *in vivo* los oligosacáridos son sintetizados en el aparato de Golgi de las células de las glándulas mamarias. Respecto a la síntesis química, esta requiere numerosos pasos de protección y desprotección lo cual dificulta el proceso, por su parte la síntesis enzimática puede realizarse mediante fucosiltransferasas y fucosidasas empleando sustratos donadores y aceptores bajo las condiciones adecuadas. Adicionalmente, los OLH pueden ser sintetizados mediante la vía fermentativa empleando cepas de *E. coli* genéticamente modificadas.

Estudios recientes reportan el uso de fucosidasas de origen bacteriano como la de *Thermotoga maritima*, cuyo mecanismo de reacción depende de un delicado balance entre reacciones de hidrólisis y transglicosilación. Para aumentar el rendimiento en la síntesis de oligosacáridos fucosilados es necesario reducir la actividad de agua ( $a_w$ ) en el medio de reacción, lo cual puede realizarse mediante la adición de solventes orgánicos adecuados. Sin embargo, es necesario que estos solventes cubran ciertas características como: ser miscibles en agua, tener propiedades fisicoquímicas similares a las del agua, mejorar la selectividad de la enzima por moléculasceptoras diferentes al agua y sobre todo no deben tener un grupo hidroxilo que pueda ser fucosilado.

Actualmente la interpretación de fenómenos biológicos como la síntesis enzimática ha sido enriquecida gracias a la combinación de los datos experimentales con la representación detallada de diferentes mecanismos obtenidos mediante modelos *in silico*. Siendo las simulaciones de dinámica molecular (DM), acoplamiento molecular y simulaciones Monte Carlo las más empleadas. Recientemente se han realizado estudios computacionales sobre la actividad de  $\alpha$ -L-fucosidasas de origen bacteriano. Por ejemplo, mediante DM ha sido posible explicar el efecto de la temperatura en la actividad de  $\alpha$ -L-fucosidasas de distintos microorganismos, más aún, también es posible evaluar los cambios en su actividad como resultado de mutaciones en las mismas.

En este trabajo se evaluaron diferentes parámetros que afectan la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, tales como pH, temperatura y  $a_w$  con el objetivo de aumentar el rendimiento en la síntesis de oligosacáridos fucosilados. Además, se realizaron simulaciones de DM con la finalidad de interpretar a nivel estructural el efecto de la temperatura en la relación estructura-actividad de la fucosidasa. Adicionalmente, se recurrió a la técnica de acoplamiento molecular si el incremento de la temperatura ocasiona cambios estructurales en la enzima y si se altera la forma en que dos diferentes sustratos (L-fucosa y *p*NP-Fuc) se unen al sitio activo de la misma.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Leche humana

La leche materna es ampliamente conocida y aceptada como el estándar de oro en la nutrición infantil, además, es considerada el alimento ideal durante los primeros meses de vida del infante debido a la influencia positiva en su salud y desarrollo (Baró *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2021). Recientemente, diversos estudios han demostrado los múltiples beneficios de la leche materna en los lactantes. Por ejemplo, a corto plazo, se ha detectado una disminución en la morbilidad y mortalidad, mientras que, a largo plazo, disminuye el riesgo de padecer diabetes. Estos beneficios también se extienden a la madre, protegiéndola del riesgo de padecer cáncer de mama (Bode, 2013).

Al igual que en cada mamífero, la leche está adaptada a las necesidades nutricionales del recién nacido. Por ejemplo, la concentración de lactosa varía de 69 g/L en la leche humana hasta 41 g/L para la leche caprina; mientras que la concentración de proteína en la leche humana es de 12 g/L, en la leche ovina puede contener hasta 62 g/L dado que este nutriente es indispensable para el crecimiento y por tanto es mayor el requerimiento en los becerros (**Tabla 1**). Sin embargo, es la abundante presencia de oligosacáridos en la leche humana en comparación con otras especies, lo que ha dirigido a diversos investigadores a proponer el efecto que estos azúcares presentan en diversas funciones biológicas, fisiológicas y de protección (Oliveira *et al.*, 2015).

Tabla 1. Composición de los nutrientes sólidos básicos de la leche de distintas especies (Oliveira, *et al.*, 2015).

Composición (g/L)	Humana	Bovina	Caprina	Ovina
Proteína	12	32	34	62
Caseína	4	26	24	42
Grasa	40	36	38	79
Lactosa	69	47	41	49
Cenizas	3	7	8	9
Sólidos no grasos	89	90	89	120
Calorías/100 mL	68	69	70	105
Oligosacáridos	9-23	0.03-0.06	0.25-0.30	0.02-0.04

### 2.2. Oligosacáridos en leche humana

Los oligosacáridos de la leche humana (OLH) son un grupo complejo de azúcares que se encuentran en una concentración de 9-12 g/L en la leche madura y hasta 15-23 g/L en el calostro (Vitoria, 2007). En comparación con la leche bovina (que es la habitualmente consumida) los oligosacáridos se encuentran en una mayor concentración. Además, su composición es diferente, mientras que en la leche materna los oligosacáridos fucosilados se encuentran en mayor abundancia, en la leche bovina son los oligosacáridos sialilados los que se encuentran en una mayor concentración (**Tabla 2**). En la leche humana se han identificado más de 100 estructuras diferentes de oligosacáridos

y aunque pueden contener entre 3 y 32 unidades, los OLH más abundantes tienen de 3 a 8 moléculas de monosacáridos (Baró *et al.*, 2001).

Tabla 2. Oligosacáridos presentes en la leche humana y bovina (Bode, 2012; Oliveira *et al.*, 2015).

<b>Composición</b>	<b>Humana</b>	<b>Bovina</b>
<b>Lactosa (g/L)</b>	70	48
<b>Oligosacáridos (g/L)</b>	9-23	0.05
<b>Oligosacáridos identificados</b>	100+	~40
<b>Fucosilados (%)</b>	50-80	~ 30
<b>Sialilados (%)</b>	10-20	~70

Los OLH siguen una estructura básica de construcción compuesta por cinco monosacáridos (**Fig. 1**): D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc) y ácido siálico (Sia). La lactosa (Glc-Gal) forma el extremo reductor de las estructuras y salvo algunas excepciones (como la 2'-fucosil lactosa (2'FL) o difucosillactosa) puede estar unida a lacto-*N*-biosa o N-acetillactosamina (**Fig. 1a**). Por otro lado, a la molécula de lactosa se pueden ir agregando monómeros de otros azúcares como moléculas de lacto-*N*-tetraosa (tipo 1) o Lacto-*N*-*neotetraosa* (tipo 2) (**Fig. 1b**). Además, al bloque de lactosa se puede unir una molécula de fucosa en la Gal terminal mediante un enlace  $\alpha$  1-2 para formar 2'-FL o en el extremo reductor de la Glc en un enlace  $\alpha$  1-3 para generar 3-fucosillactosa (3-FL), alternativamente, la lactosa puede ser sialilada en la Gal terminal mediante un enlace  $\alpha$  2-3 o  $\alpha$  2-6 para generar 3'-sialillactosa (3'-SL) y 6'-sialillactosa (6'-SL), respectivamente (**Fig. 1c**). Adicionalmente, las cadenas de tipo I y II pueden ser fucosiladas en diferentes enlaces para formar isómeros estructurales (**Fig. 1d**), además, las cadenas elongadas pueden ser sialiladas mediante enlaces  $\alpha$  2-3 o  $\alpha$  2-6 para formar distintos isómeros sialilados (**Fig. 1e**) (Bode, 2012; Bode & Jantscher-Krenn, 2012).

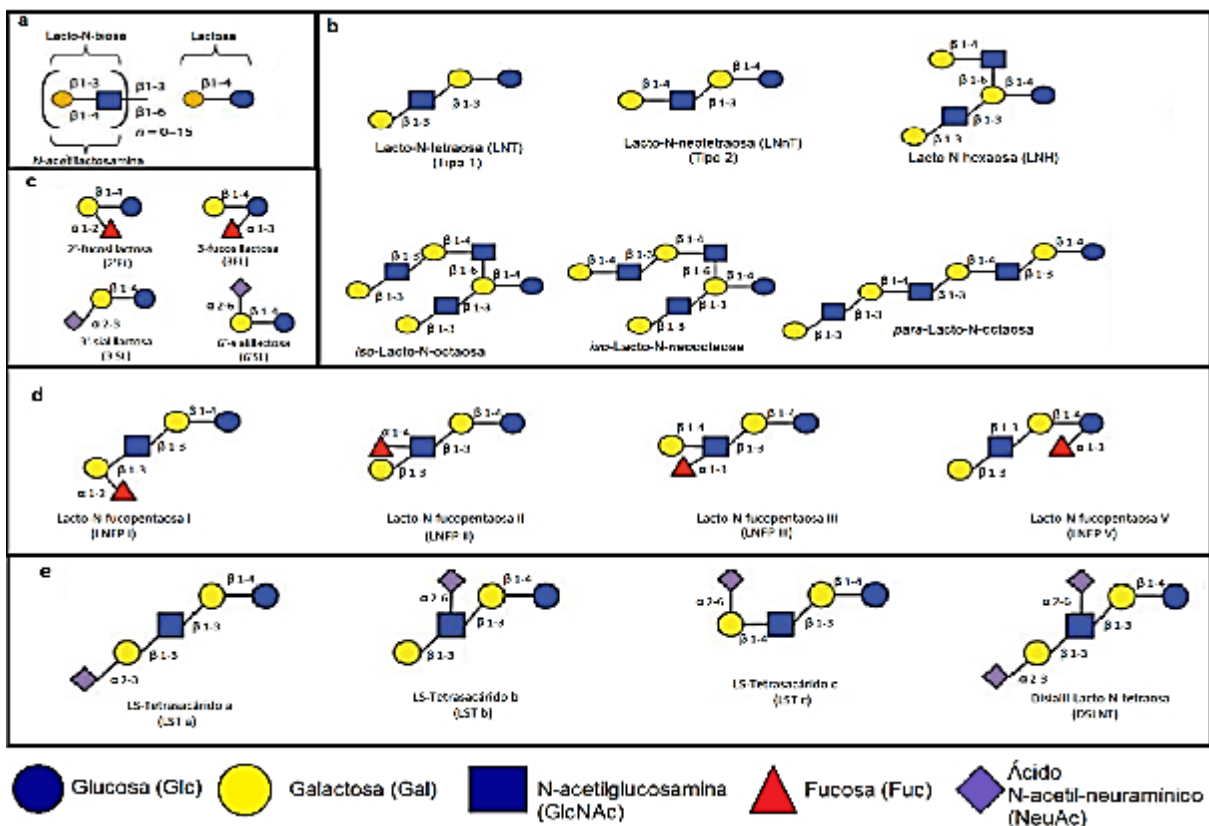


Fig. 1 Ejemplos de las diversas estructuras de OLH (Modificado de Bode, 2012).

La leche humana está compuesta por una mezcla compleja de oligosacáridos que difieren en tamaño, carga y abundancia, además, pueden encontrarse en forma libre como OLH o conjugada en forma de glucoproteínas, glucolípidos y glucosaminglicanos. En la **Tabla 3** se observa que de acuerdo a su composición, los oligosacáridos se clasifican en tres grupos: (1) neutros, los cuales contienen residuos de monosacáridos no cargados (Glc, Gal, GlcNAc) y usualmente fucosa unida al núcleo de lactosa, representado alrededor del 75-85% del total de los OLH conocidos; (2) aniónicos o ácidos, los cuales contienen la misma composición de oligosacáridos más ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) y (3) oligosacáridos sialil fucosilados, que son oligosacáridos ácidos que contienen un residuo de fucosa (Ninonuevo *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2015; Vitoria, 2007).

Tabla 3. Clasificación de los OLH (Gudiel-Urbano & Goñi, 2001; Vitoria, 2007)

Oligosacáridos neutros	Oligosacáridos ácidos	Oligosacáridos sialilfucosilados
2 fucosil-lactosa 3 fucosil-lactosa Difucosil-lactosa	Sialil $\alpha$ (2-3)-lactosa Sialil $\alpha$ (2-6)-lactosa Sialil-lacto-N-tetraosa a Sialil-lacto-N-tetraosa b	3 sialil-lactosa-3-fucosil-lactosa Sialil-fucosil-lacto-N-tetraosa Monofucosil-monosialil-lacto-N-hexosa

### 2.3. Fuco-oligosacáridos

El contenido de los OLH fucosilados en la leche materna depende de la actividad de dos genes Loci: el locus *Se* que codifica para la  $\alpha$  1,2-fucosil transferasa (FUT2), mientras que el locus *Le* codifica para una  $\alpha$  1,3/4-fucosiltransferasa (FUT3) con ambos genes expresados en las glándulas del epitelio. Además, las llamadas mujeres secretoras con el gen locus *Se* expresan una  $\alpha$  1,2-fucosil transferasa activa, por lo que su leche contiene altas cantidades de oligosacáridos  $\alpha$  1,2-fucosilados, tales como 2'-FL o lacto-N-fucopentaosa I. (Petschacher & Nidetzky, 2016; Wicinski *et al.*, 2020).

Basado en la expresión de los genes *Se* y *Le*, la leche humana presenta diferentes perfiles de OLH, por ejemplo, la deficiencia de la enzima FUT2 resulta en la producción de leche sin la presencia de los oligosacáridos lacto-N-fucopentaosa I (LNFP I) y 2'-fucosillactosa (2'FL) lo que se refleja en una menor cantidad de OLH en la leche de humana. En un estudio realizado por Akkerman *et al.* (2019) se encontró aproximadamente entre un 35-45% menos OLH en la leche de mujeres no secretoras de la enzima FUT2. De manera análoga, la ausencia de la enzima FUT3, (responsable de la síntesis de OLH  $\alpha$  1-4 fucosilados) conlleva a una demora en la colonización intestinal de bacterias benéficas del género *Bifidobacteria* así como diferencias en la actividad metabólica de la microbiota, especialmente las del género *Streptococcus* (Cheng *et al.*, 2021; Vandenplas *et al.*, 2018; Wicinski *et al.*, 2020).

### 2.4. Efectos benéficos de los OLH en la salud de los lactantes

Los OLH han sido reconocidos primordialmente por su efecto bifidogénico y prebiótico por lo que originalmente fueron identificados como un factor bífido. En 1990 (Bode, 2012). se encontró evidencia que sugería que los OLH eran más que un sustrato que promovía el crecimiento de bacterias benéficas en el intestino delgado, sin embargo, actualmente los OLH han demostrado tener diversos efectos benéficos en la salud de los lactantes como: efecto prebiótico, antimicrobial, modulador intestinal, protector natural ante la enterocolitis necrosante, además son una fuente importante de nutrientes para el desarrollo del cerebro (Bode, 2012).

#### 2.4.1. Efecto prebiótico

Los prebióticos son alimentos no digeribles que afectan de manera indirecta, beneficiosa al hospedador al estimular el crecimiento o la actividad de un seleccionado grupo de bacterias (Marti *et al.*, 2003). Tanto los OLH fucosilados como sialilados sirven como sustratos metabólicos para bacterias específicas del género *Bifidobacterium* como: *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum*, las cuales han sido mayormente encontradas en las heces de los lactantes. Además, los *Bacteroides* presentes en la microbiota infantil demostraron la capacidad de metabolizar los OLH siendo *Bacteroides vulgatus* capaz de metabolizar los tres principales compuestos fucosilados (2'-FL, 3-FL y difucosillactosa), mientras que *Bacteroides fragilis*, además de crecer con los principales compuestos fucosilados creció a partir de la 6'-SL, sin embargo, algunas bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* presentan poco crecimiento a partir de OLH (Bode, 2012; Yu *et al.*, 2013).

### 2.4.2. Efecto anti-infeccioso

Muchos virus, bacterias y parásitos protozoarios patógenos necesitan adherirse a la superficie de las células del epitelio para proliferar y en algunos casos invadir y causar una enfermedad. Inicialmente estos patógenos se adhieren a los azúcares de las células epiteliales (glicanos) también conocido como glicocáliz. Los OLH poseen estructuras similares a los receptores del glicocáliz, por lo que actúan como ligandos competitivos para bacterias, virus, hongos y protozoos, evitando así la unión al huésped y deteniendo el proceso de infección. Es por ello, que estos microorganismos patógenos se encuentran con menor frecuencia en las deposiciones de los niños alimentados con leche materna (Bode, 2015; Gudiel-Urbano & Goñi, 2001). Hay más de 20 OLH capaces de unirse competitivamente a patógenos del tracto intestinal, respiratorio y urinario, donde cada oligosacárido inhibe la adhesión de cierto microorganismo patógeno (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de oligosacáridos de la leche materna que inhiben microorganismos patógenos (Gudiel-Urbano & Goñi, 2001; Bode, 2012).

Oligosacárido	Patógeno
Tri-N-acetil lactosamina sialilado	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Pentasacárido fucosilado	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Oligosacáridos fucosilados	<i>Campylobacter jejuni</i>
Oligosacáridos sialilados	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Virus de influenza A, B y C

Recientemente se demostró que los OLH no solo ejercen un efecto anti-infeccioso al bloquear la adhesión de patógenos, también pueden alterar la expresión de genes en las células epiteliales que bloquean la infección de *Listeria monocytogenes*. Por otra parte, los OLH neutros como la lacto-N-tetraosa (LNT) o lacto-N-fucopentaosa I (LNFP I), tienen un efecto directo en la inhibición de *Streptococcus agalactiae* evitando así el riesgo de enfermedades asociadas a esta bacteria tales como neumonía, septicemia y meningitis. Además, está reportado que, los metabolitos producidos mediante la fermentación de OLH en la microbiota intestinal atenúan la virulencia patogénica (Bondue *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017; Triantis *et al.*, 2018).

### 2.4.3. Efecto inmunomodulador

Los oligosacáridos de la leche humana pueden modular directamente la respuesta de las células del epitelio intestinal del huésped, reduciendo su crecimiento e induciendo su diferenciación y apoptosis y por lo tanto, alterando los genes del ciclo de crecimiento celular (Oliveira, *et al.*, 2015). El número de los interferones  $\gamma$  de los linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ así como la interleucina-13 productora de los linfocitos CD3+ y CD8+ incrementa cuando las células T de la sangre del cordón son expuestas a OLH sialilados (Bode, 2012).

Recientemente se ha demostrado que ciertos OLH sialilados reducen la expresión de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina-1 $\beta$  e interleucina-6 en macrófagos estimulados por lipopolisacáridos, así como la reducción en la producción de interleucina-4 en el subconjunto de los linfocitos de pacientes adultos que presentan alergia al cacahuete, lo que conduce a la conclusión de que los OLH también pueden contribuir a la prevención de alergias (Bode, 2012, 2015).

#### **2.4.4. Maduración del sistema nervioso central**

El ácido siálico se presenta en la naturaleza en forma de glicoconjugados y es importante para el funcionamiento de membranas celulares y receptores de membrana. Se piensa que el ácido siálico ejerce un papel esencial en la sinapsis, en la formación de la memoria y en la comunicación celular. Una disminución en la concentración de estas sustancias durante el periodo de crecimiento se asocia con un daño irreversible en la capacidad de aprendizaje en ratas (Gudiel-Urbano & Goñi, 2001).

Urashima *et al.* (2013) reportaron que las ratas adultas alimentadas con sialil-lactosa tuvieron un incremento en los gangliósidos del cerebro mayor que con NeuAc libre, lo que se tradujo en una mejora en la habilidad de aprendizaje. Además, la absorción de los OLH en los bebés amamantados apoya la posibilidad de que el ácido siálico presente en los OLH es empleado como sustrato en la biosíntesis de componentes sialilados incluidos gangliósidos y glicoproteínas en el cerebro (Rudloff & Kunz, 2012).

#### **2.5. Síntesis de fuco-oligosacáridos**

El interés en los OLH comenzó aproximadamente a inicios de la década de los 90's, influenciado por el incremento en la tasa de sobrevivencia de niños amamantados en comparación con aquellos alimentados con fórmulas infantiles atribuido a la composición única de la leche humana (Kunz, 2012).

Debido a la evidencia de los efectos benéficos de los OLH en la salud de los bebés amamantados, ha surgido el interés de agregar estos oligosacáridos a las fórmulas infantiles con la finalidad de proveer a los bebés alimentados con fórmulas los mismos beneficios que reciben los lactantes maternos. Dado que hay oligosacáridos que únicamente se encuentran en la leche materna (en especial aquellos con estructuras complejas) (Bode & Jantscher-Krenn, 2012); el reto ha sido proponer procesos que permitan sintetizar estos OLH entre estos métodos destacan la síntesis química (Schmid & Waldmann, 1998; Jennum *et al.*, 2014), enzimática (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018a, b; Lezyk *et al.*, 2016; Zeuner *et al.*, 2018) y fermentativa (Chin *et al.*, 2016; Chin *et al.*, 2017).

##### **2.5.1. Síntesis *in vivo***

Los oligosacáridos son sintetizados en la glándula mamaria en el aparato de Golgi de las células que revisten el alveolo y los conductos más pequeños. El paso inicial es la síntesis de lactosa, siendo la  $\alpha$ -lactoalbúmina quien regula la enzima glucosil-transferasa para producir lactosa en una reacción

entre UDP-galactosa y glucosa. La lactosa actúa como núcleo al que se añaden monosacáridos por la acción de glicosil-transferasas específicas a través de la adición secuencial de moléculas como Fuc, GlcNAc o NeuAc para formar los oligosacáridos (Gabielli *et al.*, 2011; McVeagh & Miller, 1997).

En sistemas biológicos, la síntesis de oligosacáridos fucosilados se lleva a cabo mediante dos caminos metabólicos diferentes: la vía *de novo* y la vía de rescate. En la vía *de novo* la GDP-manosa (guanosina-difosfato-manosa) es transformada a GDP-4-ceto-6-deoxifucosa (guanosina-difosfato-fucosa) por la GDP-manosa-4,6-dehidratasa. Posteriormente, este intermediario es convertido a GDP-fucosa en un proceso de dos pasos catalizado por las enzimas GDP-4-ceto-6-deoximanosa y GDP-4ceto-6-deoxigalactosa, también conocidas como proteína FX (**Fig. 2**). En la vía de rescate (encontrada en humanos) se sintetiza fucosa libre derivada de fuentes extracelulares o lisosomales y es transferida dentro de las células y fosforilada por la fucosa cinasa a expensas de ATP. La L-fucosa-1-fosfato es combinada con un trifosfato de guanosina (GTP) por la GDP-fucosa pirofosforilasa para producir GDP-fucosa la cual será transportada dentro del lumen del aparato de Golgi donde se vuelve disponible para dominios catalíticos de fucosiltransferasas que también se localizan en este compartimento (Becker & Lowe, 2003; Petschacher & Nidetzky, 2016).

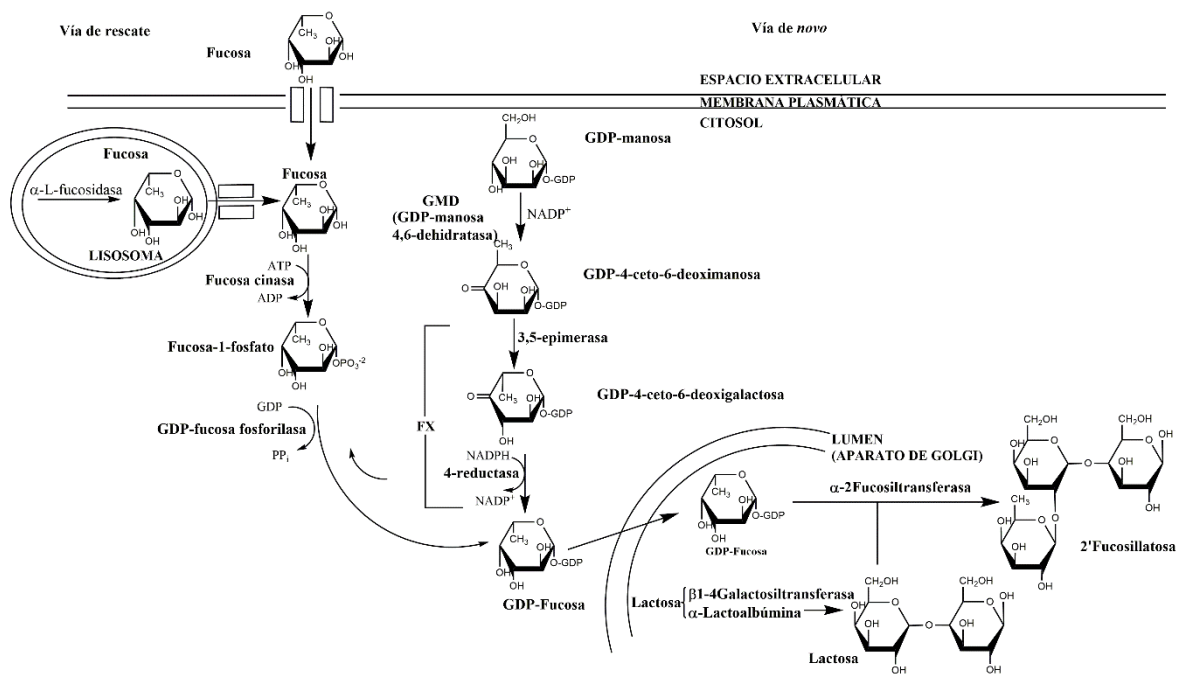


Fig. 2 Biosíntesis de GDP-fucosa en mamíferos. La vía de rescate hace uso de L-fucosa libre (proveniente de la alimentación o del catabolismo de otros glicoconjugados). En un primer paso, la fucosa es fosforilada mediante la fucosa cinasa y posteriormente activa a GDP-fucosa utilizando GDP mediante la acción de la GDP-fucosa-pirofosforilasa. En la vía *de novo* se utiliza GDP-manosa como sustrato inicial, la cual es convertida a GDP-4-ceto-6-deoximanosa por la enzima DGP-manosa 4,6-dehidralasa (GMD). Posteriormente, este intermediario es transformado en GDP-fucosa en dos pasos catalizados por la GDP-manosa-4,6-dehidratasa (GMD) y GDP-ceto-6-deoximanosa-3,5-epimerasa-4-reductasa (FX). Finalmente, se obtiene 2'fucosillactosa mediante la transferencia de fucosa a la molécula de lactosa en una reacción catalizada por la  $\alpha$ -2'fucosiltransferasa (Modificada de Becker & Lowe, 2003).



### 2.5.2. Síntesis química

Muchos procedimientos químicos han sido desarrollados para la síntesis de oligosacáridos, sin embargo, son frecuentemente laboriosos debido a los numerosos pasos de protección y desprotección o las difíciles separaciones de las mezclas de anómeros lo que se refleja en bajos rendimientos (Svensson, 1990).

En particular, la síntesis química de los OLH consiste en pasos secuenciales de protección de los grupos hidroxilos de los monosacáridos, es un procedimiento indispensable para guiar la posición del enlace glucosídico, el cual se lleva a cabo empleando catalizadores químicos, tales como, trifluorometanosulfonato de trietilsililo o bromuro de tetra-*n*-butilamonio. Finalmente, el oligosacárido sintetizado debe ser desprotegido para obtener la molécula deseada (Pérez-Escalante *et al.*, 2020).

La construcción de glucósidos fucosilados es a menudo obstaculizada por su alta sensibilidad a los ácidos, en particular si el donador fucosil está protegido con un grupo benceno. Es por ello que se han buscado métodos para la síntesis química de *O*-fucosidos que puedan proceder bajo condiciones suaves y sin el uso de promotores como ácidos fuertes de Lewis (Schmid & Waldmann, 1998). Asimismo, se han desarrollado técnicas automatizadas de síntesis de oligosacáridos en fase sólida, lo que ha permitido una producción rápida y eficiente. En la síntesis en fase sólida, los oligosacáridos que están siendo sintetizados son unidos a un material insoluble (resinas o camas) que permiten una fácil separación de los productos de reacción del exceso de reactivos, sub-productos de reacción y solventes, sin embargo este procedimiento se enfrenta a la baja estereo-selectividad, bajos rendimientos y uso de reactivos tóxicos no adecuados para productos alimenticios (Han *et al.*, 2012). Recientemente, Agoston *et al.* (2019) desarrollaron un procedimiento con el que es posible sintetizar a nivel de kilogramos 2'-FL con un solo paso de purificación, lo que representa la base para la producción de este OLH a nivel industrial.

### 2.5.3. Síntesis enzimática

Como se mencionó previamente, los oligosacáridos pueden ser producidos mediante síntesis enzimática con transferasas, lo cual puede ser aprovechado para sintetizarlos via *in vitro*. Estas enzimas tienen una alta especificidad, sin embargo, presentan desventajas como: dificultad en los procesos de expresión y purificación, así como el uso de nucleótidos activados como sustratos. ES por ello que estas reacciones son virtualmente irreversibles, además muchas de las transferasas no son adecuadas para su aplicación debido a su baja estabilidad (Adlercreutz, 2017; Zeuner & Meyer, 2020). En contraste, el uso de hidrolasas como las fucosidasas presentan ventajas como: ser asequibles, relativamente menos costosas, amplia especificidad hacia el sustrato, además, la formación de oligosacáridos usando la actividad transferasa de una glicosidasa es una reacción cinéticamente controlada (Boon *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2020).

En la **Fig. 3** se muestra el mecanismo de acción de una  $\alpha$ -L-fucosidasa. Debido a las características propias de este mecanismo, en la que se da un equilibrio entre el rompimiento y la formación del enlace glucosídico, la enzima puede llevar a cabo reacciones tanto de hidrólisis como de transfucosilación. La síntesis de oligosacáridos fucosilados comienza con la hidrólisis del residuo fucosilado ubicado en el extremo no reductor del oligosacárido fucosilado o fucoglicoconjugado y la

subsecuente formación del intermediario covalente glicosil-enzima tras la unión del donador en el sitio activo de la enzima. Posteriormente, este complejo puede sufrir un ataque nucleofílico, ya sea por agua resultando en una reacción de hidrólisis, o por algún otro aceptor (como la lactosa) resultando en la formación del oligosacárido fucosilado. Sin embargo, el producto de la transglucosilación también es un sustrato para la enzima y puede sufrir una hidrólisis subsecuente (hidrólisis secundaria), por lo tanto los rendimientos en la obtención de productos de transglucosilación son resultado de un delicado balance entre tasa de síntesis, hidrólisis del donador e hidrólisis de producto (Zeuner *et al.*, 2014).

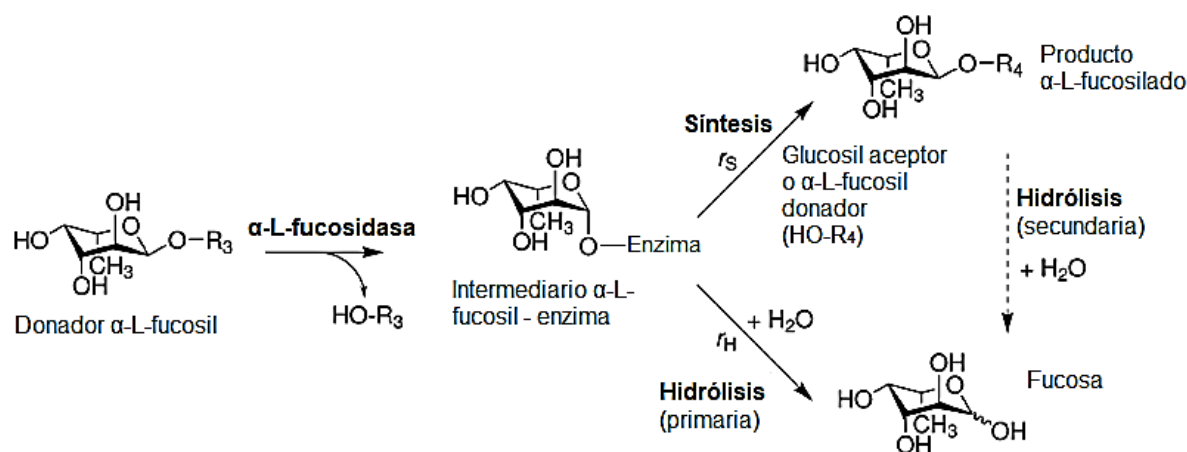


Fig. 3 Mecanismo de reacción para la obtención de fuco-oligosacáridos (Modificado de Zeuner *et al.*, 2014).

#### 2.5.4. Fermentación

La producción de OLH mediante fermentación es probablemente la estrategia con los mejores avances en los años recientes. Generalmente, se modifican cadenas de *E. coli* mediante ingeniería genética para expresar las enzimas necesarias para la biosíntesis de los oligosacáridos objetivos (Pérez-Escalante *et al.*, 2020). Uno de los OLH más sintetizado mediante esta ruta es la 2'FL en una reacción catalizada por una  $\alpha$  1,2-fucosiltransferasa intracelular, empleando GDP-fucosa como sustrato donador y lactosa como sustrato aceptor (Chin *et al.*, 2016; Chin *et al.*, 2017). Por otro lado, Lee *et al.* (2012) alcanzaron una concentración máxima de de 2'FL de 1.23 g/L cuando el DNA de la cepa de *E. coli* JM109 (DE3) fue modificado en un gen de *H. pylory*. Mientras que Baumgärtner *et al.* (2013) reportaron una productividad de 2'FL de 0.57 g.L/h empleando la cepa recombinante de *E. coli* JM109.

En años recientes, se han establecido nuevos procedimientos para la síntesis de 2'FL. Por ejemplo, Guan *et al.* (2018) llevaron a cabo la modificación del ciclo de Krebs de *E. coli* JM109 con lo que no sólo proporcionaron energía adicional para la síntesis de oligosacáridos, sino además evitaron la formación de subproductos de la glicólisis. Mediante este procedimiento, los autores reportaron productividades de 0.13, 0.06 y 0.019 g/Lh. Cabe resaltar, que mediante esta técnica se ha logrado una producción exitosa de otro tipo de OLH, tales como 3FL (Choi *et al.*, 2019), LNT (Baumgärtner *et al.*, 2013) y LNnT (Dong *et al.*, 2019).

## 2.6. Fucosidasas

Las  $\alpha$ -L-fucosidasas (E.C. 3.2.1.51) son exo-glicosidasas únicas que catalizan la eliminación de los residuos no reductores terminales de L-fucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3),  $\alpha$ -(1,4) o  $\alpha$ -(1,6) a oligosacáridos y sus conjugados (Saumonneau *et al.*, 2016).

De acuerdo con la base de datos de enzimas activas en carbohidratos (CAZy), las  $\alpha$ -L-fucosidasas se clasifican en cuatro familias: GH29, GH95, GH141 y GH151 (CAZy, 2020). Las fucosidasas pertenecientes a la familia GH29 hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -(1,2) de fucosa unida a galactosa o enlaces  $\alpha$ -(1,3),  $\alpha$ -(1,4), y  $\alpha$ -(1,6) unida a residuos de *N*-acetilglucosamina. Esta familia de enzimas muestra un mecanismo clásico de retención de la configuración anomérica, incluyendo un doble desplazamiento del enlace *O*-fucosil con dos residuos de aminoácidos que juegan un papel principal en la reacción: el ácido glutámico (Glu) actúa como ácido/base de Lewis, mientras que el ácido aspártico (Asp) actúa como nucleófilo (**Fig. 4**). El primer paso comienza con el Glu que actúa como ácido general asistiendo la hidrólisis del residuo de fucosa en el extremo no reductor del compuesto fucosilado, posteriormente el Asp realiza el ataque nucleofílico al carbono anomérico formando el intermediario glicosil-enzima (Sulzenbacher *et al.*, 2004; Zeuner *et al.*, 2014).

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos, así como su especificidad hacia el sustrato, las fucosidasas de la familia GH29 se dividen a su vez en las subfamilias A y B. La subfamilia A comprende fucosidasas que son menos específicas hacia el enlace del sustrato fucosilado, mientras que las fucosidasas de la familia B son más regio-específicas para enlaces  $\alpha$ -(1,3) o  $\alpha$ -(1,4) unidos a galactosa (Saumonneau *et al.* 2016; Shaikh *et al.* 2013; Zeuner *et al.*, 2018).

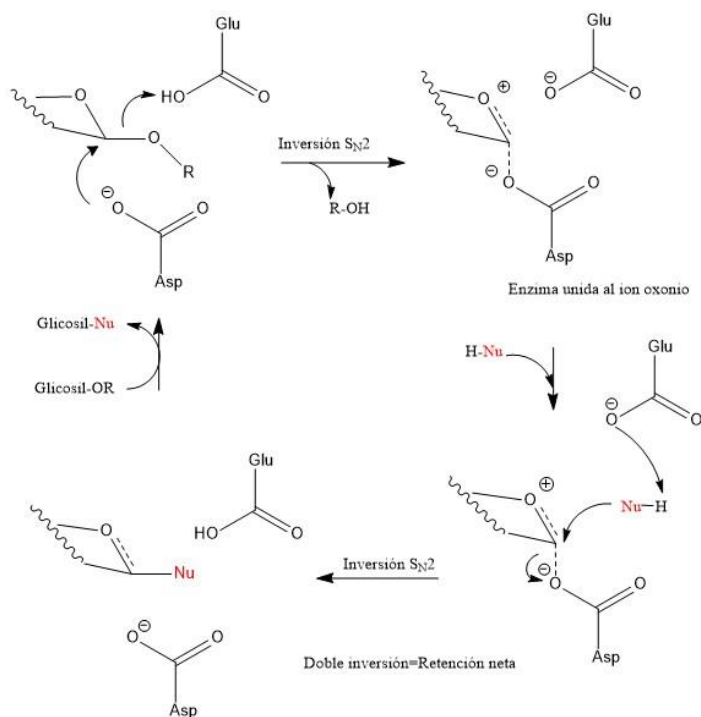


Fig. 4 Mecanismo catalítico de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de la familia GH29. OR: oligosacárido, Nu: Nucleófilo, R: Donador activado (Modificado de Faber, 2011).

Las fucosidasas de la familia GH95 comprenden un mecanismo de doble desplazamiento que envuelve la formación de un estado de transición similar al ión oxocarbenio con la subsecuente liberación del producto con una configuración anomérica invertida (**Fig. 5**) (Koval'ová *et al.*, 2019). La reacción es llevada a cabo con ayuda de dos aminoácidos clave ubicados en el sitio activo: el grupo carboxilo del aminoácido Glu actúa como ácido general, mientras que el Asp actúa como base general. Debido a las diferencias en el mecanismo de reacción, solo las fucosidasas de la familia GH29 son buenas candidatas para la síntesis de oligosacáridos fucosilados (Koval'ová *et al.*, 2019; Saumonneau *et al.*, 2016).

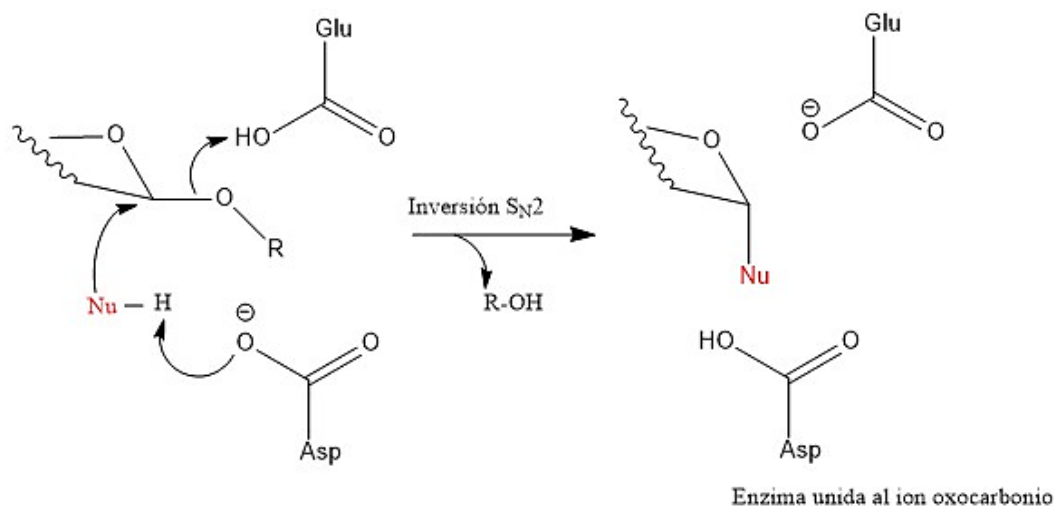


Fig. 5 Mecanismo catalítico de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de la familia GH95. Nu: Nucleófilo (Modificado de Faber, 2011).

El mecanismo de reacción de las  $\alpha$ -L-fucosidasas de las familias GH141 y GH151 aún no es muy conocido. Se ha reportado que la  $\alpha$ -L-fucosidasa BT1002 de *Bacteroides thetaiotaomicron* pertenece a la familia GH141, esta enzima presenta un mecanismo de reacción de doble desplazamiento donde dos residuos de Asp actúan como residuos catalíticos, el Asp<sup>523</sup> como nucleófilo y el Asp<sup>564</sup> como ácido/base general (Ndeh *et al.*, 2017). Por su parte, el primer reporte de la familia GH151 fue de una  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* ATCC 15697 (Sela *et al.*, 2012), posteriormente, también se reportó una  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Paenibacillus thiaminolyticus* que presentó un mecanismo de retención que infería una actividad de transglicosilación (Wan *et al.*, 2020).

### 2.6.1. $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*

*Thermotoga maritima* es una bacteria no formadora de esporas que presenta una forma redondeada, pertenece al orden de los *Thermotogales* y es una de las primeras bacterias hipertermófilas descubierta y aislada de un sedimento geotermal caliente en Vulcano, Italia. Esta bacteria presenta una temperatura óptima de crecimiento de 80 °C, además es capaz de metabolizar muchos azúcares simples y complejos entre los que se incluyen glucosa, sacarosa, almidón, celulosa, galactosa y xilano (Nelson *et al.*, 1999).

*T. maritima* representa la línea más ampliamente conocida de las eubacterias, además tiene uno de los genomas más pequeños en los organismos de vida libre (1.86Mpb) (Zhang *et al.*, 2015), posee una variedad de genes duplicados y repeticiones directas, lo que sugiere una inestabilidad potencial en su genoma (Singh *et al.*, 2015).

La  $\alpha$ -L-fucosidasa es una enzima presente en el gen TM036 del código genético de *T. maritima*. Posee 449 aminoácidos y tiene una masa molar de 52205 Da. Además, basado en su secuencia de aminoácidos, así como en su mecanismo de reacción, esta enzima se ubica dentro de la familia GH29 de acuerdo con la clasificación CAZy (Sulzenbacher *et al.*, 2004; Tarling *et al.*, 2003).

En comparación con otras fucosidasas de origen microbiano, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* comparte un 39% de identidad con la fucosidasa de *Lactobacillus casei*, 29% con la fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* y 35% con la de *Lactobacillus paracasei*. Así mismo, es la enzima microbiana más cercana a las  $\alpha$ -L-fucosidasas de mamíferos, compartiendo 38% de identidad de secuencia con su homóloga humana (Sulzenbacher *et al.*, 2004; Tarling *et al.*, 2003). Por otra parte, ha sido empleada con éxito en la síntesis de oligosacáridos fucosilados, por ejemplo, Lezyk *et al.* (2016) reportaron un rendimiento de 0.95% en la síntesis de 2'FL, mientras que un OLH fucosillactosa no identificado fue obtenido con un rendimiento de 1.25 %. Por otro lado, Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018a,b) reportaron un rendimiento de 6.04% en la síntesis de fucosillactosa en 3 h con base a la concentración de sustrato empleando 3.5mM *p*NP-Fuc y 146 mM D-Lactosa. Más aún, al adicionar 1.1 M de CaCl<sub>2</sub>, el rendimiento de síntesis de OLH aumentó a 12.48%.

### 2.6.1.1. Estructura de $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

La  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* es una proteína hexamérica de dos dominios con dimensiones de 75x65x55 Å (**Fig. 6**). El dominio N-terminal (residuos 7-359) adopta un plegamiento de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>, con 8 hebras  $\beta$  paralelas empaçadas alrededor de un eje central y rodeado por seis  $\alpha$ -hélices (Sulzenbacher *et al.*, 2004). Una pequeña bolsa formada por los extremos del carbono terminal de la hebra  $\beta$  del dominio ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> alberga el sitio activo, el tamaño de éste permite que un solo residuo de L-fucosa se una. El azúcar es fuertemente envuelto por la enzima y cada grupo funcional hace un contacto directo con una o más lados de la cadena, enfatizando el patrón de reconocimiento de un sustrato específico para L-fucosa. Esta fuerte interacción entre la enzima y la L-fucosa deja apenas algún espacio para modificaciones potenciales o para subsecuentes modificaciones (Sulzenbacher *et al.*, 2004). Sin embargo, mutaciones en esta enzima ha permitido limitar su actividad hacia transferencia e inhibir su actividad hidrolítica. En 2007 Osanjo *et al.* (2007) modificaron la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* hacia una transfucosidasa, dicha modificación permitió obtener una mejora en la obtención de los productos de transglicosilación

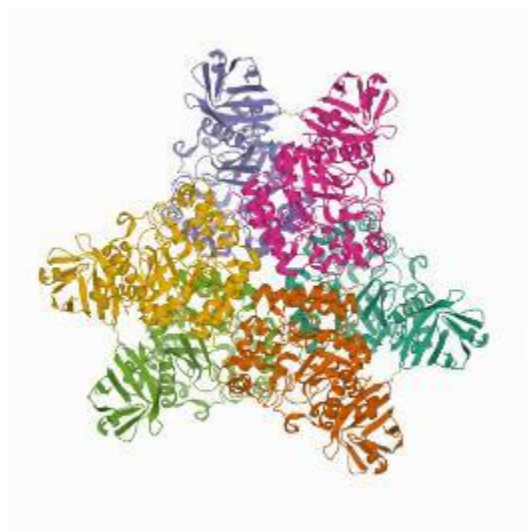


Fig. 6 Vista general de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* representada en forma de diagrama de cinta (RCSB-PDB, 2021).

## 2.7. Parámetros que influyen en el rendimiento de síntesis enzimática de fuco-oligosacáridos

Las reacciones de hidrólisis y de transglicosilación ocurren simultáneamente en el mismo sitio activo de las fucosidasas, de ahí el reto en una producción elevada de oligosacáridos (Abdul-Manas *et al.*, 2018). La síntesis de oligosacáridos fucosilados puede llevarse a cabo mediante reacciones de transglicosilación cinéticamente controladas, por lo que, al emplear glucosidasas es necesario identificar las condiciones ideales en la síntesis de OLH (Zeuner *et al.*, 2014; Abdul-Manas *et al.*, 2018).

### 2.7.1. Especificidad y selectividad

La selectividad anomérica de las glucosidasas es absoluta porque está determinada por el mecanismo de reacción. Las fucosidasas poseen una elevada selectividad para el sustrato donador y así como para las moléculasceptoras. La regioselectividad en la formación de producto varía de enzima a enzima y depende de las estructuras de las moléculas donadoras yceptoras. Esta selectividad puede ser ajustada mediante el uso de cosolventes o ingeniería de proteínas (Zeuner *et al.*, 2014).

### 2.7.2. Especificidad del donador

En las reacciones de transglicosilación, el donador del glicosilo debe cumplir ciertas características como: reaccionar rápidamente para mantener tiempos de reacción cortos (con la finalidad de prevenir la hidrólisis del producto) y poseer en su estructura un grupo donador activado,

por ejemplo, mono o disacáridos, un grupo nitrofenil e incluso algunos halógenos (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013; Zeuner *et al.*, 2014). Entre los donadores activados comúnmente empleados en la síntesis de fucooligosacáridos se encuentran el *para*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido (*p*NP-Fuc), y el  $\alpha$ -L-fucosil fluoruro, sin embargo este último es químicamente inestable y su degradación espontánea resulta en rendimientos relativamente bajos (Petschacher & Nidetzky, 2016).

### 2.7.2.1. *para*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido

El *para*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido (*p*NP-Fuc) (**Fig. 7**) es un sustrato donador glicosil activado. Es poco soluble en agua, pero soluble en etanol, dimetil sulfóxido (DMSO) y dimetil formamida (DMF). Además, produce un cromóforo amarillo, por lo que es empleado en ensayos colorimétricos para medir la actividad de las  $\alpha$ -L-fucosidasas (Dicioccio *et al.*, 1982; Research Products International, 2017).

Diversos autores han reportado la síntesis de oligosacáridos fucosilados empleando *p*NP-Fuc como sustrato donador. Lezyk *et al.* (2016) reportaron un rendimiento de 0.95% en la síntesis de 2'-FL empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T.maritima*. Asimismo, un producto fucosilado no identificado fue sintetizado con un rendimiento de 1.25% al emplear una  $\alpha$ -L-fucosidasa denominada Mfuc5. Por otro lado, Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018a) reportaron un rendimiento de 6.04% en la síntesis de un trisacárido fucosilado empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T.maritima*, además con la adición de CaCl<sub>2</sub> (1.1 M) el rendimiento en la síntesis del trisacárido aumentó a 12.48% (Guzmán-Rodríguez *et al.* 2018b). Mientras que Escamilla-Lozano *et al.* (2019) reportaron un rendimiento de 21% en la síntesis de un trisacárido fucosilado en una reacción catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG.

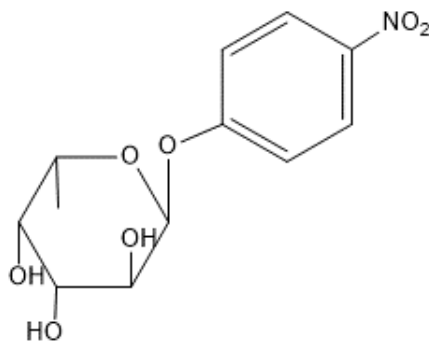


Fig. 7 *para*-Nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido.

### 2.7.3. Especificidad del aceptor

En general las  $\alpha$ -L-fucosidasas muestran una elevada especificidad hacia los aceptores. Se ha sugerido que la presencia de residuos de aminoácidos aromáticos en el sitio de unión del aceptor +2 induce una preferencia a los monosacáridos o en particular a los *p*NP-monosacáridos. De hecho, los monosacáridos (*N*-sustituidos) o sus derivados metilos, *p*NP o alilos, son los aceptores comúnmente

empleados en las reacciones de transfucosilación (Petschacher & Nidetzky, 2016). Además, algunos productos de reacción han sido empleados como moléculas aceptoras con la finalidad de sintetizar oligosacáridos más complejos. Por ejemplo, Sakurama *et al.* (2012) llevaron a cabo la síntesis de lactodifucotetraosa empleando 2'-FL como sustrato aceptor en una reacción catalizada por una  $\alpha$ -L-fucosidasa *Bifidobacterium bifidum*, mientras que Zeuner *et al.* (2018) reportaron la síntesis de lacto-N-difucopentaosa II con rendimientos de 13% y 39 % en una reacción catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa *Bifidobacterium bifidum* y *Clostridium perfringens* expresada en *E. coli* empleando 3-FL como sustrato aceptor.

#### 2.7.4. Actividad de agua

La actividad de agua ( $a_w$ ) es un parámetro termodinámico que mide la cantidad de agua disponible en un medio de reacción. Puede ser empleada para medir la capacidad del agua y participar en una reacción catalizada por una enzima, donde una  $a_w$  de 1 es para un sistema donde únicamente hay agua, mientras que una  $a_w$  de 0 refleja un sistema anhidro (Gosling *et al.*, 2011).

Diversos reportes señalan una baja actividad enzimática de las glicosil-hidrolasas en medios de reacción con poca concentración de agua con un incremento en su actividad conforme el contenido de agua aumenta (Lang *et al.*, 2006), esto es debido a que algunas moléculas de agua unidas a la enzima tienen funciones como mantener su conformación estructural, por lo tanto, si estas moléculas de agua son retiradas la enzima pierde su actividad (Adlercreutz, 2017). Sin embargo, con base en la Ecuación 1, se observa que el rendimiento de productos de transglicosilación puede incrementar si aumenta la concentración de los sustratos o si se disminuye el contenido de agua, guardando una relación inversamente proporcional entre concentración de sustratos y contenido de agua (Kasche, 1986).

$$[AN] = K_{app} \frac{[AOH][NH]}{[H_2O]} \dots \dots \text{Ecuación 1}$$

Donde:

*AN*: Producto de la reacción.

$K_{app}$ : Constante de equilibrio aparente y está en función del pH, temperatura, fuerza iónica y composición del solvente.

*AOH* y *NH*: Concentración de sustrato donador y aceptor; el rendimiento de reacción puede incrementar si se aumenta la concentración de los reactantes.

$H_2O$ : Concentración de agua en el sistema de reacción

Algunos estudios han reportado un aumento en los rendimientos de transglicosilación al adicionar cosolventes orgánicos miscibles en agua al medio de reacción, debido a que se reduce el grado de competencia entre la reacción de hidrólisis sobre la reacción de transglicosilación, además, ayuda a la disolución de sustratos hidrofóbicos (Bridiau *et al.*, 2010).

Los cosolventes afectan la  $a_w$  de la mezcla de reacción, así como la selectividad de la enzima para los nucleófilos competidores, los cuales son, el aceptor deseado y el agua. Existen algunas controversias sobre el mecanismo por el cual los cosolventes alteran la selectividad de la enzima, pero



en un principio se piensa que el aumento en los rendimientos se debe a alteraciones en la estructura secundaria y terciaria de la enzima (Zeuner *et al.*, 2014).

#### 2.7.4.1. Efecto de los solventes en las reacciones de transglicosilación

La elección del medio de reacción afectará tanto la enzima como el sustrato y puede tener un efecto profundo en el resultado de la reacción, ya sea induciendo un cambio conformacional que afecte la dinámica enzimática, actuando como inhibidor o modificando las propiedades del sustrato (Fransson, 2008).

Como se observó en la **Fig. 3.** al disminuir el contenido de agua en reacciones con fucosidasas, es posible favorecer la actividad de síntesis sobre la de hidrólisis, siendo una opción atractiva la introducción de solventes orgánicos adecuados (Yoon & Rhee, 2000). Estos solventes deben cubrir algunas características como: ser miscibles en agua para que puedan modificar la actividad termodinámica del agua, tener propiedades fisicoquímicas cercanas a las del agua y sobre todo no deben tener un grupo hidroxilo que pueda ser fucosilado debido a que podrían convertirse en un sustrato para la enzima (Bridiau *et al.*, 2010).

A pesar de que los solventes con una alta polaridad frecuentemente causan la desactivación de la enzima en las síntesis de oligosacáridos (Yoon & Rhee, 2000), se han reportado muchas aplicaciones exitosas de transglicosilación catalizadas con glucosidasas. Por ejemplo Svensson (1990) evaluaron la estabilidad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de hígado porcino en DMSO, DMF y acetonitrilo, presentando una mayor estabilidad hasta en un 30% de DMSO en comparación con los otros solventes. Por otro lado, Ajisaka *et al.* (1998) sintetizaron  $\alpha$ -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 3)-D-GlcNAc con las  $\alpha$ -fucosidasas de *Aspergillus niger* y de *Penicillium multicolor* en DMSO, DMF y dioxano, obteniendo el máximo rendimiento (58%) con la fucosidasa de *P. multicolor* en DMSO. Mientras que Cruz-Guerrero *et al.* (2006) aumentaron el rendimiento en la síntesis de galactooligosacáridos (GOS) en un medio con acetona empleando una  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica. De forma similar, Vera *et al.* (2017) determinaron un aumento en la síntesis de hexil- $\beta$ -galactósido con acetona como cosolvente, en una reacción catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, mientras que en un estudio posterior reportaron un aumento en la síntesis de butil- $\beta$ -D-galactósido en un sistema acetona:1-butanol:agua empleando una  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Ahumada *et al.*, 2020).

## 2.8. Métodos computacionales

Los métodos computacionales han permitido combinar los datos experimentales con la representación detallada de diferentes mecanismos obtenidos mediante modelos *in silico* para predecir y ayudar a enriquecer la interpretación de los fenómenos biológicos. Dentro de los métodos computacionales empleados para correlacionar datos experimentales con los obtenidos por modelos *in silico* se encuentran las simulaciones de dinámica molecular (DM), acoplamiento molecular, simulaciones Monte Carlo, entre otros. (Cárdenas *et al.*, 2020; Maximova *et al.*, 2016).

El interés por interpretar la actividad enzimática a nivel estructural ha llevado a la implementación de técnicas que combinen datos experimentales con modelos teóricos. Por ejemplo, Klontz *et al.* (2020) evaluaron mediante DM el efecto de las mutaciones sobre la estructura conformacional de una  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Lactobacillus casei*, mientras que Liu *et al.* (2020)

determinaron mediante DM el efecto de la temperatura en la estructura y dinámica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Bacteroides fragilis* NCTC9343. Por su parte, Pérez-Escalante *et al.* (2020) evaluaron mediante acoplamiento molecular la actividad hidrolítica y de transglucosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

### 2.8.1. Dinámica molecular (DM)

La simulación DM es la herramienta más destacada empleada en la simulación del comportamiento de biomoléculas ya que permite caracterizar los movimientos estructurales, de flexibilidad, mecanismo de las enzimas, además de ayudar a tener una visión más clara de su relación estructura-función (Azam *et al.* 2012; Konar *et al.* 2019). Esta técnica establece flexibilidad tanto en la molécula de interés (ligando) como en el blanco molecular (receptor) de manera más efectiva que otros algoritmos. Sin embargo, presenta la desventaja de ser un método laborioso y tardado ya que la DM progresa en pasos cortos (Meng *et al.*, 2011).

El fundamento básico de una simulación de DM es en realidad sencillo. A partir de las posiciones de cada uno de los átomos en un sistema biomolecular (por ejemplo, una proteína rodeada de agua), se puede calcular la fuerza ejercida sobre cada átomo por cada uno de los demás átomos. Por lo tanto, se pueden utilizar las leyes del movimiento de Newton para predecir la posición espacial de cada átomo en función del tiempo. En particular, conforme se avanza en el tiempo, se van calculando repetidamente las fuerzas en cada átomo y luego usando esas fuerzas para actualizar la posición y velocidad de cada átomo. La trayectoria resultante es, en esencia, una película tridimensional que describe la configuración a nivel atómico del sistema en cada punto durante el intervalo de tiempo simulado (Hollingsworth & Dror, 1999).

Dentro de los *softwares* de DM más populares se encuentran GROMACS y NAMD, los cuales han sido compatibles con la interfaz de transmisión de (MPI) durante mucho tiempo. Si es posible utilizar una gran cantidad de núcleos de computadora simultáneamente, los MPI pueden reducir el tiempo de cálculo significativamente (Hospital *et al.*, 2015). Mediante el uso de simulaciones de DM es posible representar una gran variedad de procesos enzimáticos tales como: cambios conformacionales, unión de sustratos y fenómenos de plegamiento o desnaturalización de las proteínas. Cabe destacar que dichas simulaciones pueden además predecir cómo estas biomoléculas responden (a nivel atómico) a ciertos cambios, por ejemplo: mutaciones, fosforilación, adición o eliminación de un ligando, así como perturbaciones en su medio como cambios en su protonación o variaciones de temperatura (Hollingsworth & Dror, 1999). Recientemente, Jana *et al.* (2020) realizaron una DM empleando el software GROMACS para determinar el efecto de la temperatura en la estructura de distintas enzimas provenientes de organismos mesofílicos y termofílicos. Por su parte, Konar *et al.* (2019) empleando el software NAMD 2.9, evaluaron el efecto de la concentración de glucosa (ligando) en la estructura de una  $\beta$ -glucosidasa de *Halothermotrix orenii* (receptor).

#### 2.8.1.1. Programas de dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) calculan trayectorias atómicas resolviendo ecuaciones de movimiento mediante el uso de campos de fuerza empíricos que se aproximan a la

fuerza atómica real en los sistemas de biopolímeros (como el campo de fuerza CHARMM). Para realizar simulaciones de DM, se han desarrollado varios programas informáticos. Sin embargo, la simulación de los movimientos/interacciones de moléculas grandes demanda una enorme potencia de cálculo, lo que requiere el uso de computadoras en paralelo. En los últimos años, las computadoras paralelas con memoria distribuida han estado ofreciendo una potencia computacional rentable (Phillips *et al.*, 2020).

#### **2.8.1.1.1. Software NAMD**

NAMD llamado así por su nombre en inglés “Not (just) Another Molecular Dynamics program” es un *software* gratuito desarrollado por el grupo biofísico teórico y computacional de la Universidad de Illinois. Este software ha sido diseñado para funcionar de manera eficiente en computadoras que funcionan en paralelo, lo que le permite simular moléculas grandes con relativa facilidad. Además, NAMD se adapta particularmente bien a los clústeres de PC de clase *Beowulf* (cada vez más populares) y que son bastante similares a los clústeres de estaciones de trabajo para los que se diseñó originalmente. Para mejorar la eficiencia, NAMD incluye un motor de secuencias de comandos, que permite la automatización de muchas tareas, además, permite visualizar las simulaciones empleando programas de visualización molecular, sin embargo, NAMD permite el uso de pocos campos de fuerza como AMBER, CHARMM y OPLS (Kass *et al.*, 2011; Phillips *et al.*, 2020).

### **2.8.2. Acoplamiento molecular**

La técnica de acoplamiento molecular es un método computacional cuyo objetivo es buscar la forma en que un ligando potencial se une a un blanco molecular, así como la afinidad de unión más probable, es decir, la que requiera una menor energía (por que la unión es más fuerte). Además, esta herramienta es capaz de proporcionar resultados de forma relativamente rápida y económica en comparación con las técnicas experimentales (Scior *et al.*, 2007).

La técnica de acoplamiento molecular por lo general emplea dos algoritmos por separado. El primero consiste en un algoritmo de muestreo, el cual predice las configuraciones o conformaciones estructurales que puede asumir el ligando dentro del dominio o sitio activo del blanco. El segundo algoritmo, emplea una función de puntuación para predecir las energías libres de unión entre el ligando y el receptor en cada una de las configuraciones que se establecieron en el primer algoritmo. Finalmente, las configuraciones de unión ligando-receptor son jerarquizadas con base en sus energías de unión (Ballón & Grados, 2019).

#### **2.8.2.1. Programas de acoplamiento molecular**

Los programas de acoplamiento molecular emplean un algoritmo de búsqueda que evalúa la conformación del ligando repetidamente hasta obtener la energía mínima de afinidad de unión. Finalmente, se emplea una función de puntuación de afinidad,  $\Delta G$  (energía potencial total en

kcal/mol), para clasificar las posibles conformaciones que el ligando puede adoptar dentro del sitio activo del receptor, definido como la suma de las energías electrostática y de van der Waals.

En los últimos años se han desarrollado más de 60 programas diferentes tanto de uso comercial como académico, entre ellos se encuentran AutoDock, GOLD, FlexX, AutoDock Vina, entre muchos otros (Pagadal *et al.*, 2017).

### 2.8.2.1.1 AutoDock

En un inicio, AutoDock fue desarrollado en una era en la que los recursos computacionales eran prohibitivamente caros y relativamente primitivos, sin embargo, este programa ha ido evolucionado con el paso de los años para ser más confiables y fáciles de usar. Un avance notable de AutoDock es el conjunto de *scripts* y programas de Python llamados MGLTools que facilitan y automatizan los flujos de trabajo necesarios en la realización de muchos cálculos de acoplamiento simultáneos. Para mejorar el uso de AutoDock, los investigadores han desarrollado interfaces gráficas de usuario (GUI) que automatizan la administración y el envío de trabajos para el cálculo de acoplamiento molecular (Jacob *et al.*, 2012). AutoDock ha demostrado ser una herramienta eficaz capaz de predecir con rapidez y precisión las conformaciones ligando-receptor así como las energías de unión, además, ofrece ciertas ventajas como un protocolo de acoplamiento rígido o flexible (receptor) e implementaciones eficientes del algoritmo genético Lamarckiano (LGA) para buscar la postura del ligando con la mayor afinidad de unión (Morris *et al.*, 2009).

Autodock es un programa frecuentemente usado para predecir las conformaciones que puede adoptar un sustrato (ligando) dentro del sitio activo de una enzima (receptor). Por ejemplo, Pérez-Escalante *et al.* (2020) evaluaron las interacciones moleculares de distintos sustratos fucosilados en complejo con la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*, así como el efecto del complejo enzima-sustrato en la actividad de transfucosilación de la misma. Asimismo, Klontz *et al.* (2020) determinaron la interacción de diferentes compuestos fucosilados en el sitio activo de la  $\alpha$ -L-fucosidasa *Lactobacillus casei*.

## 3. Corolario

Debido a los beneficios que los OLH proporcionan a la salud de los infantes, hay un creciente interés en mejorar e innovar técnicas en la síntesis de estos azúcares, los cuales incluyen procedimientos enzimáticos, químicos o fermentativos. Dentro de los procedimientos enzimáticos se han obtenido resultados prometedores empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, la cual, es una glicosil hidrolasa que, de acuerdo a la clasificación CAZy pertenece a la familia GH29 y posee un mecanismo de acción que la hace capaz de llevar a cabo la síntesis de compuestos fucosilados. Debido a que Las reacciones de hidrólisis y de transglicosilación ocurren simultáneamente en el mismo sitio activo de las fucosidasas, existe el reto de obtener una producción elevada de oligosacáridos por lo cual es necesario realizarla en un medio de reacción con condiciones controladas entre las que destacan, el tipo y concentración de sustrato donador, así como la  $a_w$  presente en el medio de reacción. Sumado a los procedimientos *in vitro*, se ha implementado técnicas *in silico* que permitan enriquecer y entender a nivel molecular los fenómenos biológicos que suceden durante la síntesis de OLH. Dentro de estas técnicas *in silico*, se encuentran las dinámicas moleculares. Estas permiten caracterizar los movimientos estructurales, de flexibilidad, mecanismo de las enzimas, además de ayudar a tener una

visión más clara de su relación estructura-función. Por otro lado, se encuentra la técnica de acoplamiento molecular, la cual busca la forma en que un ligando potencial se une a un blanco molecular, así como la afinidad de unión más probable, es decir, la que requiera una menor energía (por que la unión es más fuerte). Dada la importancia de estos OLH se ha buscado combinar las técnicas *in vitro* e *in silico* con la finalidad de implementar un procedimiento que permita obtener una alta productividad de este tipo de carbohidratos.

## 4. Objetivo general

Estudiar el efecto del pH, temperatura y  $a_w$  en la síntesis de oligosacáridos fucosilados empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* en medios convencionales y no convencionales.

### 4.1. Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del pH y la temperatura en la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.
2. Evaluar el efecto de la  $a_w$  en la síntesis de oligosacáridos fucosilados
3. Establecer las condiciones de reacción óptimas (pH, temperatura y  $a_w$ ) para la síntesis de oligosacáridos fucosilados.
4. Evaluar el efecto de la temperatura en la estructura secundaria de la  $\alpha$ -L-fucosidasa y en la formación del complejo enzima-sustrato mediante estudios *in silico*.

## 5. Hipótesis

Al disminuir la actividad de agua del medio de reacción se favorecerá la actividad de transglicosilación sobre la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* con lo cual aumentará el rendimiento de síntesis de oligosacáridos fucosilados.

## 6. Justificación

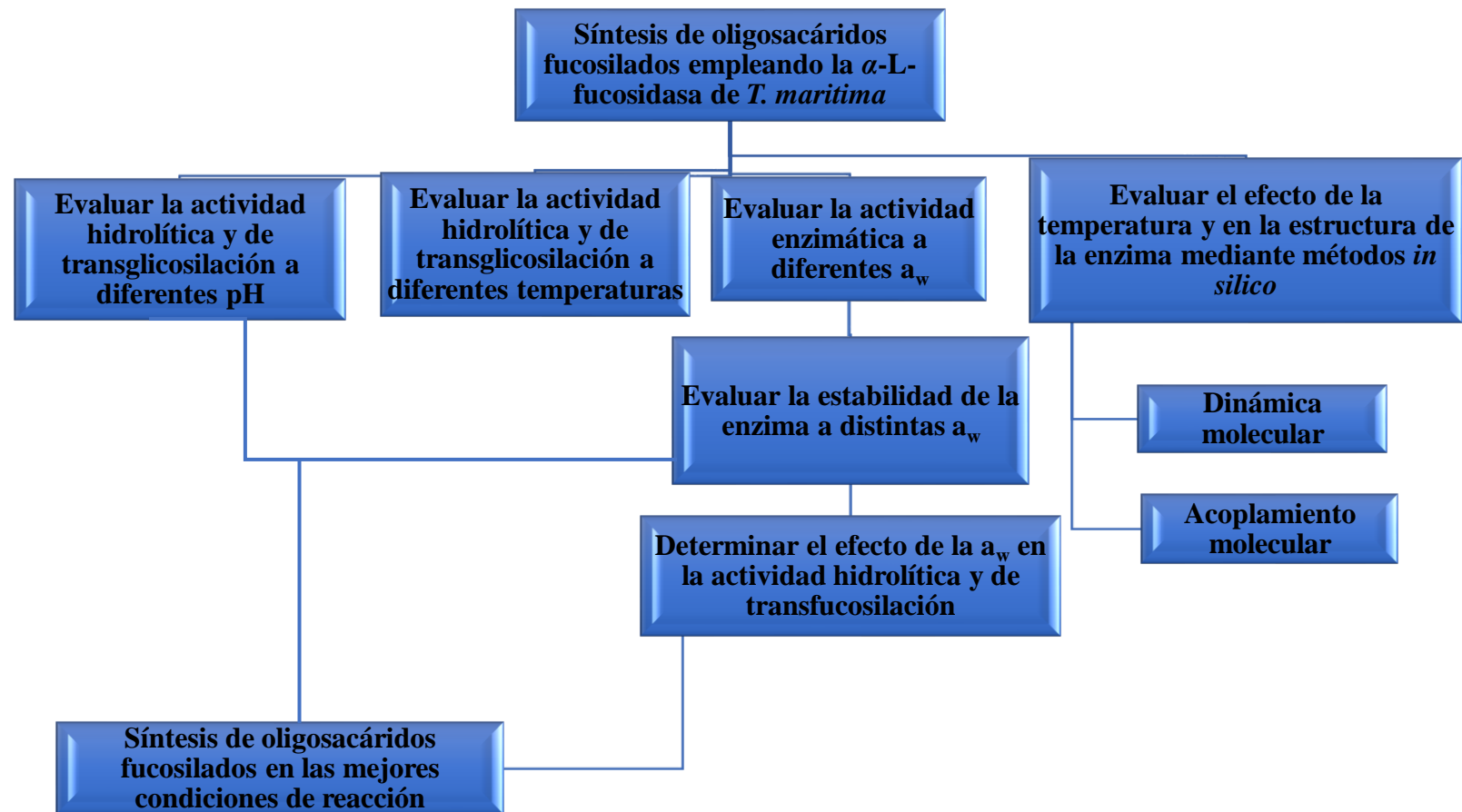
Los OLH son carbohidratos complejos no conjugados que son altamente abundantes en la leche humana pero no en las fórmulas infantiles. Dentro de los OLH se encuentran los oligosacáridos fucosilados, los cuales presentan diversas propiedades benéficas como actividad prebiótica, anti-infecciosa, modulador de la respuesta de las células epiteliales intestinales, inmunomodulador y además son una fuente importante de nutrientes para el desarrollo del cerebro.

La síntesis química de oligosacáridos fucosilados requiere pasos de protección y desprotección selectiva de los grupos hidroxilo de los carbohidratos, así como la activación del carbono anomérico. En contraste, la síntesis enzimática puede proveer regio y estereoselectividad en los productos sin ningún paso de protección o activación en la reacción.

En la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se ha llevado a cabo la síntesis de oligosacáridos fucosilados catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* en medio acuoso, empleando *p*NP-Fuc como sustrato donador (el cual es poco soluble en medio acuoso) y altas concentraciones de lactosa como sustrato aceptor.

Con la finalidad de estimular la actividad de transfucosilación sobre la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa es necesario disminuir la actividad de agua del medio de reacción, siendo una opción atrayente la adición de solventes orgánicos miscibles en agua. La justificación de este proyecto es encontrar las condiciones de reacción que permitan favorecer la actividad de transglicosilación sobre la hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* para obtener la mayor producción de oligosacáridos fucosilados.

## 7. Plan general de trabajo





## 8. Materiales y métodos

### 8.1. Efecto del pH en la actividad hidrolítica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

La actividad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa fue determinada en el intervalo de pH de 5-10 monitoreando la reacción cada 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 5 min. La reacción se llevó a cabo adicionando 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (0.065 U/mL; Megazyme, Irlanda) a 400  $\mu$ L de *p*NP-Fuc (3.5 mM) en regulador de fosfatos (0.1 M). La reacción se incubó a 60 °C con agitación constante en una incubadora con agitación orbital (Combi SV-12 Fine PCR, Korea). La reacción se detuvo adicionando 50  $\mu$ L de NaOH (J.T. Baker) 1M. El *p*NP liberado se cuantificó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800, Japón) a 410 nm interpolando el valor en una curva estándar de *p*NP (**Anexo 13.1**). Una unidad de  $\alpha$ -L-fucosidasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de *p*NP por minuto.

### 8.2. Efecto del pH en la actividad de transglucosilación de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

El efecto del pH en la síntesis de oligosacáridos fucosilados fue evaluada como se describió anteriormente para la actividad hidrolítica (**Sección 7.1**), con la diferencia de que se adicionó D-lactosa (438 mM) al medio de reacción. La reacción se incubó a 60 °C durante 60 min analizando el progreso de la reacción a 10, 20, 40 y 60 min. La reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu$ L de NaOH (1 M). Los oligosacáridos fucosilados se cuantificaron como se describe en la sección **“7.10. Cuantificación de oligosacáridos fucosilados”**

### 8.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad hidrolítica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

La actividad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa se determinó en un intervalo de temperatura de 60-95 °C. La reacción se realizó adicionando 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (0.065 U/mL) a 400  $\mu$ L de *p*NP-Fuc (3.5 mM) en regulador de fosfatos (0.1 M a pH 8). La mezcla de reacción fue incubada por 15 min con agitación constante en un baño con recirculación. La reacción fue monitoreada cada minuto durante 15 min deteniendo la reacción mediante la adición de 50  $\mu$ L de NaOH (1 M). El *p*NP liberado se cuantificó en un espectrofotómetro a 410 nm.

Además, se determinó la energía de activación ( $E_a$ ) de la reacción de hidrólisis. Para ello se obtuvo el diagrama de Arrhenius graficando el logaritmo natural de la velocidad inicial (ordenada) contra el inverso de la temperatura ( $1/T$ ). Finalmente, la  $E_a$  fue calculada empleando la ecuación de Arrhenius expresada en las ecuaciones 2 y 3:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \dots \dots \dots \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$k$ = Constante de velocidad de la reacción.

$A$ = Factor pre-exponencial.

$E_a$  = Energía de activación de la reacción.

$R$ = Constante universal de los gases (1.987 kcal/mol.K).

$T$ =Temperatura.

$$Ea = - mR \dots \dots \dots \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$m$ = pendiente.

$R$ = constante universal de los gases (1.987 kcal/mol K).

#### **8.4. Efecto de la temperatura en la actividad de transglicosilación de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. marítima***

El efecto de la temperatura en la síntesis de oligosacáridos fucosilados se evaluó como se describió anteriormente para la actividad hidrolítica con la excepción de que se adicionó D-lactosa (438 mM) al medio de reacción. La reacción se incubó durante 60 minutos con agitación orbital constante y fue monitoreada a 10, 20, 40 y 60 min deteniendo la reacción mediante la adición de 50  $\mu$ L de NaOH (1 M). Los oligosacáridos fucosilados se cuantificaron como se describe en la sección “**7.10. Cuantificación de oligosacáridos fucosilados**” Además, la  $E_a$  de la reacción de transglicosilación fue calculada como se describió en la sección 7.3.

#### **8.5. Termo-estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. marítima***

La estabilidad térmica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa se evaluó a 90 y 95 °C durante 120 min monitoreando la reacción cada 30 min. Para ello se incubaron viales con 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -L-fucosidasa (0.0065 U/mL) en regulador de fosfatos (0.1 M pH 8). Para cada intervalo de tiempo, la reacción se detuvo colocando el vial en un baño de hielo durante 1 min, posteriormente se tomaron alícuotas 50  $\mu$ L y se adicionaron a 450  $\mu$ L de *p*NP-Fuc (3.5 mM) para determinar la actividad hidrolítica de la enzima. La cantidad de *p*NP liberado fue directamente cuantificado en una celda espectrofotométrica a 60 °C durante 10 min a 410 nm. La actividad hidrolítica residual (*AR*) se determinó de acuerdo con la *Ecuación 4*.

$$AR (\%) = \frac{AH_T}{AH_C} \times 100 \dots \dots \text{Ecuación 4}$$

Donde:

AH<sub>T</sub>: Actividad de la enzima térmicamente tratada.

AH<sub>C</sub>: Actividad de la enzima sin tratamiento térmico (control).

## 8.6. Estimación de la a<sub>w</sub> en el sistema de reacción Agua:Solvente

La estimación de la actividad de agua en el sistema de reacción Agua:Solvente se realizó siguiendo las metodologías propuestas por Bell *et al.* (1997) y García-Garibay *et al.* (2000). El primer paso para estimar la a<sub>w</sub> en función de la concentración de agua consistió en calcular los valores intermedios agua-solvente (A<sub>ws</sub>) y solvente-agua (A<sub>sw</sub>) a partir de los coeficientes de Wilson.

$$A_{ws} = \frac{V_s}{V_w} \exp\left(\frac{-(\lambda_{ws} - \lambda_{ww})}{RT}\right) \dots \dots \text{Ecuación 5}$$

$$A_{sw} = \frac{V_w}{V_s} \exp\left(\frac{-(\lambda_{sw} - \lambda_{ss})}{RT}\right) \dots \dots \text{Ecuación 6}$$

Donde:

V<sub>s</sub>= Volumen molar del solvente.

V<sub>w</sub>= Volumen molar del agua (18 mL/mol).

λ<sub>ws</sub>- λ<sub>ww</sub>= Coeficiente de Wilson del agua (-1,175 J/mol).

λ<sub>sw</sub>- λ<sub>ss</sub>= Coeficiente de Wilson del solvente.

R= Constante universal de los gases 8.314 J/mol K.

T= Temperatura de reacción (K).

A partir de los valores intermedios obtenidos en las ecuaciones anteriores y la fracción molar del solvente se calculó el coeficiente de actividad de agua (δ<sub>w</sub>) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\ln \delta_w = -\ln(X_w X_s) + X_s \left( \frac{A_{ws}}{X_w + A_{ws} X_s} - \frac{A_{sw}}{X_s + A_{sw} X_w} \right) \dots \dots \text{Ecuación 7}$$

Donde:

X<sub>w</sub>= Fracción molar del agua.

X<sub>s</sub>= Fracción molar del solvente.

$$X_s = 1 - X_w \dots \dots \text{Ecuación 8}$$

Finalmente, con el coeficiente de actividad de agua y la fracción molar del agua se estimó la  $a_w$ .

$$a_w = \delta_w \cdot X_w \dots \dots \text{Ecuación 9}$$

### 8.7. Efecto de la $a_w$ en la estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

La estabilidad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* en medio de reacción con acetona ( $a_w$  0.97) acetonitrilo ( $a_w$  0.96) o DMSO ( $a_w$  0.99) se evaluó durante 180 min (en intervalos de 30 min) a 60 °C. Para cada tiempo de muestreo se preparó un microtubo con 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -L-fucosidasa (0.013 U/mL), 10  $\mu$ L de solvente y 40  $\mu$ L de regulador de fosfatos (0.1 M pH 8). Para cada intervalo de tiempo, la reacción se detuvo colocando el vial en un baño de hielo durante 1 min. La AR de la enzima se determinó mediante la adición de 50  $\mu$ L de la mezcla anterior a 450  $\mu$ L de pNP-Fuc (3.5 mM). La cantidad de pNP liberado fue directamente monitoreado en una celda espectrofotométrica a 60 °C durante 10 min a 410 nm. La AR se calculó de acuerdo con la *Ecuación 10*.

$$AR (\%) = \frac{AH_S}{AH_C} \times 100 \dots \dots \text{Ecuación 10}$$

Donde:

$AH_S$ : Actividad de la enzima en presencia del solvente

$AH_C$ : Actividad de la enzima en ausencia del solvente (control)

### 8.8. Efecto de la $a_w$ en la actividad hidrolítica de $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

El efecto de la  $a_w$  sobre la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa se evaluó a pH 8 y 60 °C durante 10 min, monitoreando la reacción cada 1 min. Para ello se prepararon viales que contenían 150  $\mu$ L de pNP-Fuc (10.5 mM), 50  $\mu$ L de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (0.0065 U/ mL), distintos volúmenes de DMSO, acetona y acetonitrilo (10-50%, v/v) y regulador de fosfatos (0.1 M, pH 8) hasta alcanzar un volumen final de 450  $\mu$ L (**Tabla 5**). La concentración final de pNP-Fuc en el medio fue 3.5 mM.

Para cada intervalo de tiempo se enfrió el vial en un baño de hielo con la posterior adición de 50  $\mu$ L NaOH (1 M). La actividad hidrolítica se determinó espectrofotométricamente mediante la liberación de pNP, la AR se calculó de acuerdo con la *Ecuación 11*.

$$AR (\%) = \frac{AH_S}{AH_C} \times 100 \dots \dots \text{Ecuación 11}$$

Donde:

$AH_S$ : Actividad hidrolítica de la enzima en presencia del solvente.

$AH_C$ : Actividad hidrolítica de la enzima en ausencia del solvente.

Tabla 5. Valores estimados de  $a_w$  a diferentes concentraciones de solventes.

Solvente ( $\mu\text{L}$ )	Regulador ( $\mu\text{L}$ )	$a_w$ Acetona	$a_w$ Acetonitrilo	$a_w$ DMSO
50	400	0.97	0.96	0.99
100	350	0.95	0.93	0.96
150	300	0.93	0.91	0.91
200	250	0.91	0.90	0.83
250	200	0.90	0.88	0.74

### 8.9. Efecto de la $a_w$ en la actividad de transglicosilación

El efecto de la  $a_w$  en la actividad de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa se determinó a 60 °C y pH 8 durante 180 min, en presencia de acetona ( $a_w$  0.97), acetonitrilo ( $a_w$  0.96) y DMSO ( $a_w$  0.99). La mezcla de reacción consistió en 50  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (0.0065 U/mL), 50  $\mu\text{L}$  del solvente correspondiente, 200  $\mu\text{L}$  de regulador de fosfatos (0.1 M), 150  $\mu\text{L}$  de *p*NP-Fuc (3.5 mM) y D-Lactosa (438 mM). La concentración final de *p*NP en el medio fue 3.5 mM.

El progreso de la reacción se monitoreo cada 30 min enfriando el vial en un baño de hielo durante un minuto previo a la adición de 50  $\mu\text{L}$  de NaOH (1M). Los oligosacáridos fucosilados sintetizados fueron monitoreados mediante HPLC como se describe en la siguiente sección. El *p*NP liberado se midió espectrofotométricamente a 410 nm. La tasa de transglicosilación/hidrólisis ( $r_{T/H}$ ) se determinó como la relación de la concentración de oligosacáridos fucosilados sintetizados entre la concentración de *p*NP liberado.

### 8.10. Cuantificación de oligosacáridos fucosilados mediante HPLC.

La cuantificación de oligosacáridos fucosilados y fucosa liberada se realizó mediante HPLC (Lab Alliance, State Collegue, Estados Unidos) con una columna de exclusión iónica Rezex-RNO-Oligosacáridos  $\text{Na}^+$  (4%) (60 x 10 mm y tamaño de partícula de 12  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex; Amstelveen, Países Bajos) y

temperatura de horno de 75 °C. El equipo de HPLC está equipado con un detector de dispersión de luz SOFTA 300S (Chrom Tech, Minnesota, USA) con flujo de nitrógeno a 62.5 psi, cámara de pulverización a 10 °C y un tubo de deriva a 45 °C. Como fase móvil se usó agua destilada, desionizada y filtrada a un flujo de 0.3 mL/min. Para cuantificar los oligosacáridos fucosilados sintetizados se empleó el *software* Clarity interpolando el área obtenida en una curva estándar de rafinosa (**Anexo 13.2**).

### 8.11. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se reportan como la media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico se realizó empleando el *software* IBM SPSS *Statistic* versión 25.0 para Windows (IBM, Nueva York, USA) mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tuckey's para comparar los pares de grupos. Un valor *P* de 0.05 fue considerando estadísticamente significativo.

### 8.12. Producción de las dinámicas moleculares

Para evaluar el efecto de la temperatura en la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (PDB 2ZWW) se llevaron a cabo simulaciones de dinámica molecular (DM) a diferentes temperaturas: 60, 80, 90, 95 y 200 °C. Las simulaciones se realizaron en el *cluster* Yoltla perteneciente al Laboratorio de Supercómputo y visualización en Paralelo de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Se empleó el *software* NAMD 2.13 (Phillips et al. 2020) y campo de fuerza CHARMM 36 (Huang & Mackerell, 2013). La enzima fue energéticamente minimizada y solvatada en una caja cúbica de moléculas de agua TIP3 con dimensiones de 128 x 128 x 128 Å bajo condiciones a la frontera periódicas y manteniendo la proteína fijada. Este proceso permite que solo las moléculas de agua se ajusten a sus posiciones y orientaciones alrededor de la proteína en la caja en la manera más favorable. Para neutralizar la carga total del sistema, se agregaron iones de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> para alcanzar una concentración de 0.1 M. El protocolo de equilibración consistió en 15,000 pasos de minimización y 10,000 pasos de calentamiento donde la temperatura fue lentamente aumentada de 298.15 K hasta la temperatura deseada. Tanto en la equilibración como en todas las DM se empleó el termostato y baróstato de Langevin a una presión de 0.77 atm (presión atmosférica de la ciudad de México). Finalmente, el sistema fue sometido a la simulación con una corrida de 120 ns para cada una de las temperaturas deseadas. Las DM consistieron en seis corridas de 10<sup>6</sup> pasos y con un paso de integración de 2 fs. Cada trayectoria fue salvada, donde 5,000 pasos corresponden a 10 ps.

Las trayectorias de DM fueron analizadas empleando el *software* VMD 1.9.3 (Humphrey et al. 1996) y VMD-SS plugin (Yahyavi et al., 2014).

### 8.13. Procedimiento del acoplamiento molecular

Con la finalidad de evaluar si la temperatura tiene algún efecto en la forma en que los ligandos L-fucosa (PubChem 17106) y *p*NP-Fuc (PubChem 82473) interaccionan con la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, se realizó el acoplamiento molecular de las estructuras cristalográficas de la enzima procedentes de la simulación de DM a diferentes temperaturas (60, 80, 90, 95 y 200 °C).

Se generaron mapas de afinidad atómica centrados en el sitio activo de la enzima empleando el programa AutoGrid con un espaciamiento entre puntos de 0.375 Å y dimensiones de 46 x 74 x 60 puntos y centro de la caja con coordenadas 1.575, 26.938 y 30.195 en los ejes x, y, z respectivamente. El acoplamiento computacional se realizó en una computadora con procesador Intel Core Duo con 16 GB en RAM y 500 GB en disco duro empleando el programa AutoDock 4.2 (Morris *et al.* 2009). Se eligió el algoritmo genético de Lamarckian (LGA) como parámetro de búsqueda fijando un número de corrida de 250, tamaño de población de 150 y número máximo de evaluaciones (25,000,000). Se evaluaron las diferentes interacciones enzima-ligando tomando como criterio que el ligando que se situará dentro del sitio activo de la enzima, que interactuará con los aminoácidos reportados para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* y que presentará la menor energía libre de unión se eligió para analizar el tipo de interacción empleando el programa BIOVIA Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, Dassault Systemes, 2021). Autodock utiliza un algoritmo para el cálculo de la constante de disociación ( $K_d$ ), por lo que, al calcular el inverso de este valor podemos obtener la constante de unión ( $K_b$ ), (Anexo 13.3).

## 9. Resultados y análisis

### 9.1. Efecto del pH en la actividad hidrolítica y de transglucosilación de $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

Las fucosidasas muestran una actividad catalítica óptima a un pH específico, donde los residuos catalíticos de la enzima adquieren el estado de ionización más favorable para llevar a cabo la reacción (Castillo *et al.*, 2006). En la **Fig. 8** se muestra la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* en función del pH, en ella se observa que en el intervalo de pH 7-9 se obtuvo la mayor actividad enzimática sin presentar diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Los resultados coinciden con lo reportado por Lezyk *et al.*, (2016) quienes establecieron un pH óptimo de 7 así como un intervalo de actividad de pH 4-9 para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* en condiciones de 30 °C y 1mM *p*NP-Fuc. En general las  $\alpha$ -L-fucosidasas exhiben una actividad hidrolítica en un amplio intervalo de pH. Por ejemplo, Berteau *et al.* (2004) determinaron un pH óptimo de 4 para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Pecten maximus*, mientras que, Cobucci-Ponzano *et al.* (2005) reportaron un pH óptimo de 5 para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Sulfolobus solfataricus*. En un estudio realizado por Benešová *et al.* (2013) la  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *Paenibacillus thiaminolyticus* clonada y expresada en *E. coli* mostró su máxima actividad a pH 8.2.

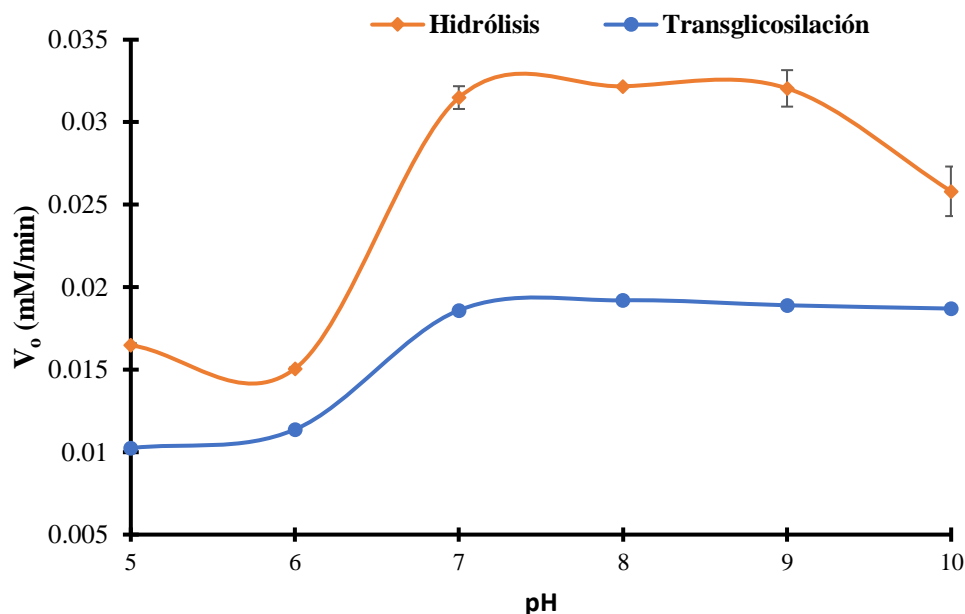


Fig. 8 Efecto del pH en la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La actividad hidrolítica se realizó a 60 °C empleando una solución 3.5 mM de pNP-Fuc y 0.0065 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa. La actividad de transglicosilación se desarrolló de forma similar, pero empleando 438 mM D-lactosa.

Asimismo, la **Fig. 8** muestra la actividad de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La mayor actividad se encontró en el intervalo de pH de 7-10 ( $p < 0.05$ ), observándose que la actividad de transglicosilación (al igual que la actividad hidrolítica) aumenta con el pH, lo que se reflejó en un incremento en el rendimiento de síntesis de oligosacáridos fucosilados de 6.07% a 40.67% cuando el pH se modificó de 5 a 8. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en otras glicosidasas provenientes de fuentes termofílicas. En un estudio realizado por Hansson *et al.* (2001) se demostró que la mejora en la producción de GOS está relacionada con el aumento de pH de 5 a 5.5, esto empleando una  $\beta$ -manosidasa de *Pyrococcus furiosus* como catalizador. Por otro lado, Ji *et al.* (2005) observaron un incremento en el rendimiento de GOS al modificar el pH de 5 a 6 en una reacción catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *T. maritima* expresada en *E. coli*. De forma similar, Wu *et al.* (2013) reportaron un aumento en la síntesis de GOS al modificar el pH de 4 a 6 para una  $\beta$ -glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus*, mientras que con dos  $\beta$ -glicosidasas expresadas en *E. coli* (F441Y y F359Q) se obtuvo una mejora en la síntesis de GOS cuando el pH incrementó de 4 a 6.5.

Es notorio que la actividad hidrolítica y de transglicosilación exhiben perfiles similares en pH 5-9, en cambio, a pH 10, la actividad hidrolítica disminuye mientras que la actividad de transglicosilación se mantiene sin cambios. Sulzenbacher *et al.* (2004) y Tarling *et al.* (2003) sugieren que los cambios de pH en el medio de reacción afectan el  $pK_a$  de los aminoácidos involucrados en la catálisis, mientras que, Abdul Manas *et al.* (2018) concluyeron que la ionización de estos aminoácidos clave es un factor determinante que favorece las



interacciones ya sea con agua, resultando en una reacción de hidrólisis o con un azúcar aceptor resultando en una reacción de transglicosilación tal y como se observó en este trabajo.

## 9.2. Efecto de la temperatura en la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

Como se puede observar en la **Fig. 9** el aumento en la temperatura de reacción mejoró la actividad hidrolítica de la enzima, obteniéndose la mayor actividad a 95 °C. Resultados similares han sido reportados para otras glicosidasas termo-resistentes. Por ejemplo, Costantino *et al.* (1990) reportaron que la  $\alpha$ -glicosidasa de *Pyrococcus furiosus* despliega su máxima actividad en el intervalo de temperatura de 105-115 °C. Mientras que, Turner *et al.* (2007) reportan una temperatura óptima de 90 °C para una  $\beta$ -glicosidasa recombinante de *Thermotoga neapolitana*. De forma similar, Gumerov *et al.* (2015) reportaron una temperatura óptima de 85°C para la  $\beta$ -galactosidasa de *Acidolobus saccharovorans*.

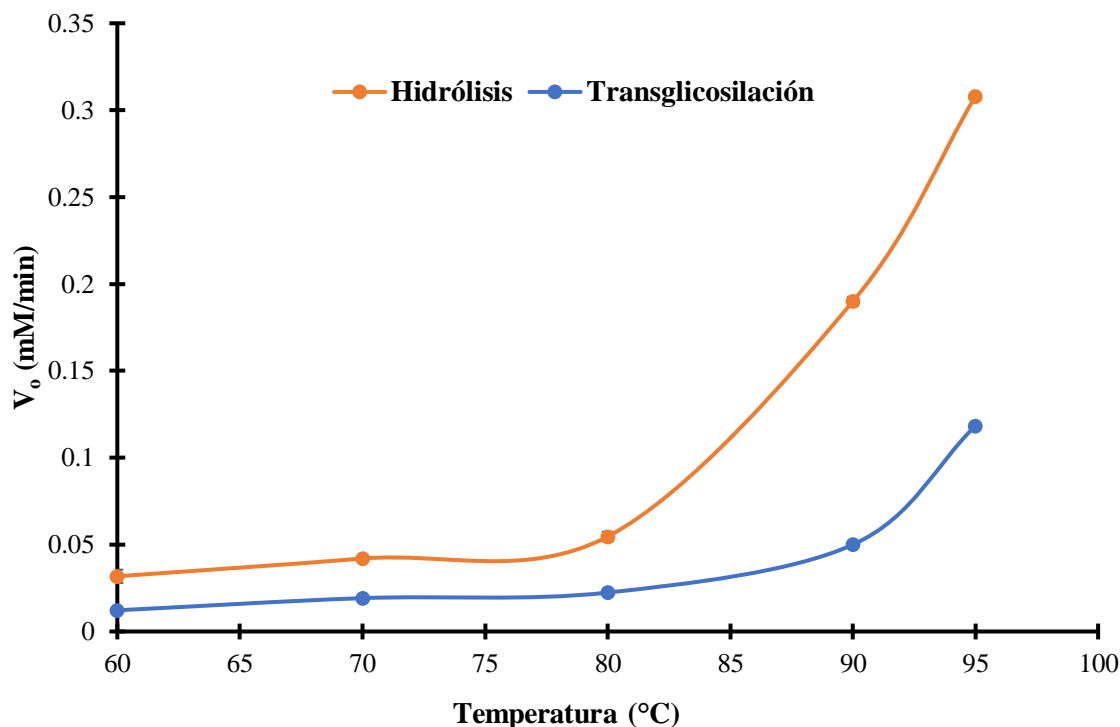


Fig. 9 Efecto de la temperatura sobre la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La actividad hidrolítica se determinó a diferentes temperaturas a pH 8, empleando una solución de pNP-Fuc (3.5 mM) y 0.0065 U/mL de *T. maritima*. La actividad de transglicosilación se desarrolló bajo las mismas condiciones, pero adicionando D-lactosa (438 mM).

Frecuentemente, las glicosidasas termoresistentes muestran una mejor productividad en la síntesis de oligosacáridos cuando la reacción se realiza en altas temperaturas, esto debido a una mejora en la cinética de la reacción y en la solubilidad de los sustratos (Liu *et al.* 2015). De forma semejante en este estudio, el aumento de la temperatura mejoró la actividad de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa (**Fig. 9**). Cuando la reacción se realizó a 95 °C, el rendimiento en la síntesis fue tres veces mayor que a 60 °C (32.01 y 10.58% respectivamente), esto debido no sólo a lo mencionado anteriormente, también, al tratarse de una enzima proveniente de un microorganismo hipertermofílico, la actividad enzimática aumenta al trabajar en temperaturas elevadas. Resultados similares fueron obtenidos por Fourage *et al.* (2000), quienes reportan un incremento en la síntesis de *p*NP-Fuc-Fuc 2.6 veces mayor al incrementar la temperatura de 37 a 75 °C (16 a 42%, respectivamente) en una reacción catalizada por la  $\beta$ -glicosidasa de *Thermus thermophilus*. Mientras que, en una reacción catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, el incremento de temperatura de 40 a 60 °C permitió obtener los máximos rendimientos de GOS y lactulosa (3.86 y 4.73 mmol/kg, respectivamente). Sin embargo, los autores sugieren que los resultados observados podrían estar relacionados con el efecto positivo de la temperatura en la actividad hidrolítica, por lo tanto, se puede asumir que la mejora en el rendimiento de síntesis de oligosacáridos fucosilados obtenida en este trabajo está asociada al aumento en la actividad hidrolítica por efecto de la temperatura (Vera *et al.*, 2011). En el trabajo realizado por Warmerdam *et al.* (2013) se registró un incremento en el rendimiento de síntesis de GOS (5 a 15 g/L) debido al aumento de temperatura de 25 a 60 °C en una reacción catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*. Recientemente, Zeuner *et al.* (2016) reportaron un incremento de seis veces en los rendimientos de síntesis de *N*-acetilactosamina (0.9 a 5.4%) empleando la  $\beta$ -galactosidasa de *Pyrococcus furiosus* cuando la temperatura se modificó de 40 a 60 °C. Debido a lo previamente mencionado, el uso de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* es una alternativa tecnológicamente atractiva para la síntesis de oligosacáridos fucosilados.

Adicionalmente, se calculó la  $E_a$  para la reacción de hidrólisis y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa, obteniéndose valores de 13.83 y 14.27 kcal/mol respectivamente (**Fig. 10**). Los valores obtenidos indican que la reacción de transglicosilación es termodinámicamente desfavorable por lo que la enzima debe sobrepasar una mayor barrera de energía para poder llevar a cabo la síntesis de oligosacáridos fucosilados en comparación con la energía requerida para catalizar reacciones de hidrólisis. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, por ejemplo, Pouwels *et al.* (2000) reportaron una  $E_a$  de 15.52 kcal/mol y de 16.96 kcal/mol en la hidrólisis de *para*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido para las  $\beta$ -glicosidasas de *Pyrococcus furiosus* y de *Sulfolobus solfataricus*, respectivamente. Por otro lado, Yang *et al.* (2018) determinaron una mayor  $E_a$  para la síntesis de galactotrisacáridos (7.45 kcal/mol) en comparación con la necesaria en la hidrólisis de lactosa (6.4 kcal/mol) en una reacción catalizada por la  $\beta$ -glucosidasa de *Thermotoga naptophila*. Cuando el sustrato se une al sitio activo de la enzima, los residuos del sitio activo de esta pueden formar interacciones con los átomos de las moléculas del sustrato, lo cual disminuye la  $E_a$  (Marana *et al.*, 2002). Las diferencias entre los valores obtenidos para la actividad hidrolítica y de transglicosilación podría deberse al efecto de los diferentes sustratos aceptores (agua y lactosa, respectivamente) en el sitio activo de la enzima.

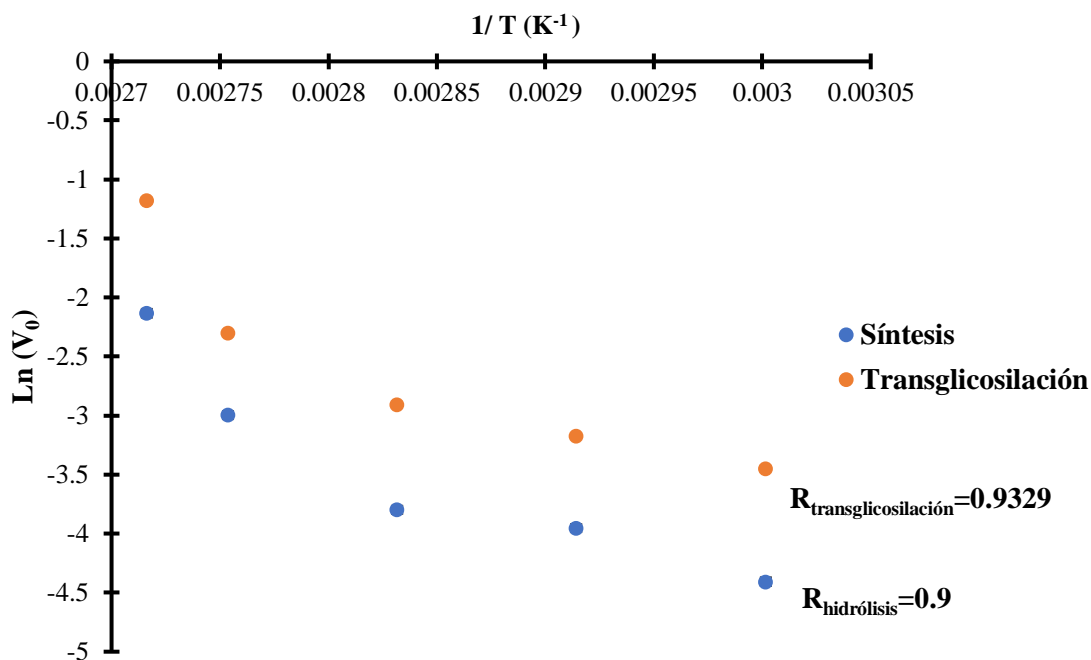


Fig. 10 Gráfico de Arrhenius del Ln(V<sub>0</sub>) en función de 1/T de la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. Las barras de error representan la desviación estándar.

Es notorio que los gráficos de Arrhenius obtenidos en este trabajo (**Fig. 10**) no presentan una tendencia lineal. Vieille & Zeikus (2001) reportaron que las enzimas hipertermofílicas son una excepción importante al comportamiento lineal típico de Arrhenius. Además, debido al incremento de temperatura, este tipo de enzimas sufren cambios catalíticos estructurales los cuales están frecuentemente correlacionados con alteraciones conformacionales que se reflejan en su funcionamiento (Hensel *et al.*, 1987; Londesborough, 1980). Asimismo, es importante resaltar que el uso de sustratos donadores activados como el empleado en este trabajo (*p*NP-Fuc) contribuyen a disminuir la energía de activación durante la reacción de transglicosilación debido a la energía liberada durante la hidrólisis del enlace glicosídico (Escamilla-Lozano *et al.*, 2019), por lo tanto, es posible que el uso de sustratos donadores no activados conduzca a la obtención de E<sub>a</sub> elevadas.

### 9.3. Termo-estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

La  $\alpha$ -L-fucosidasa muestra una mayor actividad enzimática a 90 y 95 °C (**sección 8.1**), por lo tanto, se determinó su estabilidad térmica incubando la enzima a dichas temperaturas. En la **Fig. 11** se observa que, a 90 °C en los primeros 20 min la actividad hidrolítica disminuye a 69±5.1% sin presentar diferencia significativa a partir de este punto y hasta los 120 min. A 95 °C la actividad disminuyó pronunciadamente a

lo largo del tiempo, conservando el  $18.89 \pm 3.3\%$  después de 120 min de incubación sin presentar diferencia significativa con 90 min ( $p < 0.05$ ). Zeuner *et al.* (2018a) evaluaron la estabilidad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a pH 5 en el intervalo de temperatura de 40 a 95 °C. Los autores reportan que la actividad de la enzima permanece estable a 60 °C en periodos de incubación hasta de 60 min, por el contrario, a 90 y 95 °C la fucosidasa presenta una vida media de 15 y 4.4 min, respectivamente, lo cual es significativamente menor a lo reportado en este trabajo, las diferencias podrían deberse a las condiciones de reacción tales como: concentración de enzima y sustrato, así como pH, ya que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* demostró tener una mayor actividad cuando se encuentra en pH alcalino. No obstante, en otro estudio, la  $\beta$ -glucosidasa recombinante de *T. maritima* expresada en *E. coli*, desplegó una vida media de 71 y 9.2 h a 90 y 100 °C, respectivamente (Mehmood *et al.* 2014).

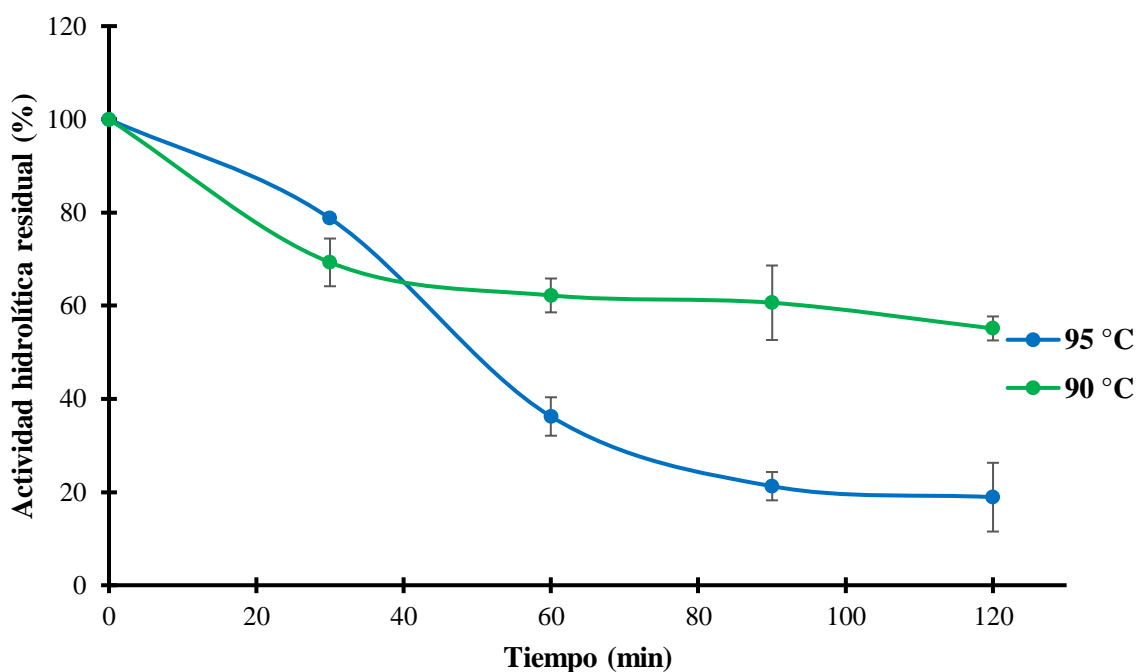


Fig. 11 Efecto de la temperatura en la termo-estabilidad de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a 90 y 95 °C.

#### 9.4. Síntesis de oligosacáridos fucosilados

La síntesis de oligosacáridos fucosilados se llevó a cabo empleando *p*NP-Fuc como sustrato donador y D-lactosa como sustrato aceptor. En la **Fig. 12a** se muestra el cromatograma de HPLC de los productos de transglicosilación. El tiempo de retención obtenido para el oligosacárido fucosilado fue de 7.7 min, el cual coincide con el tiempo de retención presentado por el estándar 2'-FL (**Fig. 12b**). Adicionalmente, la **Figura 12a** revela la presencia de fucosa y el oligosacárido fucosilado, los cuales son indicativos de que la enzima cataliza tanto la reacción de hidrólisis del sustrato donador como de síntesis de oligosacáridos.

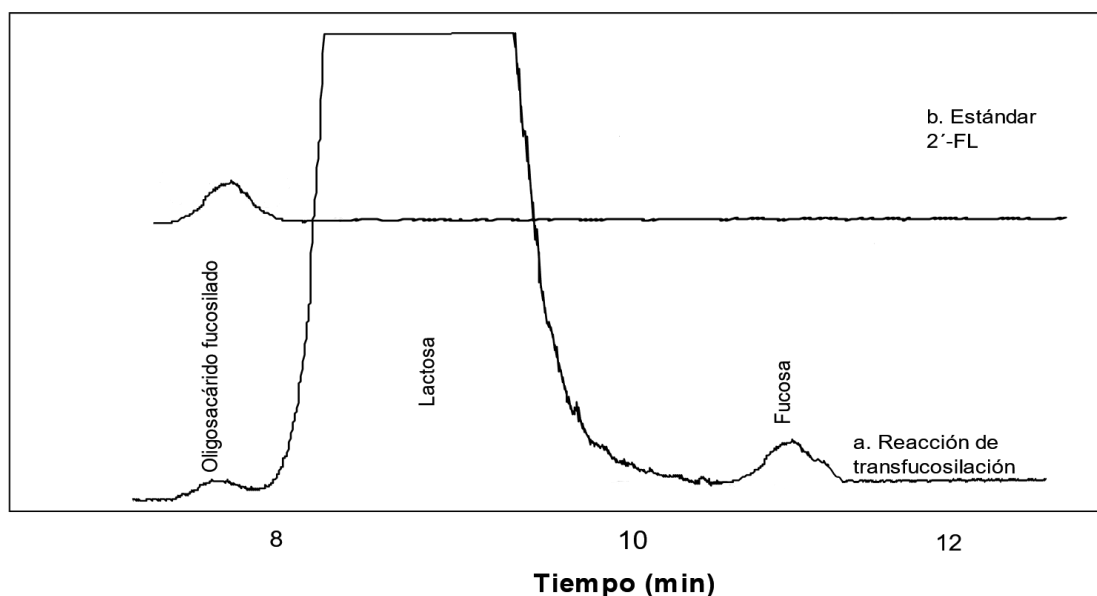


Fig. 12 Cromatograma obtenido mediante HPLC de a) Reacción de transfucosilación y b) Estándar de 2'-FL. La reacción de transfucosilación se realizó a 90 °C y pH 8 empleando 0.0065 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, *p*NP-Fuc (3.5 mM) como sustrato donador y D-lactosa (438 mM) como sustrato aceptor.

Dado que la  $\alpha$ -L-fucosidasa exhibe su mayor actividad a pH 8, así como estabilidad entre 90 y 95 °C, estas condiciones fueron seleccionadas para realizar la síntesis de oligosacáridos fucosilados (**Fig. 13**). En la **Fig. 13a** que corresponde a la reacción catalizada a 90 °C, se observa que la máxima concentración de oligosacáridos fucosilados fue 0.76 mM y que el sustrato donador se terminó a los 120 min de la reacción. En la **Figura 13b** se muestra la reacción catalizada a 95 °C, bajo estas condiciones la mayor concentración de oligosacáridos fucosilados (1.18 mM) se obtuvo a los 20 min. Sin embargo, posteriormente la concentración de oligosacáridos fucosilados disminuyó, este fenómeno tendría dos explicaciones: la primera sería que debido a que el producto sintetizado puede ser un sustrato para la enzima, posiblemente este siendo hidrolizado; por otro lado, con base a lo reportado Cruz-Guerrero *et al.* (2006), la segunda explicación es que el trisacárido sintetizado podría estar siendo usado como precursor para la formación de fucooligosacáridos de cadenas más largas. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser comprobada, por ejemplo, se podría recurrir a la técnica de

espectrometría de masas (MALDI-TOF) para identificar todos los posibles compuestos sintetizados durante la reacción de transfucosilación.

Lezyk *et al.* (2016) reportaron la síntesis de 2'-FL con una productividad de 0.23 mM/h empleando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (0.51  $\mu$ g/mL), 20 mM *p*NP-Fuc y 25 mM D-lactosa a 30 °C, mientras que, en un estudio realizado por Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018a) se reportó una productividad de 0.29 mM/h en la síntesis de fucosil-lactosa en una reacción catalizada a pH 5 y 60 °C por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (0.13  $\mu$ g/mL) empleando 3.5 mM *p*NP-Fuc y 584 mM D-lactosa. Comparando con los datos previamente reportados, en este trabajo se alcanzó la mayor productividad (3.57 mM/h) a 95 °C y pH 8, lo cual es mayor a lo reportado por los autores previamente mencionados, empleando una concentración menor de enzima (0.013  $\mu$ g/mL). Al haber empleado la misma enzima, sustrato donador y aceptor que el autor previamente mencionado, el oligosacárido fucosilado posiblemente corresponde a 2'-FL. Es notorio que la productividad de oligosacáridos fucosilados fue mayor a lo reportado por los autores mencionados anteriormente, esto debido al trabajar en condiciones óptimas de reacción de pH y temperatura. Al modificar el pH a 8, los aminoácidos catalíticos de la enzima adquirieron un estado de ionización en el que se favoreció la interacción de estos con la lactosa, favoreciéndose la reacción de transglicosilación. Mientras que al trabajar a una temperatura elevada 95 °C (posiblemente la óptima o cercana a la óptima de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*), la enzima exhiba una mayor actividad catalítica, además existe un aumento en la cinética de la reacción, al aumento en la solubilidad del sustrato donador.

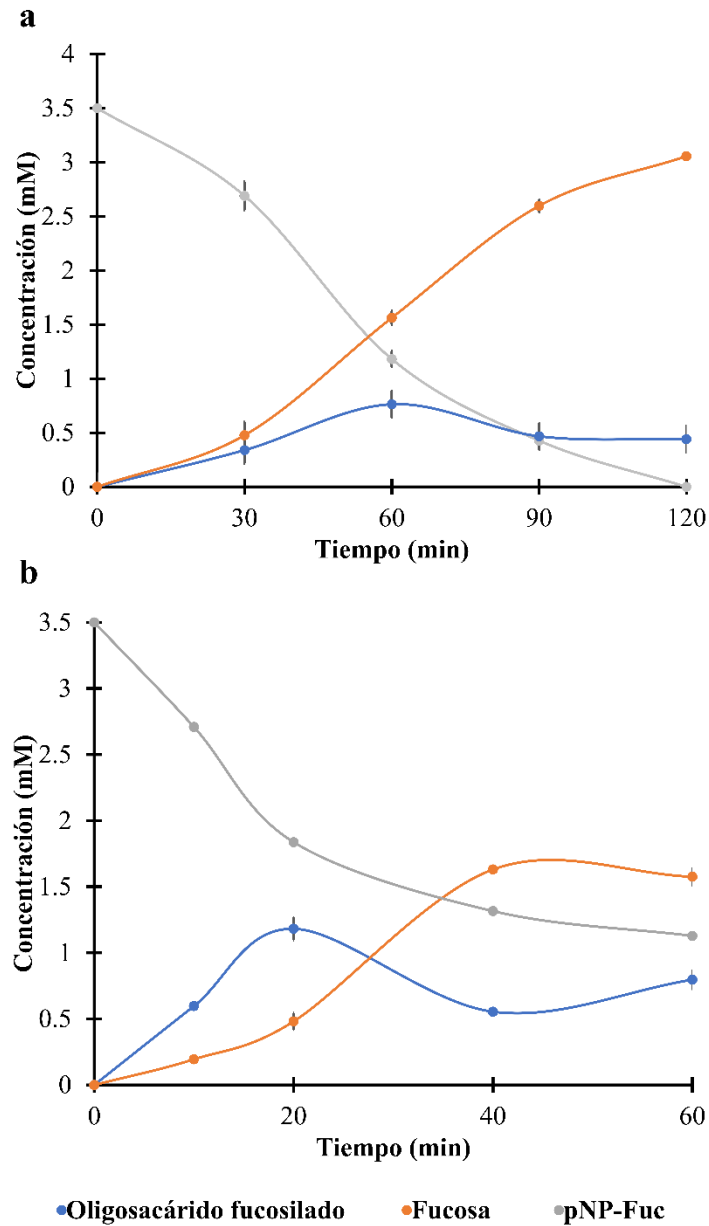


Fig. 13 Cinética de síntesis de oligosacáridos fucosilados catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La reacción fue realizada a 90 (a) y 95 °C (b) a pH 8 empleando pNP-Fuc (3.5 mM) como sustrato donador, D-Lactosa (438 mM) como sustrato aceptor y 0.0065 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

## 9.5. Estimación de la actividad de agua en el sistema de reacción agua:solvente

Debido a que la distribución de agua en el medio de reacción mantiene un balance entre los componentes del sistema, el parámetro termodinámico  $a_w$  es la mejor variable para determinar la disponibilidad de agua en los sistemas agua:solvente. La **Fig. 14** se obtuvo de acuerdo al modelo propuesto por Bell *et al.* (1997) y García-Garibay *et al.* (2000). En ella se observa que a medida que la fracción molar de agua disminuye, la  $a_w$  también presenta el mismo comportamiento. Sin embargo, ocurre de forma distinta en cada uno de los solventes ensayados. Mientras que acetona y acetonitrilo muestran perfiles similares, con DMSO la  $a_w$  disminuye pronunciadamente conforme la fracción molar del agua lo hace. La validez de las isotermas obtenidas fue corroborada ya que estas siguen el mismo patrón que las reportadas por Bell *et al.* (1997) y Cruz-Guerrero *et al.* (2006).

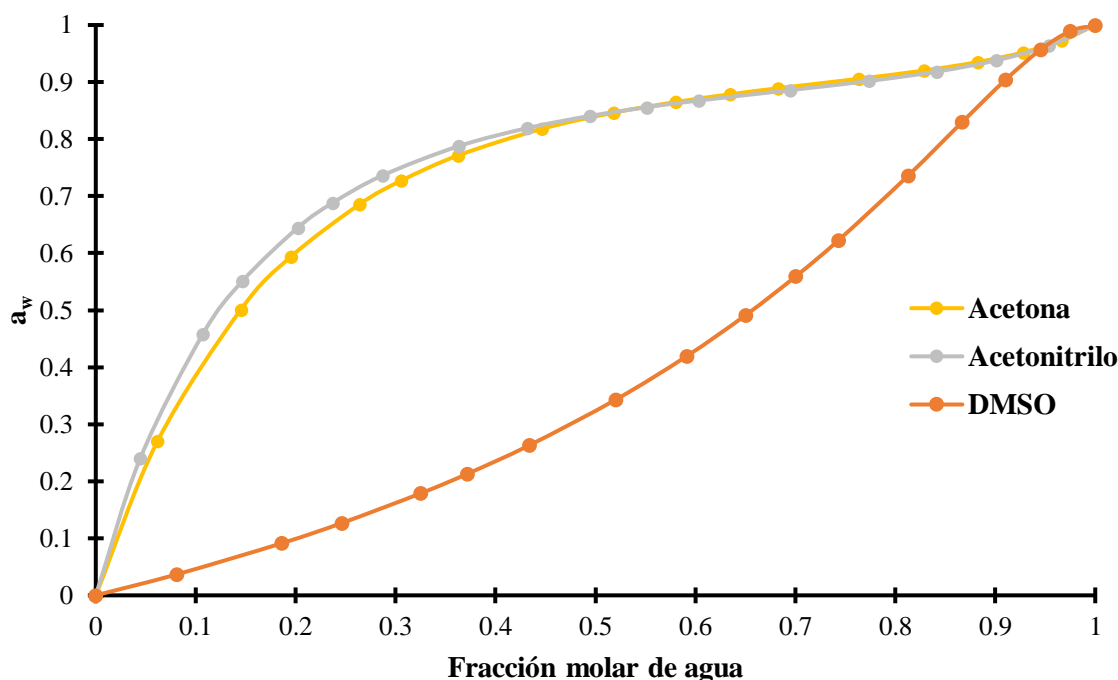


Fig. 14 Estimación de la actividad de agua ( $a_w$ ) en función de la fracción molar del agua para acetona, acetonitrilo y DMSO a 60 °C.

## 9.6. Estabilidad de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a distintas $a_w$

La adición de solventes en el medio de reacción representa una opción para disminuir la  $a_w$ , aumentar la solubilidad del sustrato donador y con ello incrementar el rendimiento en la síntesis de oligosacáridos fucosilados, en consecuencia, la estabilidad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa en medio orgánico es un parámetro de estudio



importante. La actividad hidrolítica residual de la enzima fue examinada en acetona ( $a_w$  0.97), acetonitrilo ( $a_w$  0.96) y DMSO ( $a_w$  0.99) (**Fig. 15**). En ella no se observa diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en cuanto al efecto que tienen los solventes ensayados sobre la actividad enzimática, con la  $\alpha$ -L-fucosidasa manteniendo alrededor del 76% de su actividad después de 180 min de incubación en comparación con el experimento control.

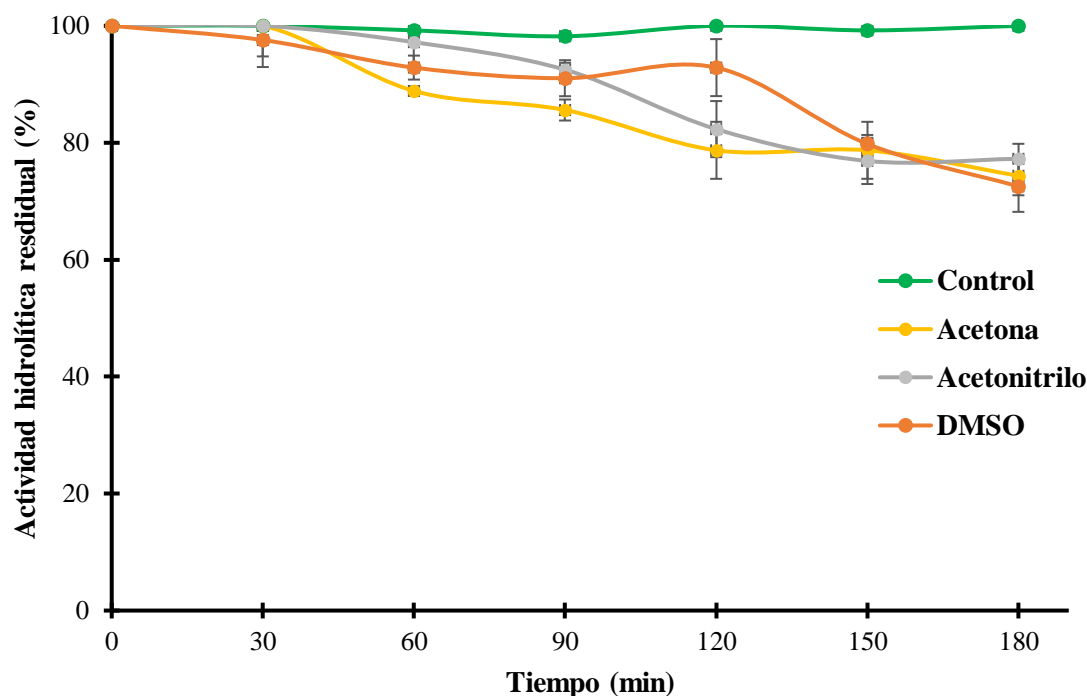


Fig. 15 Actividad hidrolítica residual de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, control acetona, acetonitrilo y DMSO. La reacción fue realizada incubando 0.013 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa en acetona ( $a_w$  0.97), acetonitrilo ( $a_w$  0.96) y DMSO ( $a_w$  0.99) durante 180 min a 60 °C.

Pyeon *et al.* (2019) reportaron que la  $\beta$ -glucosidasa recombinante de *Microbulbifer thermotolerans* conservó el 93, 79 y 29% de su actividad tras 1 h de incubación en acetona, ( $a_w$  0.97), DMSO ( $a_w$  0.98) y acetonitrilo ( $a_w$  0.96), respectivamente. Por el contrario, en un estudio previo (Lee *et al.*, 2018) los autores informaron que la quitinasa recombinante MtCh509 de *Microbulbifer thermotolerans* exhibió más del 100% de su actividad en un medio con DMSO como cosolvente en  $a_w$  0.99 y 0.96. No obstante, en presencia de acetonitrilo la actividad de la enzima disminuyó considerablemente. Las enzimas termofílicas (como la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*) frecuentemente presentan estructuras rígidas, lo cual es un requisito para que presenten una alta termo-estabilidad. Esta característica está directamente relacionada con su resistencia a solventes orgánicos, lo que explicaría por qué, la  $\alpha$ -L-fucosidasa fue capaz de conservar parte de su actividad en presencia de los tres solventes en periodos prolongados de tiempo.

## 9.7. Efecto de la $a_w$ sobre la actividad hidrolítica de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

Cuando se trabaja en medios con solventes orgánicos, es frecuente que se relacione la actividad enzimática con factores como: la capacidad de desnaturalización del solvente, momento dipolar, por su capacidad para formar puentes de hidrógeno y de retirar el agua de la superficie de la enzima. No obstante, el impacto del disolvente en la actividad enzimática, en realidad está relacionado con el coeficiente de partición del solvente ( $\log P$ ), constante dieléctrica u otra medida de su polaridad (Bankova *et al.*, 2006).

En la **Fig. 16** se reporta el efecto que tienen los diferentes solventes sobre la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, en ella se observa que la actividad residual de la  $\alpha$ -L-fucosidasa excedió el 100% en presencia de acetona ( $a_w$  0.97, 0.95, 0.93) y acetonitrilo ( $a_w$  0.96, 0.93, 0.91) con respecto al ensayo control, sin embargo, a valores de  $a_w$  menores a 0.91 la actividad enzimática disminuyó. En presencia de DMSO con una  $a_w$  0.99, la actividad enzimática de la  $\alpha$ -L-fucosidasa no presentó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) respecto al ensayo control, no obstante,  $a_w$  menores tienen un efecto negativo en su actividad. Estudios similares han sido realizados por otros autores, Mallek-Fakhfakh & Belghith (2016) reportaron que la  $\beta$ -glicosidasa de *Talaromyces thermophilus* no mostró cambios en su actividad en presencia de DMSO a una  $a_w$  0.97, sin embargo, la disminución de  $a_w$  a 0.91 provocó la desactivación de la enzima. Por otro lado, Jiang *et al.* (2004) demostraron que en un medio con DMSO ( $a_w$  0.96) la actividad enzimática de la xilanasa B de *T. maritima* no sufrió cambios negativos. En comparación con los resultados reportados por los autores previamente mencionados, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* empleada en este trabajo no sólo conservó una mayor actividad hidrolítica a bajas  $a_w$ , además presentó una actividad hidrolítica mayor al 100% a determinadas  $a_w$  en presencia de acetona y acetonitrilo, lo cual es una característica atractiva para el uso de esta enzima en procesos industriales que requiera la hidrólisis de sustratos.

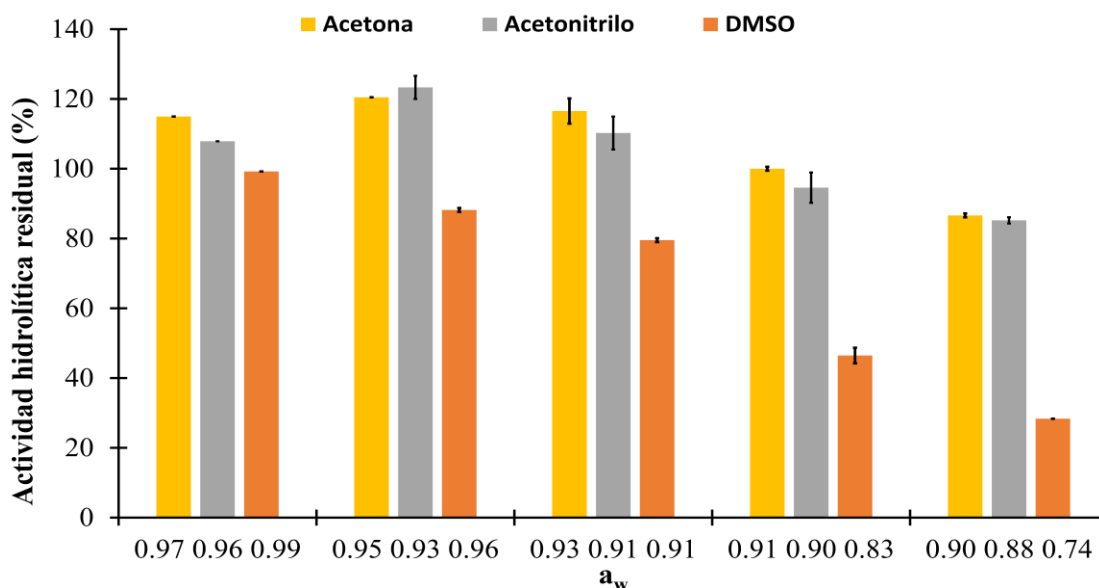


Fig. 16 Efecto de la  $a_w$  en la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La reacción fue realizada a 60 °C empleando distintas concentraciones de acetona, acetonitrilo y DMSO como solventes, así como 3.5 mM de pNP-Fuc y 0.0065 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa.

## 9.8. Efecto de la $a_w$ en la síntesis de fucooligosacáridos

Dado que el rendimiento en la síntesis de oligosacáridos se ve influenciado por la presencia de moléculas de agua, ya que éstas desplazan el equilibrio de la reacción hacia hidrólisis, así como son responsables de las indeseables reacciones de hidrólisis secundaria. Diversos autores han propuesto que al disminuir la  $a_w$  en el medio de reacción adicionando solventes orgánicos es posible aumentar la reacción de transglucosilación sobre de hidrólisis al favorecer la transferencia del residuo fucosil a un sustrato donador y con ello incrementar el rendimiento en la síntesis de oligosacáridos (Bankova *et al.*, 2006; Gosling *et al.*, 2011; Zeuner *et al.*, 2014).

Basado en los resultados previos obtenidos en este trabajo en donde la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* presentó una alta estabilidad y actividad en los medios de reacción con acetona ( $a_w$  0.97), acetonitrilo ( $a_w$  0.96) y DMSO ( $a_w$  0.99), estos cosolventes fueron seleccionados para realizar la síntesis enzimática de oligosacáridos fucosilados. En la **Fig. 17a** se muestra el efecto de los solventes en la actividad hidrolítica de la enzima. Se observa que a los 30 min la hidrólisis del sustrato donador es mayor en medio con acetonitrilo en comparación con acetona y DMSO. Sin embargo, conforme transcurre el tiempo de reacción, la actividad hidrolítica es mayor en medio con acetona en comparación con los demás solventes. Mientras que acetonitrilo y DMSO muestran perfiles similares a partir de los 120 min y hasta los 180 min de reacción. Además, en la **Fig. 17b** se observa que, la mayor concentración de oligosacáridos fucosilados se obtuvo en el orden de DMSO>acetona>acetonitrilo (0.85>0.51>0.46 mM). Resultados similares fueron reportados por, Trincone, *et al.* (2005) quienes determinaron un incremento en la síntesis de di- y trisacáridos  $\beta$ -D-glucopiranosidos en una

reacción catalizada por una  $\beta$ -glicosidasa de *Sulfolobus solfataricus* (Ss-  $\beta$ -glyE387G) en un medio con acetonitrilo. Por otro lado, en un estudio realizado por Cruz-Guerrero *et al.* (2006) se demostró que en un medio con acetona ( $a_w$  0.47) se obtuvo la mayor tasa de síntesis de GOS (0.051  $\mu\text{mol/mL}$ ). Mientras que en una reacción catalizada por  $\alpha$ -L-fucosidasa de hígado porcino en medio con DMSO fue necesario extender el tiempo de reacción para alcanzar la misma concentración de fucopiranosidos (9%) que en el medio convencional (Svensson & Thiem, 1990).

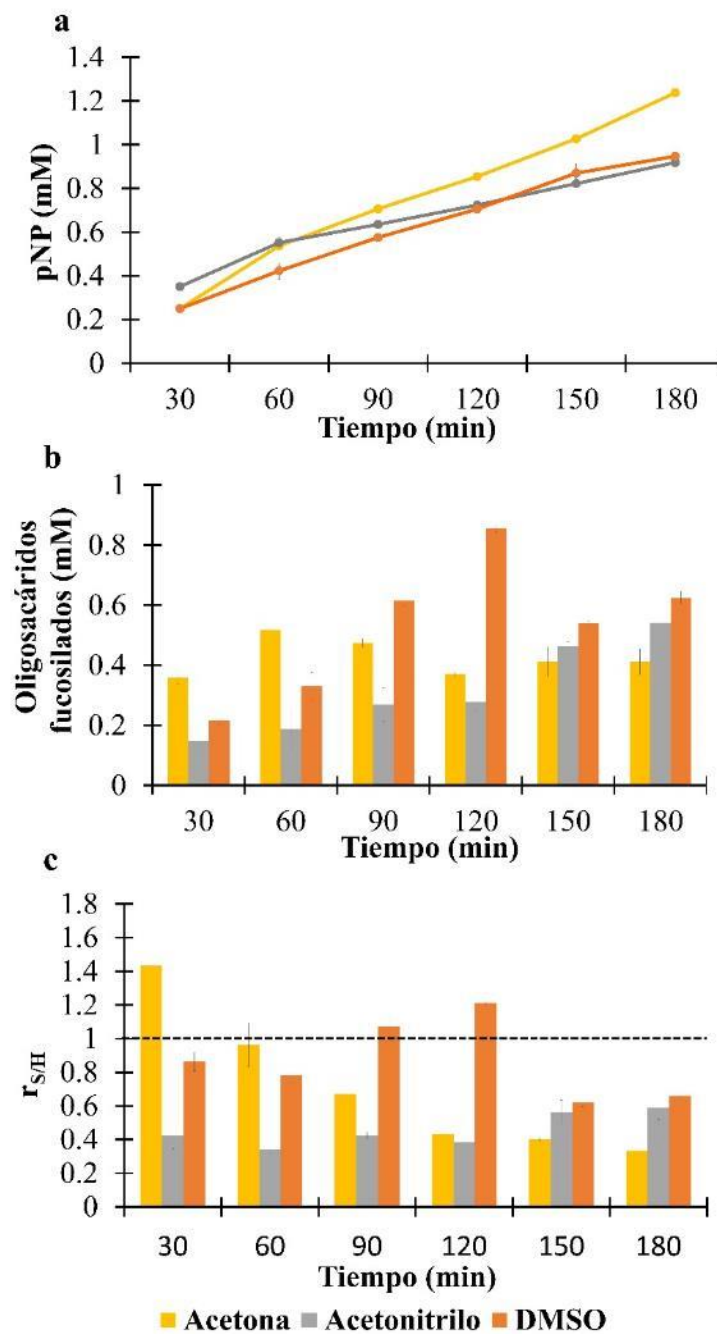


Fig. 17 Efecto de los solventes en a) Síntesis de oligosacáridos fucosilados y b) Tasa  $r_{S/H}$  catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La reacción fue realizada a 60 °C durante 180 min en medio con acetona ( $a_w$  0.97), acetonitrilo ( $a_w$  0.96) y DMSO ( $a_w$  0.99), empleando *p*NP-Fuc (3.5 mM) como sustrato donador, D-lactosa (438 mM) como sustrato aceptor y 0.0065 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa. Las barras de error representan la desviación estándar.

En este trabajo, también se evaluó el efecto en la tasa síntesis/hidrólisis ( $r_{S/H}$ ) por efecto de la variación de  $a_w$  debido a la adición de solventes. Como se puede observar en la **Fig. 17c** en presencia de acetona la  $\alpha$ -L-fucosidasa muestra una mayor actividad de transglicosilación en comparación con la actividad hidrolítica (correspondiendo a un valor de  $r_{S/H} > 1$ ), alcanzado la mayor tasa  $r_{S/H}$  (1.43) en 30 min. Mientras que en medio con DMSO, la mayor  $r_{S/H}$  (1.2) se alcanzó en 120 min. Comparando los tres solventes ensayados en este trabajo, el medio con acetonitrilo presentó un  $r_{S/H}$  menor a 1, lo que indica que la actividad hidrolítica prevalece sobre la de transglicosilación. Además, al comparar con el ensayo control ( $r_{S/H}$  0.39), con la adición de solventes como acetona y DMSO se favoreció el proceso cinético de la reacción hacia la actividad de transglicosilación. Resultados similares fueron reportados por Li *et al.* (1999) quienes observaron una disminución en la actividad de transglicosilación en una reacción catalizada por una colección comercial de glicosidasas termofílicas (CLONEZYME) en un medio de reacción con acetonitrilo ( $a_w$  0.88). Por el contrario, Baek *et al.* (2003) reportaron un mayor rendimiento en los productos de transglicosilación en medio con acetona, para una reacción catalizada por la amilasa maltogénica de una cepa de *Thermus*. De forma semejante, Li *et al.* (2004) observaron un incremento de daidzeina en un 14% en un medio con DMSO ( $a_w$  0.94) en una reacción catalizada por una maltosil transferasa de *T. maritima* expresada en *E. coli*.

## 9.9. Estudio del efecto de la temperatura en la estructura de la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* mediante dinámica molecular

### 9.9.1. Raíz de la desviación estándar cuadrática (RMSD)

La Raíz de la desviación estándar cuadrática (RMSD(Å)) es un parámetro empleado en el análisis de las trayectorias de dinámicas moleculares (DM) para establecer periodos de equilibrio, calidad de las simulaciones biomoleculares y agrupar conformaciones similares. Además permite comparar entre las proteínas en su estructura nativa totalmente plegada y su correspondiente estructura parcial o totalmente desplegada (Sargsyan *et al.*, 2017).

Con el fin de entender el efecto que ejerce la temperatura en la estructura de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* se realizaron simulaciones de DM empleando como referencia la estructura equilibrada al inicio de la simulación para cada temperatura y comparando con la estructura sometida a DM a los diferentes tiempos de la simulación. Las temperaturas ensayadas fueron: 60, 80, 90 y 95 °C (esta última determinada en este trabajo como la temperatura a la que se presenta la mayor actividad catalítica). Además, con la finalidad de validar la capacidad del sistema de reproducir las condiciones experimentales, se realizó una simulación a 200 °C; a dicha temperatura la enzima debería presentar un estado desplegado lo que indicaría que se encuentra desnaturalizada, ya que de acuerdo con lo reportado por Zeuner *et al.* (2018), la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* presenta una vida media de 4.4 minutos a 95 °C. En la **Fig. 18** y el **Anexo 12.4** se muestran los valores de RMSD obtenidos a lo largo de la DM para las diferentes temperaturas de simulación, observándose un incremento en los valores de RMSD con la temperatura.

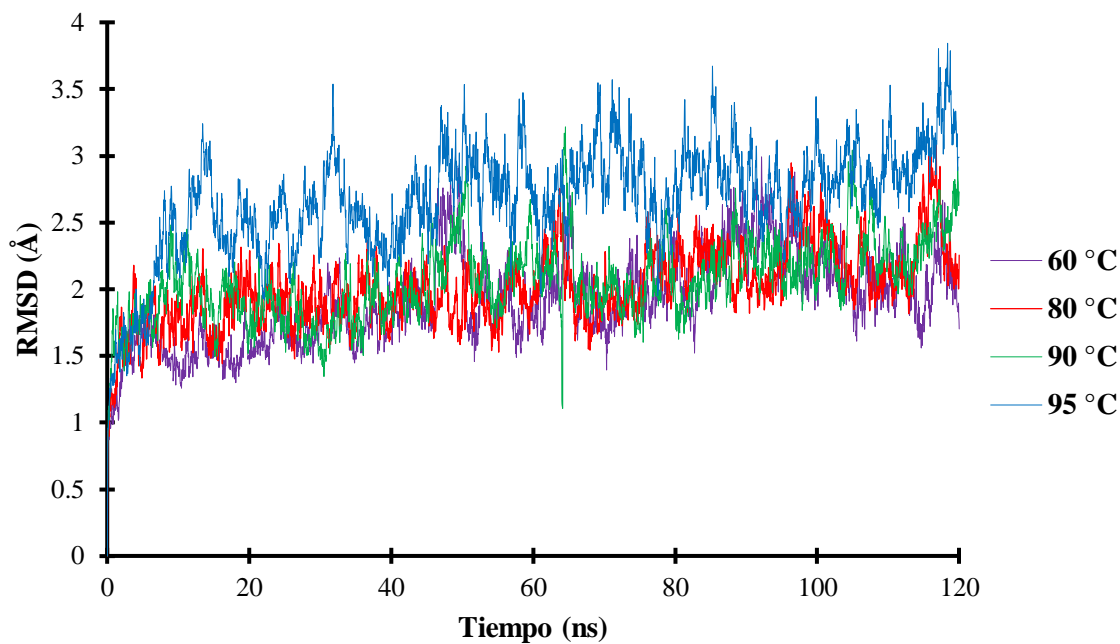


Fig. 18 RMSD de la estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a diferentes temperaturas.

Dado que los valores de RMSD se mantienen estables en los últimos 20 ns de la DM (indicando el equilibrio en la simulación), se eligió este periodo para calcular el promedio de RMSD ( $\text{RMSD}_{\text{prom}}$ ) y con ello analizar el efecto de la temperatura en la estructura de la enzima. En la **Tabla 6** se observa que los valores de  $\text{RMSD}_{\text{prom}}$  no mostraron diferencia significativa para el intervalo de 60-90 °C, sin embargo, a 95 °C si existe una diferencia significativa, lo que podría sugerir que a esta temperatura se presentan cambios conformacionales importantes en la enzima. Asimismo, a 200 °C se observa un incremento drástico en los valores de  $\text{RMSD}_{\text{prom}}$ , lo que indica que la enzima tiende a desplegarse cuando se encuentra a altas temperaturas, provocando la subsecuente pérdida de su estructura nativa, por lo que la enzima probablemente se desnaturalizó por efecto de la temperatura.

Tabla 6. Promedio de RMSD ( $\text{RMSD}_{\text{prom}}$ ) de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	$\text{RMSD}_{\text{prom}}$ (Å)
60	$2.06 \pm 0.19$
80	$2.13 \pm 0.2$
90	$2.21 \pm 0.27$
95	$2.97 \pm 0.25$
200	$9.6 \pm 0.44$

Resultados similares han sido reportados para otras enzimas termófilas e hipertermófilas. Por ejemplo, la proteína hipertermofílica ribosomal L30e de *Thermococcus celer* no mostró cambios en los valores de RMSD entre las simulaciones a 27 y 77 °C ( $2.36 \pm 0.18$  y  $2.26 \pm 0.22$  Å), indicando que la estructura nativa de la proteína se mantiene en ambas temperaturas y a lo largo de la simulación (Lee, 2012). Por su parte, Lian *et al.* (2016) reportaron incrementos en los valores de RMSD con la temperatura (27, 127 y 227 °C) para una celulasa de *Thermotoga maritima* (TmCel112A), obteniendo un valor de RMSD ~8 Å, así como cambios conformacionales importantes en su estructura secundaria en la simulación realizada a 227 °C. Mientras que la  $\beta$ -glucosidasa de *Halothermothrix orenii* mostró cambios en su estructura durante los últimos 20 ns de la simulación a 102 °C (RMSD >6 Å), lo que sugiere la desnaturalización de la enzima, por el contrario, a 27 y 62 °C no se registraron cambios significativos al obtenerse valores de RMSD ~1.5 Å en ambas temperaturas (Konar *et al.*, 2019). Al comparar estos resultados con los obtenidos para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, esta última presentó menos variaciones en los valores de RMSD a temperaturas más elevadas que las reportadas por los autores antes mencionados, probablemente debido a su mayor termoestabilidad en temperaturas más elevadas (Zeuner *et al.*, 2018).

### 9.9.2. Raíz de la fluctuación estándar cuadrática (RMSF)

La Raíz de la fluctuación estándar cuadrática (RMSF) es un descriptor de la flexibilidad de la proteína y mide la amplitud de los movimientos de los átomos durante la DM, siendo calculado en este trabajo a partir de la columna de carbonos  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) de la proteína.

En la **Fig. 19** y el **Anexo 12.5** se muestran los valores de RMSF de los aminoácidos de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* al final de la simulación para las diferentes temperaturas. En ella se aprecia que los valores de RMSF incrementan con la temperatura obteniéndose valores del promedio de ( $RMSF_{prom}$ ) de 3.52, 4.26, 4.58, 4.82 y 7.24 Å (a 60, 80, 90, 95 y 200 °C respectivamente). Resultados similares han sido reportados por otros autores, por ejemplo, Jana *et al.* (2020) reportaron un aumento en el  $RMSF_{prom}$  para una hidrolasa de *Thermus thermophilus* con valores de 1, 1.2 y 1.6 Å a 27, 77 y 127 °C, respectivamente, no obstante, en la proteína de choque-frío de *Bacillus caldolyticus*, el  $RMSF_{prom}$  aumentó en el intervalo de temperatura de 27-77 °C (con valores de 0.8, 1.0 Å, respectivamente) sin presentar diferencia significativa en el intervalo de 77-127 °C (al presentarse valores de 1.0 y 1.0 Å, respectivamente). Al comparar los resultados de este trabajo con los reportados por los autores antes mencionados, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* presenta valores de  $RMSF_{prom}$  más elevados, probablemente debido a su termoestabilidad y temperatura óptima más alta que las enzimas anteriormente mencionadas, lo que se refleja en una mayor flexibilidad, mientras que a temperaturas bajas presenta una estructura más rígida, lo cual es consistente con el hecho de que las enzimas hipertermófilas, presentan baja o nula actividad a temperatura ambiente (Basu & Sen, 2013; Jana *et al.*, 2020).



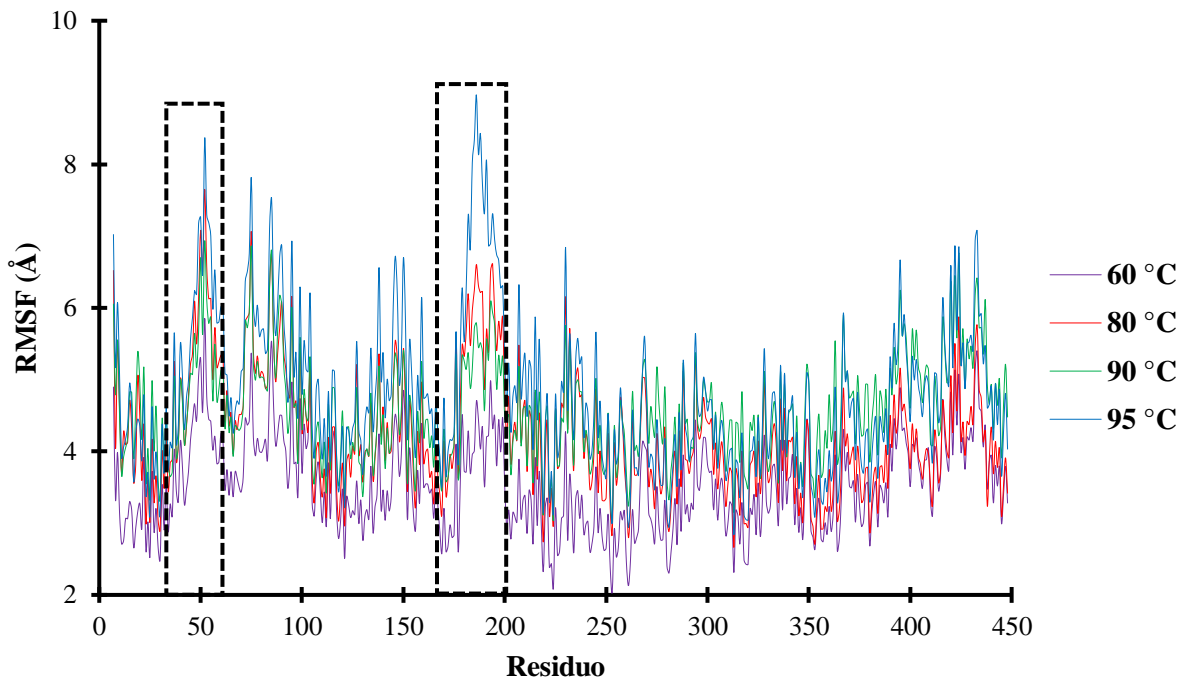


Fig. 19 RMSF (3,500 frames) de la estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a diferentes temperaturas. El rectángulo negro punteado señala las regiones de aminoácidos con mayores fluctuaciones en los valores de RMSF.

De acuerdo con la **Fig. 19** se observan dos regiones de aminoácidos en las que se presentan las mayores fluctuaciones, con valores de RMSF en el intervalo de 3.2-8.3 Å para la región de aminoácidos 38-66 y valores de RMSF de 2.8 a 8.9 Å en la región 170-202. Al realizar el análisis de la estructura 3D de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* se encontró que estos residuos se localizan en regiones de loops expuestos a la superficie. Para que la enzima pueda adaptarse a las condiciones térmicas establecidas, los loops tienden a tener una mayor fluctuación, esto debido a que al entrar en contacto con las moléculas de agua se propician interacciones intermoleculares de los segmentos flexibles (Basu & Sen, 2013; Jana *et al.*, 2020). Resultados similares fueron reportados por Mohamadnezhadi *et al.* (2019) en el que la adenilato quinasa termófila de *Bacillus stearothermophilus* exhibió dos regiones de aminoácidos expuestas a la superficie, las cuales mostraron altas fluctuaciones en los valores de RMSF, así como un aumento en la flexibilidad de los aminoácidos en la simulación de la DM a 55 °C (temperatura óptima de la enzima) indicando que a dicha temperatura se presenta la flexibilidad óptima de la enzima y se propician interacciones que la estabilizan. Con base en este argumento y con los resultados previamente obtenidos se podría afirmar que, a 95 °C, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* presenta una flexibilidad óptima y una estructura estable que le permite desplegar su máxima actividad hidrolítica y de transglicosilación.

Debido a que los cambios estructurales alrededor del sitio catalítico juegan un rol importante en la regulación de la actividad enzimática, se realizó un acercamiento en la región de aminoácidos 30-300, la cual comprende los aminoácidos pertenecientes al sitio activo (32, 34, 64, 66, 67, 128, 129, 171, 222, 224, 254, 266, 290). En la **Fig. 20a** se observa que en la DM a 60, 80, 90 y 95 °C, los valores de RMSF incrementan en

la región que comprende los residuos 170-198 (cuadro negro punteado) presentando un valor máximo de 8.9 Å a 95 °C, en esta región se encuentra el aminoácido catalítico Tyr171, el cual pertenece a la bolsa hidrofóbica que encierra el C-6 exo-cíclico del grupo metilo de la fucosa, por lo que podría influir en la actividad catalítica de la enzima (Sulzenbacher *et al.*, 2004). Resultados similares fueron obtenidos para una celulasa de *Trichoderma reesei*, la cual presentó incrementos en los valores de RMSF en la región de los loops que albergan el sitio activo cuando la temperatura de simulación varió de 27 a 77 °C, indicando que estas regiones se vuelven más flexibles a medida que se incrementa la temperatura debido a la sensibilidad térmica de estos residuos (Jiang *et al.*, 2017). Por otra parte, la  $\beta$ -glucosidasa de *Halothermothrix orenii* mostró un incremento en los valores de RMSF en la región que comprende el sitio catalítico en el intervalo de temperatura de 27-177 °C (Konar *et al.*, 2019)

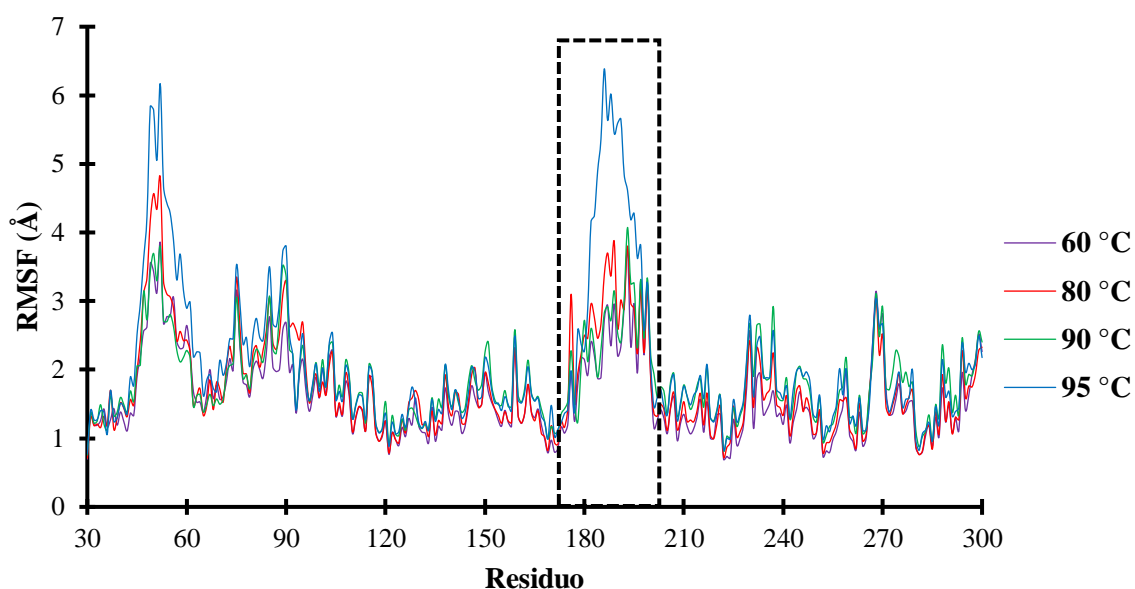


Fig. 20 RMSF (3500 frames) de los residuos del sitio catalítico de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. marítima* a diferentes temperaturas. El rectángulo negro punteado señala las regiones de aminoácidos con mayores fluctuaciones en los valores de RMSF.

Es notorio que el aumento en la temperatura originó un incremento en la flexibilidad de la estructura secundaria de la fucosidasa, este fenómeno permite que la enzima realice los movimientos estructurales necesarios para la catálisis. Sin embargo, es importante trabajar en el intervalo de temperatura en el que la proteína es estable; al aumentar demasiado la temperatura, se debilitan las interacciones que estabilizan la enzima, en cambio, si la temperatura es muy baja su flexibilidad disminuye y se reduce su actividad (Fields *et al.*, 2015). En este trabajo se documentó el incremento en la actividad hidrolítica y de transfucosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. marítima* con la temperatura, este fenómeno estaría relacionado con el aumento en la flexibilidad de los aminoácidos.

### 9.9.3. Estructura secundaria

En la **Fig. 21** se muestra la comparación final de la simulación de la estructura de la columna del  $C\alpha$  tomando como referencia la conformación de la enzima a 60 °C y comparando con la estructura a 80, 90, 95 y 200 °C. En esta figura se observan desplazamientos en las estructuras entre las diferentes temperaturas. También se destacan los cambios en la estructura secundaria en torno a la región del sitio activo (círculo negro), donde se aprecia que el incremento de temperatura ocasionó la transición de  $\alpha$ -hélices hacia conformaciones en desorden, esta modificación en la estructura secundaria explicaría los cambios en la actividad catalítica de la enzima al aumentar la temperatura, que además es lógica si consideramos que los puentes de hidrógeno son los que suelen mantener las estructuras helicoidales pero, al mismo tiempo son interacciones lábiles a la temperatura. Resultados similares fueron reportados por Kony *et al.* (2007) quienes establecieron que el incremento de temperatura en las simulaciones de DM se caracterizan por la pérdida progresiva del contenido de la estructura secundaria y terciaria de las enzimas.

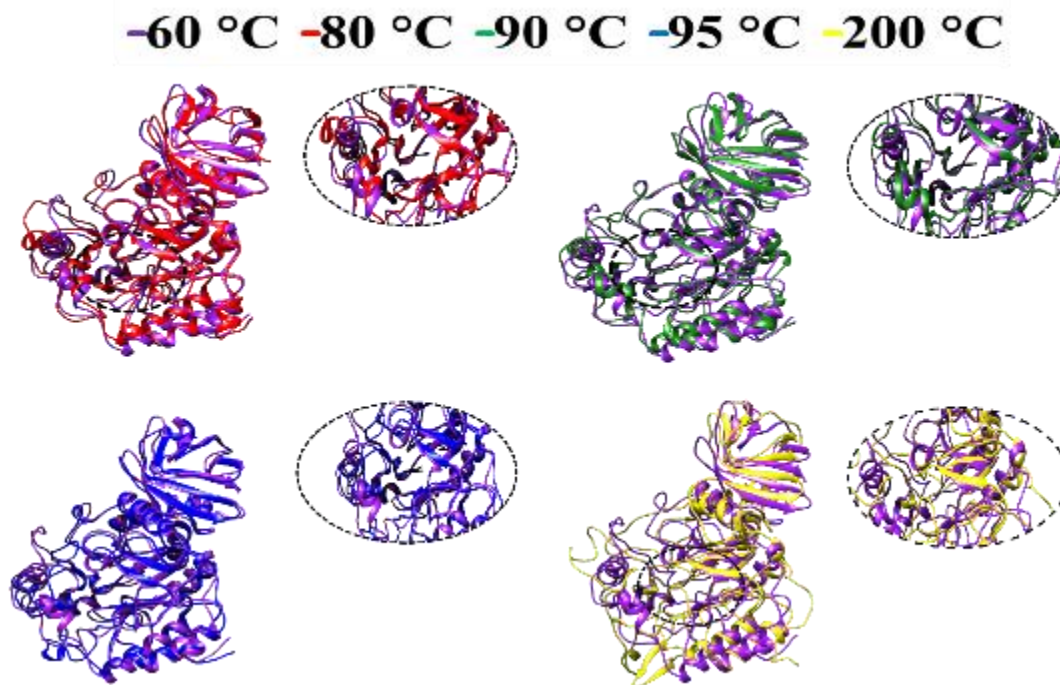


Fig. 21 Alineamiento de la columna de los átomos  $C\alpha$  de la última configuración de la enzima en la simulación de la DM a diferentes temperaturas. El óvalo negro en la figura indica la región del sitio catalítico.

Las hojas- $\beta$  son el resultado del ensamblaje de varias hebras- $\beta$  que se estabilizan mediante puentes de hidrógeno (Reeb & Rost, 2018). En la **Fig. 22** no se observan cambios estructurales considerables en el

intervalo de temperatura de 60-95 °C (16.4-19.8%), además, no se observa un patrón en los cambios en la presencia de  $\alpha$ -hélices y hélices-3<sub>10</sub> en las diferentes temperaturas de simulación. La conservación de las estructuras de hojas- $\beta$  a pesar del incremento de temperatura en la DM es indicativa de la termoestabilidad de la enzima. En la **Fig. 22** se observa que la estructura secundaria de giros no presentó variaciones significativas en el intervalo de temperatura de 60-95 °C. Sin embargo, a 200 °C, si se registró un aumento en este tipo de estructura. La estructura de giros representa un papel importante en la estabilidad e interacciones de la proteína (Kountouris & Hirst, 2010), por lo que se puede asumir que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* presenta una estructura estable en el intervalo de 60-95 °C. Respecto a la estructura de puentes aislados (la cual se encuentra dentro de la categoría de conformación irregular), es menor a 90 °C en comparación con el resto de las temperaturas de la DM y aumentó ligeramente con el incremento de temperatura hasta 95 °C.

Seelig & Schönfeld (2016) reportaron mediante calorimetría diferencial de barrido y dicroísmo circular en una lisozima de huevo que el aumento en la temperatura induce la transición de  $\alpha$ -hélices hacia una estructura en desorden, provocando que la enzima transite de un estado plegado a uno desplegado. De forma similar, Meersman *et al.* (2010) reportaron la pérdida de la estructura  $\alpha$ -hélices y hélices-3<sub>10</sub> en una lisozima de huevo después de la equilibración de DM a 27, 32, 42 y 227 °C, así como al final de la trayectoria de DM a 227 °C. Este tipo de comportamiento coincide con el mostrado por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, la cual presentó una disminución de  $\alpha$ -hélices con el subsecuente aumento de estructuras en desorden a temperaturas superiores a 60 °C, lo que induce la transición del estado plegado a desplegado de la enzima tal y como observamos con el aumento en los valores de RMSD (**Fig. 18**).

El efecto de la temperatura sobre los cambios conformacionales de las estructuras secundarias de enzimas ya ha sido descrito previamente. Lee (2012) reportó que la proteína hipertermofílica ribosomal L30e de *Thermococcus celer* no mostró cambios significativos en el contenido de  $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$  entre las temperaturas de simulación de 27 y 77 °C. Por su parte, Jana *et al.* (2020) registraron cambios en la estructura secundaria de dos enzimas hipertermofílicas por efecto del incremento en la temperatura: una hidrolasa de *Thermus thermophilus* la cual presentó una disminución en el contenido de hojas- $\beta$  y hélices-3<sub>10</sub> así como un aumento en la estructura de giros y estructuras irregulares, mientras que la proteína de choque-frío de *Bacillus caldolyticus* mostró una disminución de hojas- $\beta$ . Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con las enzimas reportadas por los autores antes mencionados, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* no presentó una disminución considerable en las estructuras que estabilizan la proteína (hojas- $\beta$ ,  $\alpha$ -hélices y puentes aislados), probablemente debido a que la rigidez en su estructura proporciona una mayor estabilidad a temperaturas elevadas en comparación con las enzimas reportadas por los autores mencionados.

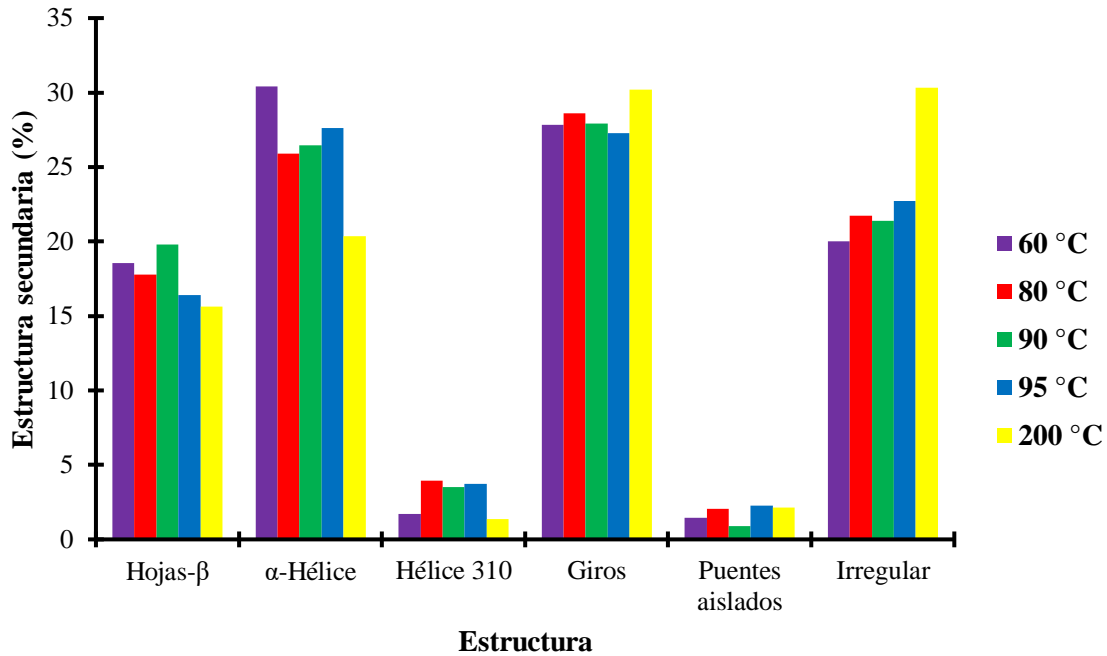


Fig. 22 Efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

Los cambios estructurales del sitio catalítico juegan un rol importante en la regulación de la actividad enzimática. Por ello, se analizó el efecto de la temperatura en el intervalo de aminoácidos que involucran esta región (30-300), en consonancia con el análisis realizado en la sección anterior (8.9.2). En la Fig. 23 se observa que la temperatura tiene efectos variables sobre la estructura secundaria de la enzima. Sin embargo, resalta que el incremento de temperatura provoca una disminución en la presencia de  $\alpha$ -hélices, así como un notable aumento en la presencia de la estructura irregular. Este comportamiento explicaría la pérdida de actividad enzimática a temperaturas elevadas, coincidiendo con la disminución en la vida media de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* de 134 a 4.4 min al incrementar la temperatura de 50 a 95 °C (Zeuner *et al.*, 2018a). Por otro lado, Konar *et al.* (2019) determinaron mediante DM cambios en el sitio activo de una  $\beta$ -glucosidasa de *Halothermothrix orenii* a temperaturas de 27, 62 y 102 °C.

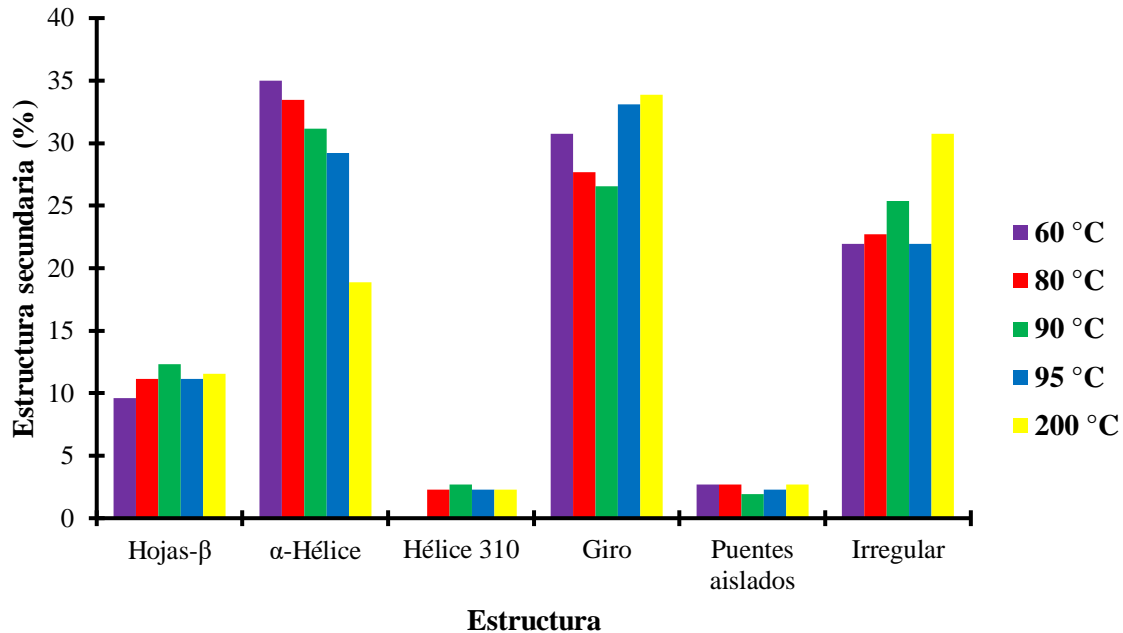


Fig. 23 Efecto de la temperatura sobre la estructura secundaria en la región de aminoácidos del sitio catalítico (30-300) de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

#### 9.9.4. Conformación del sitio activo

Las enzimas son biomoléculas flexibles cuya estructura varía entre distintos estados estructurales/conformacionales (cerrado, semi-abierto o intermedio y abierto). Diversos factores como la temperatura o la unión del sustrato al sitio activo de la enzima ocasionan cambios estructurales por lo que las proteínas presentan distintos estados conformacionales, lo cual se ve reflejado en su actividad catalítica (Hoepfner *et al.*, 2013; Klontz *et al.*, 2020). Como se observó anteriormente, la flexibilidad de la enzima es mayor conforme incrementa la temperatura. Para observar las distintas conformaciones que pudo adoptar el sitio activo de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* por efecto de la temperatura, se midió la distancia entre los  $C\alpha$  de sus aminoácidos catalíticos Asp224 y Glu266 durante la DM.

En la **Fig. 24** se observa que, a temperaturas de 60, 80, 90 y 95 °C la  $\alpha$ -L-fucosidasa adopta principalmente una conformación intermedia, donde el Asp224 y Glu266 están a una distancia de 5.5-8 Å. Sin embargo, a 60 °C se obtuvo una conformación cerrada con menor frecuencia, donde el. Mientras que, a 200 °C, la enzima presentó con mayor frecuencia una conformación abierta, donde el Asp224 y Glu266 están a una distancia de > 8 Å. De acuerdo con lo reportado previamente en este trabajo, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* presentó mayor actividad hidrolítica a 60 °C y mayor actividad de transfucosilación a 95 °C, por lo que podemos decir que la conformación del sitio activo es importante para el tipo de reacción catalítica que lleva a cabo la enzima.

Mientras que, a 200 °C, la enzima presenta un aumento notable en la conformación abierta en comparación con las otras temperaturas, lo que sugiere cambios importantes en la conformación del sitio activo.

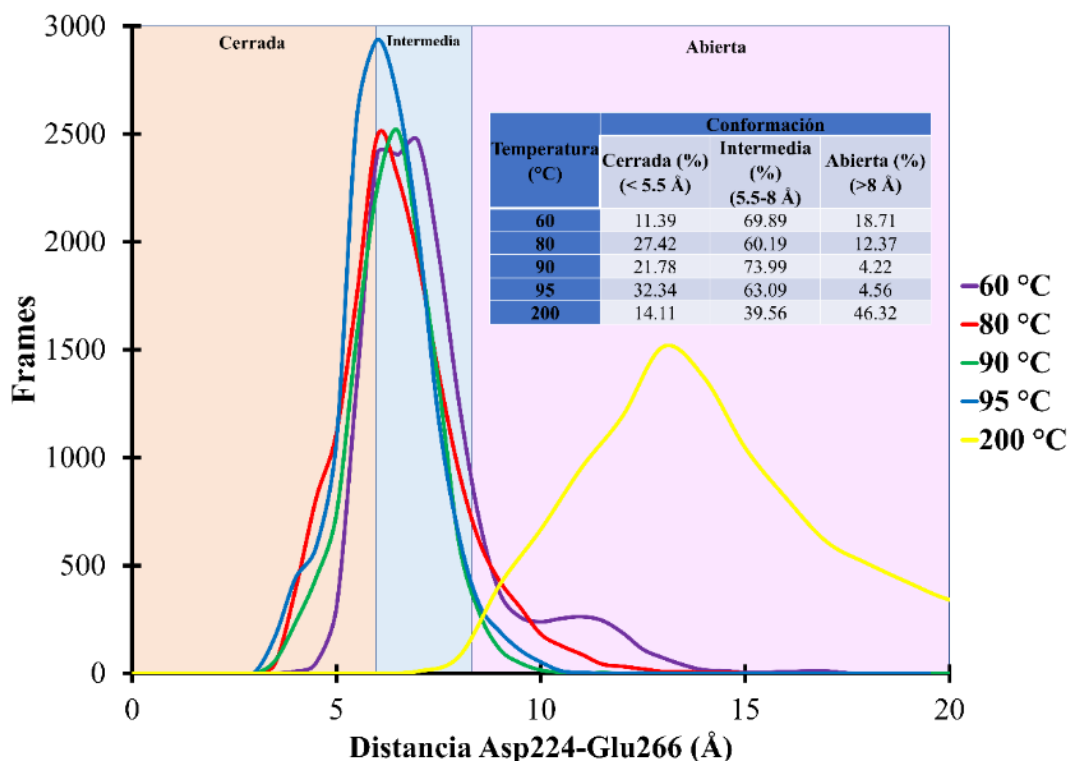


Fig. 24 Efecto de la temperatura en los distintos estados estructurales/conformacionales de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* determinados por la distancia que separa los aminoácidos Asp224 y Glu266.

Al comparar con los resultados experimentales obtenidos previamente en donde a 95 °C se obtuvo la mayor actividad enzimática, se podría afirmar que la conformación ideal para que la fucosidasa de *T. maritima* lleve a cabo su actividad de transfucosilación es cuando presenta una conformación intermedia. Resultados similares han sido reportados por No obstante, nuestros resultados, difieren a los reportados otros autores, por ejemplo Sakurama *et al.* (2012) determinaron una mayor actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Bifidobacterium bifidum* cuando exhibe una conformación cerrada, donde el Glu217 se posiciona a 5.8 Å del nucleófilo Asp172 para actuar como ácido/base general y asistir la catálisis. Por otra parte, Klontz *et al.* (2020) registraron una mayor actividad de transglicosilación en la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Lactobacillus casei* cuando presenta una conformación abierta, donde el nucleófilo Asp242 se encuentra a una distancia >14 Å del

ácido/base Asp200. Estas diferencias podrían deberse a la distancia de los aminoácidos catalíticos consideradas para establecer las distintas conformaciones que puede adoptar el sitio activo de la enzima.

## 9.10. Análisis del acoplamiento molecular

De acuerdo con Sulzenbacher *et al.* (2004) el sitio activo de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* se localiza en una pequeña bolsa formado por el C-terminal y la hojas- $\beta$  del barril central ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. En la **Fig. 25** obtenida a partir de la estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* en complejo con fucosa (PDB 1ODU) se observan los tipos de interacción de los aminoácidos del sitio catalítico con el ligando: la His129, Glu66 y Tyr67 interaccionan con el OH del C2 de la fucosa mediante puentes de hidrógeno, mientras que la His128 e His32 estabilizan el OH en posición axial del C4 de la fucosa mediante un puente de hidrógeno. Por su parte, las cadenas laterales de Phe32, Tyr171, Trp222 y Phe290 forman una bolsa hidrofóbica e interactúan con la fucosa mediante fuerzas de van der Waals. Además, se observa la presencia de dos aminoácidos claves para la catálisis: Asp224 y Glu266, donde el primero actúa como nucleófilo catalítico atacando el centro anomérico de la glicona generando el intermediario glicosil-enzima, mientras el segundo actúa como ácido/base general.

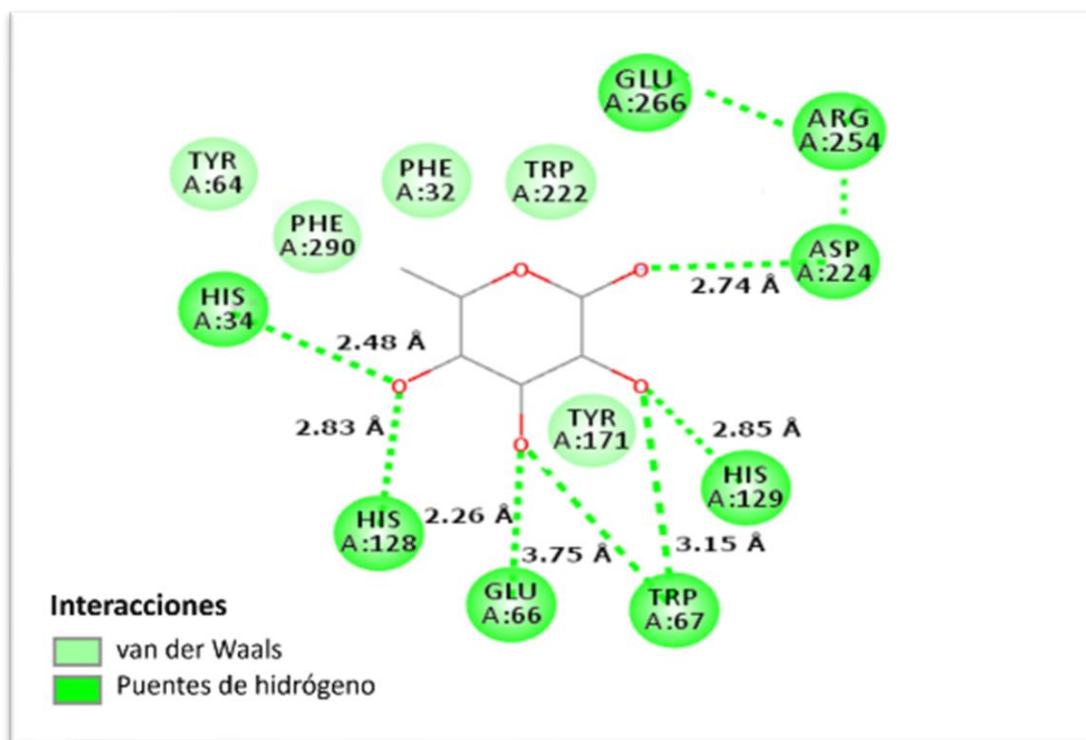


Fig. 25 Acoplamiento del ligando L-fucosa en el sitio activo del receptor ( $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*).



Para evaluar el efecto de la temperatura en la interacción del ligando con la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, se realizó el acoplamiento molecular con dos ligandos: L-fucosa y *p*NP-Fuc. Se tomaron dos criterios para elegir el complejo ligando-proteína más estable. El primero, que el ligando interactuara con los aminoácidos catalíticos Asp224 y Glu266, así como con los aminoácidos pertenecientes al sitio de unión reportados para esta enzima (Sulzenbacher *et al.* 2004) y el segundo, que el acoplamiento presentara la menor energía libre de unión. Además, se calcularon los parámetros termodinámicos de entalpía ( $\Delta H$ ) y entropía ( $\Delta S$ ) empleando la ecuación de van't Hoff (Ecuación 12):

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \frac{\Delta S}{R} \dots \text{Ecuación 12}$$

En la **Tabla 7** se muestra la energía libre de unión expresada como energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ , kJ/mol) así como la constante de unión ( $K_b$ , mM) para el complejo formado entre la  $\alpha$ -L-fucosidasa y cada uno de los ligandos. En el complejo formado entre la  $\alpha$ -L-fucosidasa y L-fucosa se observa una disminución en los valores de  $\Delta G$  con el incremento de temperatura, lo que indica que existe una mayor estabilidad en el complejo enzima-sustrato con el cristal procedente de la DM realizada a 95 °C. Pérez-Escalante *et al.* (2020) determinaron una  $\Delta G$  de -25.1 kJ/mol, la cual es menor a la reportada en este trabajo, la diferencia con los valores obtenidos en este trabajo podría deberse diferentes factores: la diferente estructura cristalográfica empleada (PDB 1ODU), al tamaño y ubicación de la caja, parámetros del algoritmo de búsqueda y tipo de acoplamiento empleado; lo cual influye en las diversas conformaciones que adopta el ligando en la enzima.

Asimismo, en la **Tabla 7** se muestra el efecto de la temperatura en la  $K_b$ , la cual aumenta conforme el incremento de temperatura, lo que sugiere que la temperatura ocasiona cambios estructurales en la enzima con lo que podría haber incrementado la afinidad de la enzima por el sustrato.

Tabla 7. Efecto de la temperatura en la energía libre de unión y constante de afinidad del complejo formado entre la  $\alpha$ -L-fucosidasa con dos ligandos: L-Fucosa y *p*NP-Fuc a pH 8.

Temperatura (°C)	L-Fucosa		<i>p</i> NP-Fuc	
	$\Delta G$ (kJ/mol)	$K_b$ (mM)	$\Delta G$ (kJ/mol)	$K_b$ (mM)
60	-16.98	0.943	-18.70	1.8
80	-18.70	1.538	-20.04	3.225
90	-19.24	1.886	-22.25	3.703
95	-22.59	9.090	-23.30	12.5

Adicionalmente, con base a los datos obtenidos del gráfico de van't Hoff (**Fig. 26**) se determinaron los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  de 0.051 kJ/mol y 208.12 J/mol.K, respectivamente, estos valores reflejan la naturaleza endotérmica y de desorden del complejo formado entre la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* y L-fucosa. Además, de acuerdo con lo reportado por Suryawanshi *et al.*, (2016) el complejo formado entre la enzima y el sustrato presenta principalmente interacciones hidrofóbicas ( $\Delta H > 0$  y  $\Delta S > 0$ ). El efecto de la interacción  $\alpha$ -L-fucosidasa con L-fucosa en los parámetros termodinámicos ha sido descrita previamente. Hoebeke *et al.* (1979) determinaron mediante el método de fluorescencia, valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  de -51.88 kJ/mol y 840 J/mol\*K, respectivamente en la  $\alpha$ -L-fucosidasa de placenta humana en complejo con L-fucosa, lo que implica que el complejo presenta principalmente interacciones del tipo fuerzas electrostáticas. La diferencia de los resultados

reportados en este trabajo con el autor previamente mencionado podría deberse al origen de la enzima y al diferente método empleado.

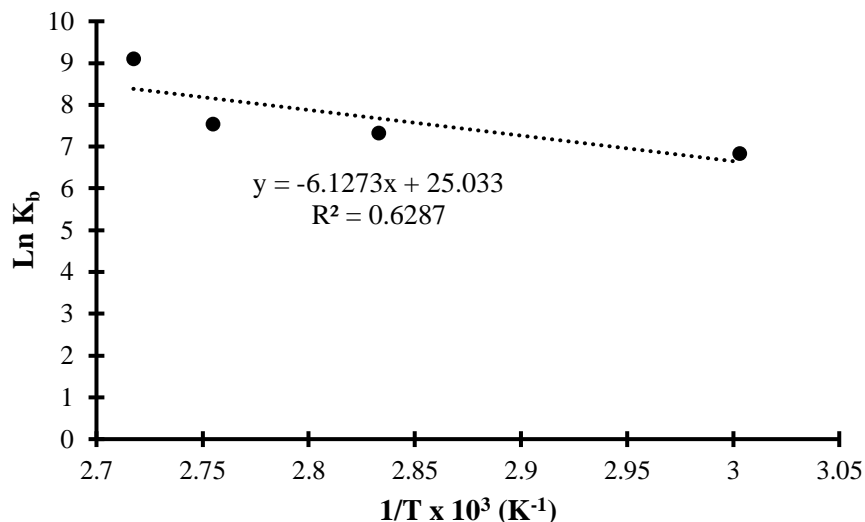


Fig. 26 Gráfico de van't Hoff para las constantes de unión ( $K_b$ ) a 60, 80, 90 y 95 °C calculadas en función de los datos obtenido del acoplamiento molecular para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* en complejo con L-fucosa.

Por otro lado, en la **Fig. 27** es posible observar que el ligando L-fucosa adopta distintas conformaciones en el sitio activo de la enzima. No obstante, en todas ellas la L-fucosa interacciona con los aminoácidos Asp224 y Glu266 (que fue uno de los criterios para validar el acoplamiento) aunque de diferente manera. Por ejemplo, en el cristal control (cristal no sometido a simulación de DM) el OH del C3 de la fucosa interactúa, mediante puentes de hidrógeno, con el Asp224 y el OH del C4 de la fucosa lo hace con el Glu266 (**Fig. 27a** y **Anexo 12.9a**). Mientras que, en el cristal procedente de la DM a 60 °C, la fucosa interactúa con el Asp224 a través de los OH de los C1 y C2 a través de puentes de hidrógeno y con el Glu266 a través del OH del C3 (**Figura 27b** y **Anexo 12.9b**). Por otra parte, en el cristal de la simulación a 80 °C, el Asp224 interacciona con el OH del C1 y C2 de la fucosa mediante puentes de hidrógeno y el Glu266 por fuerzas de van der Waals (**Figura 27c** y **Anexo 12.9c**). Por su parte en el acoplamiento con el cristal procedente de la DM a 90 °C, el Asp224 interactúa con el OH del C1 y C2 de la fucosa, además se observa la interacción con otros aminoácidos catalíticos como el Glu66 y la His128-129 (**Figura 27d** y **Anexo 12.9d**). Asimismo, se observa que para el cristal de la simulación a 95 °C (**Figura 27e** y **Anexo 12.9e**) el OH del C4 de la fucosa interacciona con el Asp224 y el OH del C1 con el Glu266. Es importante resaltar que de entre los cristales procedentes de la simulación de DM, el cristal de la simulación a 95 °C presentó una mayor interacción con los aminoácidos reportados como catalíticos para esta enzima (aunque interactuando de diferente forma) y una menor distancia entre los puentes de hidrógeno mediante los que interactúa con el Asp224 y Glu266. Estas diferentes interacciones podrían explicar las diferentes energías libres de unión obtenidas.

Cabe mencionar que también se realizó el acoplamiento molecular con el cristal procedente de la simulación a 200 °C. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron considerados, ya que como se observa en la **Fig. 27f** el ligando (L-fucosa) no se ubica dentro del sitio activo de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* y por lo tanto no reacciona con los aminoácidos responsables de la catálisis sin los cuales no podría llevarse a

cabo la reacción. Esto podría deberse al efecto de la alta temperatura en la estructura del sitio activo de la enzima.

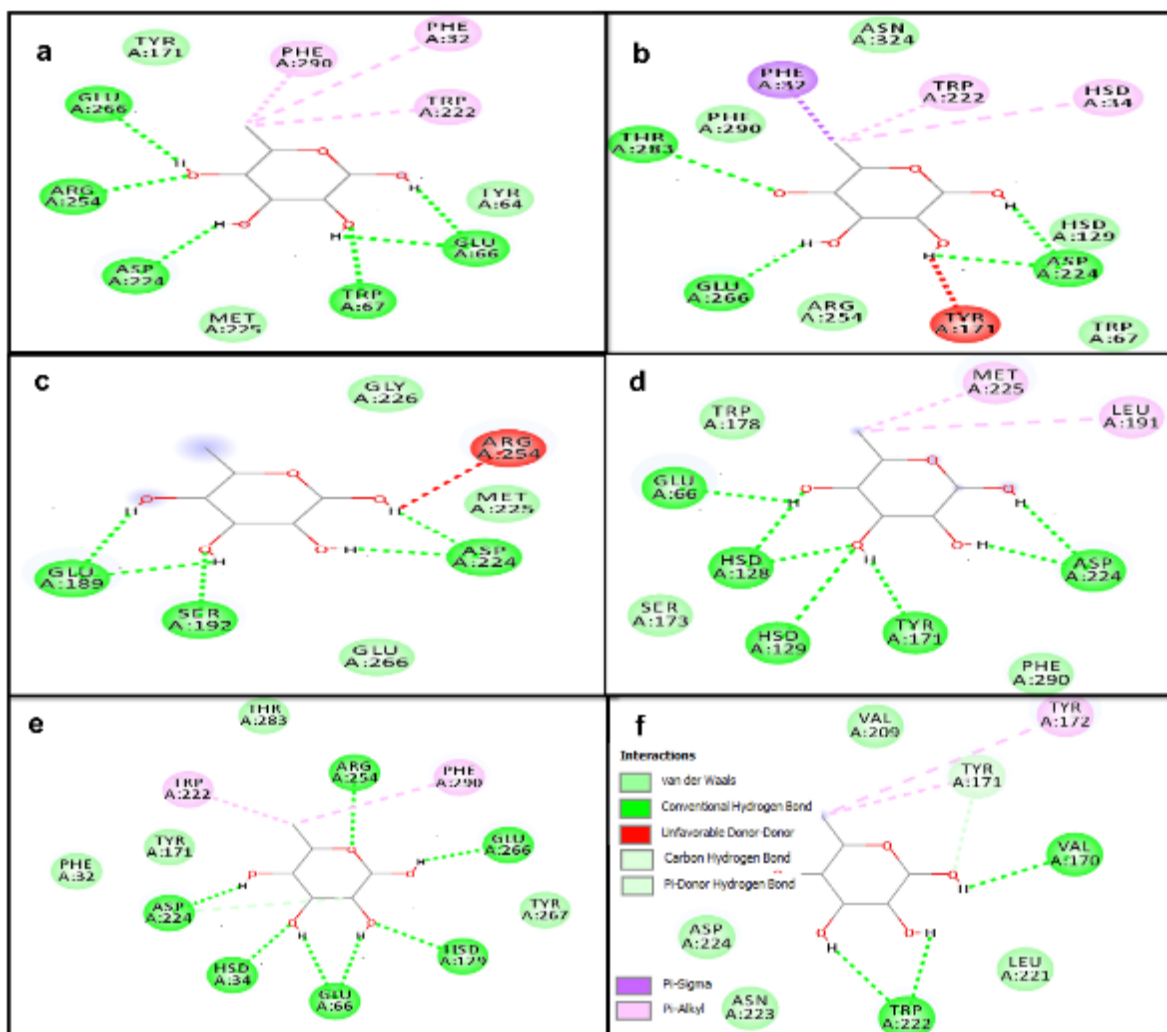


Fig. 27 Efecto de la temperatura en interacción  $\alpha$ -L-fucosidasa-fucosa. a) Control, b) 60 °C, c) 80 °C, d) 90 °C, e) 95 °C y f) 200 °C.

De igual manera, en la **Tabla 7** también se muestran los valores de  $\Delta G$  y  $K_b$  del complejo formado entre la  $\alpha$ -L-fucosidasa y *p*NP-Fuc. En ella se observa que a medida que aumenta la temperatura disminuye el  $\Delta G$  mientras que la  $K_b$  aumenta, lo que sugiere que los cambios estructurales de la enzima por aumento de la temperatura crean conformaciones más estables. Konar *et al.* (2019) reportaron mediante DM que la temperatura no ejerce cambios significativos en el complejo glucosa- $\beta$ -glucosidasa de *Halothermothrix orenii*, por el contrario, en este trabajo se observa una clara influencia del efecto de la temperatura, la cual al incrementarse ayudó a disminuir la energía libre de unión en el complejo ligando-receptor. Pérez-Escalante *et al.* (2020) realizó el acoplamiento molecular de la *p*NP-Fuc en complejo con la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

(PDB 1ODU) obteniendo un valor de  $\Delta G$  de  $-24.68$  kJ/mol. Asimismo, en la **Tabla 7** se muestran los valores de  $K_b$  de la  $\alpha$ -L-fucosidasa para el *p*NP-Fuc, los valores fluctúan entre 1.8 y 12.5 M.

Por otra parte, con base en los valores obtenidos del gráfico de van't Hoff para el complejo formado por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* y *p*NP-Fuc (**Fig. 28**) se calcularon los parámetros de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  registrándose valores de  $0.043$  kJ/mol y  $192.36$  J/mol\*K, respectivamente lo que sugiere interacciones hidrofóbicas en el complejo formado. Los datos obtenidos, indican una naturaleza endotérmica y de desorden en el complejo formado, lo cual coincide con los altos valores de  $E_a$  obtenidos en este trabajo. Resultados similares han sido reportados para otras enzimas hipertermofílicas. Por ejemplo, Mehmood *et al.* (2014) reportaron valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  de  $0.67$  kJ/mol y  $-0.10$  kJ/mol.K, respectivamente, para la  $\beta$ -glucosidasa de *T. maritima* en complejo con *p*NP-Glucosa. Además, de acuerdo con Suryawanshi *et al.*, (2016) el complejo formado presenta principalmente interacciones hidrofóbicas.

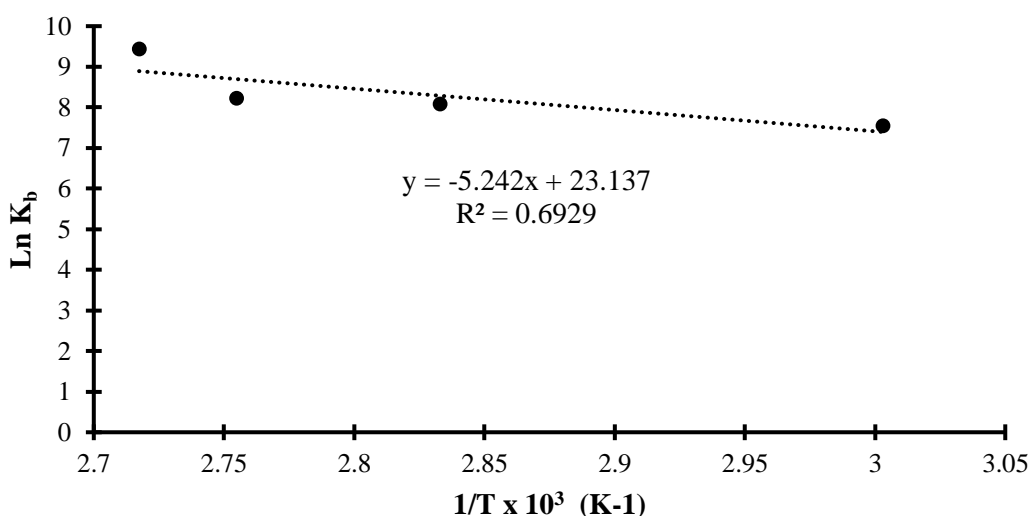


Fig. 28 Gráfico de van't Hoff para las constantes de unión ( $K_b$ ) a 60, 80, 90 y 95 °C, calculadas a partir del acoplamiento molecular para la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* en complejo con *p*NP-Fuc.

En la **Fig. 29** se aprecian las distintas interacciones del ligando *p*NP-Fuc con los aminoácidos de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. En ella se observa que, para todos los cristales procedentes de la DM realizadas a diferentes temperaturas, el *p*NP-Fuc interactúa con los aminoácidos catalíticos Asp224 y Glu266 (al igual que con el ligando L-fucosa; **Fig. 27**), aunque adoptando diferentes tipos de interacciones. En el cristal control, la molécula de fucosa del *p*NP-Fuc interactúa con el Asp224 mediante fuerzas de van der Waals, mientras que, el OH del C4 de la fucosa interacciona mediante puentes de hidrógeno con el Glu266 (**Fig. 29a** y **Anexo 12.10a**). En el cristal perteneciente a la DM a 90 °C, el Asp224 interactúa a través de puentes de hidrógeno con el OH del C2 y C3 de la molécula de fucosa, mientras que con el Glu266 lo hace mediante fuerzas de van der Waals. Por su parte, en el cristal procedente de la DM a 95 °C (**Fig. 29e** y **Anexo 12.10e**) se obtuvo un acoplamiento similar a lo reportado por Sulzenbacher *et al.* (2004) donde el ligando se ubica dentro de la bolsa hidrofóbica compuesta por los aminoácidos aromáticos Phe32,290, Trp222 y Tyr171, además de interactuar

mediante puentes de hidrógeno a los aminoácidos Arg254, Asp222, His34,129 y Glu 66 y mediante fuerzas de van der Waals con el Glu266, esta conformación influyó en la obtención de la menor energía de unión de entre los cristales procedentes de la DM a diferentes temperaturas.

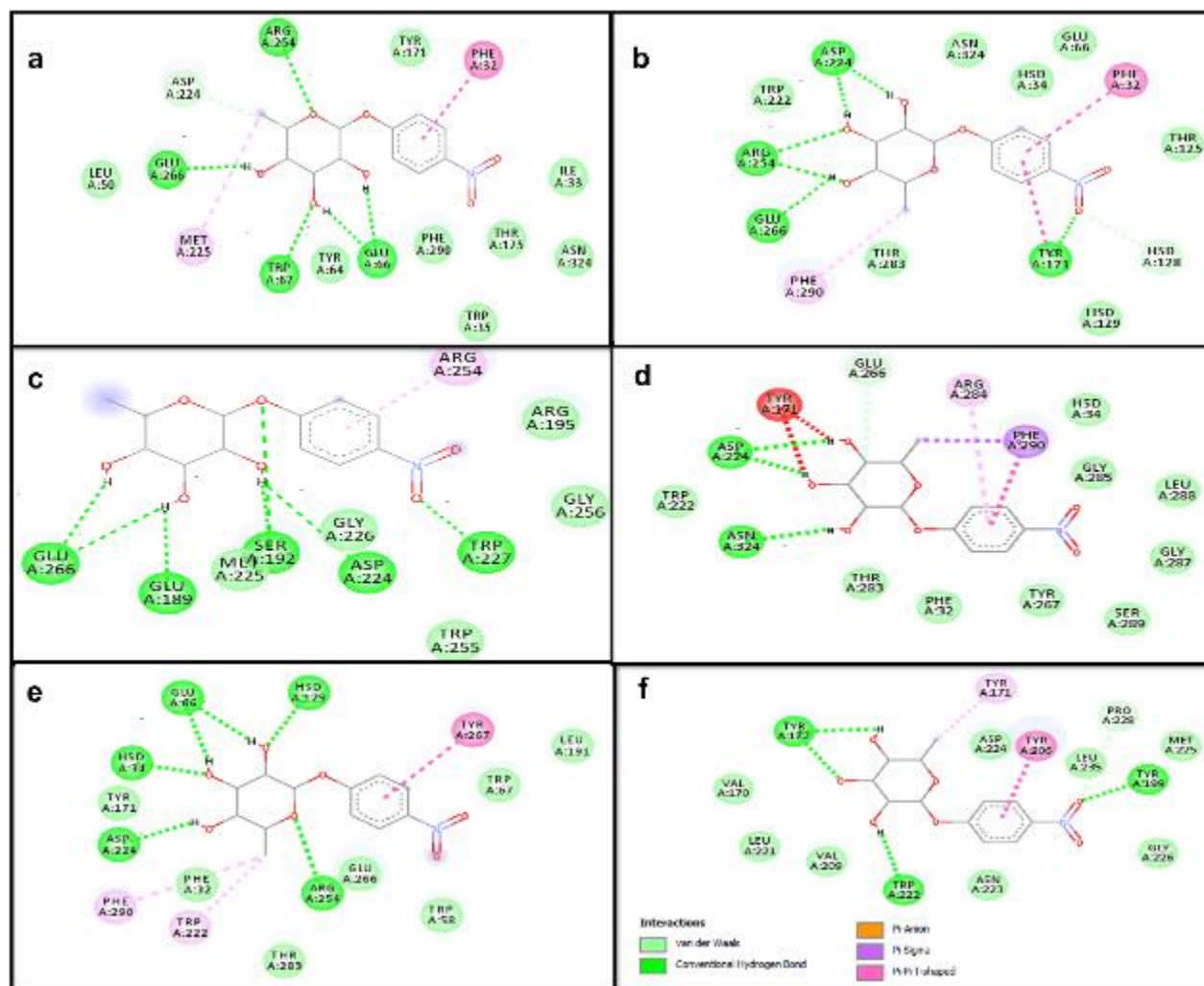


Fig. 29 Efecto de la temperatura en la formación en la interacción de  $\alpha$ -L-fucosidasa y pNP-Fuc procedente de la DM. a) Control, b) 60 °C, c) 80 °C, d) 90 °C, e) 95 °C y f) 200 °C.

Igualmente, se realizó el acoplamiento molecular con la estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa procedente de la simulación de DM a 200 °C. Sin embargo, un efecto similar al encontrado en la interacción con la fucosa se repitió. Los valores de  $\Delta G$  y  $K_b$  obtenidos no fueron considerados en este trabajo ya que, como se observa en la **Fig. 29f** el ligando pNP-Fuc no se ubicó dentro del sitio activo de la enzima y por lo tanto no interactuaba con los aminoácidos catalíticos reportados para esta enzima.

Con respecto a los valores de  $\Delta G$  presentados por el complejo  $\alpha$ -L-fucosidasa con los ligandos fucosa y *p*NP-Fuc (**Tabla 7**) se observan valores cercanos. Resultados similares fueron reportados por Pérez-Escalante *et al.* (2020) quienes reportaron no haber obtenido diferencia significativa en los valores de  $\Delta G$  en el acoplamiento molecular de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* en complejo con L-fucosa y *p*NP-Fuc con valores de -25.1 y -24.68 kJ/mol respectivamente, lo que indica la estabilidad en la formación de ambos complejos. De igual forma, los valores obtenidos de  $\Delta H$  para L-Fucosa (0.051 kJ/mol) y *p*NP-Fuc (0.043 kJ/mol) sugieren una naturaleza endotérmica en la formación del complejo, mientras que, de acuerdo con los valores de  $\Delta S$  tanto el complejo formado entre la enzima y el ligando L-fucosa o *p*NP-Fuc sugieren la naturaleza en desorden del complejo dados los valores obtenidos de 208.12 y 192.36 J/mol.K, respectivamente. Finalmente, se observan interacciones de tipo hidrofóbicas en ambos complejos formados.

## 10. Conclusiones

En este trabajo se estudió la actividad hidrolítica y de transglicosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* tanto en medio convencional como no-convencional. En medio convencional, tanto para la actividad hidrolítica como de transglicosilación se establecieron las mejores condiciones de trabajo a pH 8 y 95 °C, bajo estas condiciones se requirió de menor tiempo de reacción y de concentración de enzima para lograr la mayor productividad de oligosacáridos fucosilados (3.54 mM/h). Los resultados recopilados indican que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* puede catalizar la síntesis de oligosacáridos fucosilados en medios con disolventes orgánicos. Los mejores resultados en medio no convencional para la actividad hidrolítica se observaron en el medio con acetona y acetonitrilo, mientras que para la mejor actividad de transglicosilación se obtuvo en medio con acetona, en donde se obtuvo la mayor productividad de oligosacáridos (0.51 mM/h). Además, la adición de acetona o DMSO al medio cambió el equilibrio de la reacción favoreciendo la transglicosilación sobre la hidrólisis al obtenerse valores de  $r_{S/H}$  de 1.43 y 1.21, respectivamente, los cuales fueron más altos en comparación con el valor registrado en el ensayo de control ( $r_{S/H}$  0.39).

Por otro lado, las simulaciones de DM indicaron que el incremento de la temperatura induce cambios estructurales en la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* como lo demuestra el aumento de  $RMSD_{prom}$  y de  $RMSF_{prom}$  lo que explicaría el aumento en su actividad hidrolítica y de transglucosilación. El análisis en la estructura secundaria exhibió la conservación del contenido de estructuras que estabilizan la enzima como son las hojas- $\beta$  y puentes aislados, posiblemente debido a que la estabilidad de la enzima a temperaturas elevadas. Además, los resultados demuestran que la  $\alpha$ -L-fucosidasa adopta diferentes estados conformacionales al modificar la temperatura de simulación. Adicionalmente, al realizar el acoplamiento molecular de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* con L-fucosa y *p*NP-Fuc se observaron diferentes interacciones entre la enzima y los sustratos, reflejándose en una disminución en los valores de  $\Delta G$  y un aumento en los valores de  $K_b$  con el incremento de temperatura, sin presentar diferencia considerable entre ambos sustratos, sugiriendo la afinidad de la enzima por ambos sustratos, así como la estabilidad en la formación de ambos complejos.

## 11. Perspectivas

Dado que el uso de altas temperaturas en la síntesis de oligosacáridos fucosilados en combinación con periodos prolongados provocó una disminución en la síntesis del producto de reacción (trisacárido fucosilado), es probable que esté siendo empleado como precursor para la síntesis de oligosacáridos más complejos. Además, debido a que la adición de solventes modifica la regio-selectividad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* se recomienda la identificación de los compuestos sintetizados.

Debido a que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* presentó una buena estabilidad en presencia de DMSO, una mayor actividad de transglucosilación en relación con la actividad hidrolítica, , sería interesante combinar estos en conjunto con temperaturas de 90 y 95 °C, ya que a estas temperaturas se obtuvieron aumentos en ambas actividades.

Para validar los resultados obtenidos en la DM respecto a los cambios en la estructura secundaria de la enzima por efecto de la temperatura, se recomienda realizar el análisis de la estructura enzimática mediante la técnica de dicroísmo circular.

Para validar los valores de  $\Delta G$  y  $K_b$ , así como los parámetros termodinámicos  $\Delta H$  y  $\Delta S$  obtenidos en el acoplamiento molecular, se recomienda analizar el efecto de la temperatura en la enzima mediante la técnica de fluorescencia.



## 12. Bibliografía

- Abdul Manas, N. H., Md. Ilias, R., & Mahadi, N. M. (2018). Strategy in manipulating transglycosylation activity of glycosyl hydrolase for oligosaccharide production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 272–293. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1339664>
- Adlercreutz, P. (2017). Comparison of lipases and glycoside hydrolases as catalysts in synthesis reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), 513–519. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8055-x>
- Agoston, K., Hederos, M. J., Bajza, I. & Dekany, G. (2019). Kilogram scale chemical synthesis of 2'-fucosyllactose. *Carbohydrate Research*, 476, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.03.006>
- Ahumada, D., Arenas, F., Martínez-Gómez, F., Guerrero, C., Illanes, A., & Vera, C. (2020). Synthesis of Butyl-β-D-Galactoside in the Ternary System: Acetone/1-Butanol/Aqueous Solution. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(859). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00859>
- Ajisaka, K., Fujimoto, H., & Miyasato, M. (1998). An α-L-fucosidase from *Penicillium multicolor* as a candidate enzyme for the synthesis of transglycosylation of α (1→3)-linked fucosyl oligosaccharides by transglycosilation. *Carbohydrate Research*, 309, 125–129. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00112-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00112-8)
- Akkerman, R., Faas, M. M., & de Vos, P. (2019). Non-digestible carbohydrates in infant formula as substitution for human milk oligosaccharide functions: Effects on microbiota and gut maturation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1486–1497. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1414030>
- Azam, S. S., Uddin, R. & Wadood, A. (2012). Structure and dynamics of alpha-glucosidase through molecular dynamics simulation studies. *Journal of Molecular Liquids*, 174, 58-62. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.07.003>
- Baek, J. S., Kim, M. J., Cha, H., Lee, H.S., Li, D., Kim, J.W., Kim, Y.R., Moon, T.W. and Park, K. (2003). Enhanced transglycosylation activity of *Thermus* maltogenic amylase in acetone solution. *Food Science and Biotechnology*, 12(6), 639-643.
- Ballón, W., & Grados, R. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *CON-CIENCIA*, 7(2), 55–72.
- Bankova, E., Bakalova, N., Petrova, S. & Kolev, D. (2006). Enzymatic synthesis of oligosaccharides and alkylglycosides in water-organic media via transglycosylation of lactose. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 20(3), 114–119. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817387>
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A., & Boza, J. (2001). Componentes biológicamente activos de la leche materna. *Ars Pharmaceutica*, 42(1), 21–38.

- Basu, S. & Sen, S. (2013). Do homologous thermophilic-mesophilic proteins exhibit similar structures and dynamics at optimal growth temperatures? A molecular dynamics simulation study. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(2), 423–434. <https://doi.org/10.1021/ci300474h>
- Baumgärtner, F., Seitz, L., Sprenger, G. A. & Albermann, C. (2013). Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-40>
- Becker, D. J. & Lowe, J. B. (2003). Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13(7). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg054>
- Bell, G., Janssen, A. E. M. & Halling, P. J. (1997). Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(6), 471–477. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00204-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00204-9)
- Benešová, E., Lipovová, P., Dvořáková, H., & Králová, B. (2013).  $\alpha$ -L-fucosidase from *Paenibacillus thiaminolyticus*: Its hydrolytic and transglycosylation abilities. *Glycobiology*, 23(9), 1052–1065. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt041>
- Berteau, O., Bielicki, J., Kilonda, A., Machy, D., Anson, D. S., & Kenne, L. (2004).  $\alpha$ -L-Fucosidases: Exoglycosidases with unusual transglycosylation properties. *Biochemistry*, 43(24), 7881–7891. <https://doi.org/10.1021/bi036066z>
- Biesiada, J., Porollo, A., Velayutham, P., Kouril, M., & Meller, J. (2011). Survey of public domain software for docking simulations and virtual screening. *Human Genomics*, 5(5), 497–505. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-5-497>
- BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, Version v20.1.0.19295, San Diego: Dassault Systèmes, (2020).
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), 1147–1162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>
- Bode, L. (2013). Human milk oligosaccharids and their beneficial effects. Handboock of dietary and nutritional aspects of human breast milk. pp. 521–522. Países Bajos: Wageningen Academic.
- Bode, L. (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*, 91(11), 619–622. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
- Bode, L., & Jantscher-Krenn, E. (2012). Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(3), 383–391. <https://doi.org/10.3945/an.111.001404>
- Bondue, P., Crèvecoeur, S., Brose, F. & Daube, G. (2016). Cell-Free Spent Media Obtained from *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium crudilactis* Grown in Media Supplemented with 3' - Sialyllactose Modulate Virulence Gene Expression in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*. 7, 1460. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01460>

- Boon, M. A., Vant Riet, K., & Janssen, A. E. M. (2000). Enzymatic synthesis of oligosaccharides: Product removal during a kinetically controlled reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(4), 411–420. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001120\)70:4<411::aid-bit6>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001120)70:4<411::aid-bit6>3.0.co;2-w)
- Bridiau, N., Issaoui, N., & Maugard, T. (2010). The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1278–1289. <https://doi.org/10.1002/btpr.445>
- Cárdenas, R., Martínez-Seoane, J. & Amero, C. (2020). Combining experimental data and computational methods for the non-computer specialist. *Molecules*, 25(20), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25204783>
- Castillo, B., Bansal, V., Ganesan, A., Halling, P., Secundo, F., Ferrer, A., Griebenow, K. & Barletta, G. (2006). On the activity loss of hydrolases in organic solvents: II. a mechanistic study of subtilisin Carlsberg. *BMC Biotechnology*, 6(51). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-51>
- Cheng, L., Akkerman, R., Kong, C., Walvoort, M. T. C., & de Vos, P. (2021). More than sugar in the milk: human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), 1184–1200. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754756>
- Chin, Y. W., Seo, N., Kim, J. H. & Seo, J. H. (2016). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce 2'-fucosyllactose via salvage pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP)-L-fucose. *Biotechnology and bioengineering*, 113(11), 2443-2452. <https://doi.org/10.1002/bit.26015>
- Chin, Y. W., Kim, J. Y., Kim, J. H., Jung, S. M. & Seo, J. H. (2017). Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative  $\alpha$ -1, 2-fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis*. *Journal of biotechnology*, 257, 192-198. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.033>
- Choi, Y. H., Park, B. S., Seo, J. H. & Kim, B. G. (2019). Biosynthesis of the human milk oligosaccharide 3-fucosyllactose in metabolically engineered *Escherichia coli* via the salvage pathway through increasing GTP synthesis and  $\beta$ -galactosidase modification. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(12), 3324–3332. <https://doi.org/10.1002/bit.27160>
- Cobucci-Ponzano, B., Mazzone, M., Rossi, M., & Moracci, M. (2005). Probing the catalytically essential residues of the  $\alpha$ -L-fucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry*, 44(16), 6331–6342. <https://doi.org/10.1021/bi047495f>
- Costantino, H. R., Brown, S. H., & Kelly, R. M. (1990). Purification and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3654–3660.
- Cruz-Guerrero, A., Gómez-Ruiz, L., Viniegra-Gonzales, G., Bárzana, E., & García-Garibay, M. (2006). Influence of Water Activity in the Synthesis of Galactooligosaccharides Produced by a Hyperthermophilic  $\beta$ -Glycosidase in an Organic Medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1123–1129. <https://doi.org/10.1002/bit>

- Dicioccio, R. A., Barlow, J. J., & Khushi, L. (1982). Substrate Specificity and Other Properties of  $\alpha$ -L-Fucosidase from Human Serum. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(2), 714–718. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583286>
- Dong, X., Li, N., Liu, Z., Lv, X., Li, J., Du, G., Wang, M. & Liu, L. (2019). Modular pathway engineering of key precursor supply pathways for lacto-N-neotetraose production in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1551-3>
- Escamilla-Lozano, Y., Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Synthesis of Fucosyl-Oligosaccharides Using  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Molecules*, 24(2402), 1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules24132402>
- Fields, P. A., Dong, Y., Meng, X., & Somero, G. N. (2015). Adaptations of protein structure and function to temperature: There is more than one way to “skin a cat.” *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1801–1811. <https://doi.org/10.1242/jeb.114298>
- Fourage, L., Dion, M. & Colas, B. (2000). Kinetic study of a thermostable  $\beta$ -glycosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of temperature and glucose on hydrolysis and transglycosylation reactions. *Glycoconjugate Journal*, 17(6), 377–383. <https://doi.org/10.1023/A:1007104030314>
- Fransson, L. (2008). Enzyme substrate solvent interactions A case study on serine hydrolases. AlbaNova University Center.
- Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C. & Coppa, G. V. (2011). Preterm Milk Oligosaccharides During the First Month of Lactation. *Pediatrics*, 128(6), e1520–e1531. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1206>
- García-Garibay, M., López-Munguía, A., & Barzana, E. (2000). Effect of  $\beta$ -Galactosidase hydration on alcoholysis reaction in organic one-phase liquid systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(6), 647–653. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001220\)70:6<647::AID-BIT6>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001220)70:6<647::AID-BIT6>3.0.CO;2-Z)
- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2011). Effect of the substrate concentration and water activity on the yield and rate of the transfer reaction of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3366–3372. <https://doi.org/10.1021/jf104397w>
- Guan, N., Shin, H. D., Long, L., Azadi, P. & Chen, R. (2018). TCA cycle-powered synthesis of fucosylated oligosaccharides. *Glycobiology*, 28(7), 468-473. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy047>
- Gudiel-Urbano, M. & Goñi, I. (2001). Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4), 332–339.
- Gumerov, V. M., Rakitin, A. L., Mardanov, A. V., & Ravin, N. V. (2015). A Novel Highly Thermostable Multifunctional Beta-Glycosidase from Crenarchaeon *Acidilobus saccharovorans*. *Archaea*. 2015, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/978632>

- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018a). Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2771-x>
- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018b). Improvement of the transfucosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* for the synthesis of fucosylated oligosaccharides in the presence of calcium and sodium. *Extremophiles*, 22(6), 889–894. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1045-4>
- Han, N. S., Kim, T.-J., Park, Y.-C., Kim, J. & Seo, J.-H. (2012). Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.003>
- Hansson, T., Kaper, T., van der Oost, J., de Vos, W. & Adlercreutz, P. (2001). Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of  $\beta$ -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 73(3), 203–210. <http://doi.org/10.1002/bit.1052/abstract>
- Hensel, R., Laumann, S., Lang, J., Heumann, H., & Lottspeich, F. (1987). Characterization of two d-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extremely thermophilic archaebacterium *Thermoproteus tenax*. *European Journal of Biochemistry*, 170(1–2), 325–333. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13703.x>
- Hoebeke, J., Groswasser, J., Bousard, N., Vamos, E., & Strosberg, A. D. (1979). Thermodynamic Analysis of Purified Human placental  $\alpha$ -L-fucosidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 198(2), 556–561.
- Hoepfner, A., Schmitt, L. & Smits, S. H. J. (2013). Proteins and Their Ligands: Their Importance and How to Crystallize Them. *Intech*, 32(July), 137–144.
- Hollingsworth, S. & Dror, R. (1999). Molecular Dynamics Simulations for all. *Neuron*, 99(6), 1129–1143. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4189-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4189-9_16)
- Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 8(1), 37–47. <https://doi.org/10.2147/AABC.S70333>
- Huang, J. & Mackerell, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, 34(25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Jacob, R. B., Andersen, T. & McDougal, O. M. (2012). Accessible high-throughput virtual screening molecular docking software for students and educators. *PLoS Computational Biology*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002499>

- Jana, K., Mehra, R., Dehury, B., Blundell, T. L. & Kepp, K. P. (2020). Common mechanism of thermostability in small  $\alpha$ - and  $\beta$ -proteins studied by molecular dynamics. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 88(9), 1233–1250. <https://doi.org/10.1002/prot.25897>
- Jennum, C., Fenger, T., Bruun, L., & Madsen, R. (2014). One-pot glycosylations in the synthesis of human milk oligosaccharides. *European Journal of Organic Chemistry*, 2014(15), 3232–3241. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201400164>
- Ji, E. S., Park, N. H., & Oh, D. K. (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 759–764. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5487-8>
- Jiang, X., Li, W., Chen, G., & Wang, L. (2017). Dynamic Perturbation of the Active Site Determines Reversible Thermal Inactivation in Glycoside Hydrolase Family 12. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57(2), 288–297. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00692>
- Jiang, Z., Zhu, Y., Li, L., Yu, X., Kusakabe, I., Kitaoka, M., & Hayashi, K. (2004). Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl  $\beta$ -D-xylobiosides and xylosides. *Journal of Biotechnology*, 114(1–2), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.05.007>
- Kasche, V. (1986). Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(1), 4–16. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90003-7)
- Kass, I., Reboul, C. F. & Buckle, A. M. (2011). Computational methods for studying serpin conformational change and structural plasticity. *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 501). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385950-1.00014-6>
- Klontz, E. H., Li, C., Kihn, K., Fields, J. K., Beckett, D., Snyder, G. A., Wintrode, P.L., Deredge, D., Wang, L.X. & Sundberg, E. J. (2020). Structure and dynamics of an  $\alpha$ -fucosidase reveal a mechanism for highly efficient IgG transfucosylation. *Nature Communications*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20044-z>
- Konar, S., Sinha, S. K., Datta, S., & Ghorai, P. K. (2019). Probing the Effect of Glucose on the Activity and Stability of  $\beta$ -Glucosidase: An All-Atom Molecular Dynamics Simulation Investigation. *ACS Omega*, 4(6), 11189–11196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00509>
- Kony, D. B., Hünenberger, P. H., & van Gunsteren, W. F. (2007). Molecular dynamics simulations of the native and partially folded states of ubiquitin: Influence of methanol cosolvent, pH, and temperature on the protein structure and dynamics. *Protein Science*, 16(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.1110/ps.062323407>
- Kountouris, P., & Hirst, J. D. (2010). Predicting  $\beta$ -turns and their types using predicted backbone dihedral angles and secondary structures. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-407>

- Koval'ová, T., Koval, T., Benesová, E., Vodickova, P., Spiwok, V., Lipovová, P., & Dohnálek, J. (2019). Active site complementation and hexameric arrangement in the GH family 29; A structure-function study of  $\alpha$ -L-fucosidase isoenzyme 1 from *Paenibacillus thiaminolyticus*. *Glycobiology*, 29(1), 59–73. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy078>
- Kunz, C. (2012). Historical Aspects of Human Milk Oligosaccharides. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 3(3), 430S-439S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001776>
- Lang, M., Kamrat, T., & Nidetzky, B. (2006). Influence of Ionic Liquid Cosolvent on Transgalactosylation Reactions Catalyzed by Thermoestable  $\beta$ -Glycosylhydrolase CelB From *Pyrococcus Furiosus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6), 1093–1100. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Lee, H. J., Lee, Y. S., & Choi, Y. L. (2018). Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *Biotechnology for Biofuels*, 11(303), 14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1299-1>
- Lee, K. J. (2012). Molecular dynamics simulations of a hyperthermophilic and a mesophilic protein L30e. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(1), 7–15. <https://doi.org/10.1021/ci200184y>
- Lee, W. H., Pathanibul, P., Quarterman, J., Jo, J. H., Han, N. S., Miller, M. J., Jin, Y.S. & Seo, J. H. (2012). Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 11(1), 1-9.
- Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulff, L., Gotfredsen, C. H., Mikkelsen, M. D. & Mikkelsen, J. D. (2016). Novel  $\alpha$ -L-fucosidases from a soil metagenome for production of fucosylated human milk oligosaccharides. *PLoS ONE*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147438>
- Li, D., Park, J. H., Park, J. T., Park, C. S., & Park, K. H. (2004). Biotechnological Production of Highly Soluble Daidzein Glycosides Using *Thermotoga maritima* Maltosyltransferase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2561–2567. <https://doi.org/10.1021/jf035109f>
- Li, J., Cheng, H. N., Nickol, R. G., & Wang, P. G. (1999). Enzymatic modification of hydroxyethylcellulose by transgalactosylation with  $\beta$ -galactosidases. *Carbohydrate Research*, 316(1–4), 133–137. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00041-5)
- Lian, P., Yuan, C., Xu, Q., & Fu, W. (2016). Thermostability Mechanism for the Hyperthermophilicity of Extremophile Cellulase TmCel12A: Implied from Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Physical Chemistry B*, 120(30), 7346–7352. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b03782>
- Lin, A. E., Autran, C. A., Szyszka, A., Escajadillo, T., Huang, M., Godula, K., Prudden, A., Boons, G.J., Lewis, A.L. Doran, K.S., Nizet, V. & Bode, L. (2017). Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B Streptococcus. *Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11243–11249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789974>

- Liu, P., Zhang, H., Wang, Y., Chen, X., Jin, L., Xu, L., & Xiao, M. (2020). Screening and characterization of an  $\alpha$ -L-fucosidase from *Bacteroides fragilis* NCTC9343 for synthesis of fucosyl-*N*-acetylglucosamine disaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10759-w>
- Liu, Z., Zhao, C., Deng, Y., Huang, Y., & Liu, B. (2015). Characterization of a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from a thermophilic anaerobic bacterial consortium YTY-70. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(3), 547–554. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1015244>
- Londesborough, J. (1980). The Causes of Sharply Bent or Discontinuous Arrhenius Plots for Enzyme-Catalysed Reactions. *European Journal of Biochemistry*, 105(2), 211–215. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04491.x>
- Mallek-Fakhfakh, H., & Belghith, H. (2016). Physicochemical properties of thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 419, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.10.014>
- Marana, S. R., Lopes, A. R., Ferreira, C., Terra, W. R., Juliano, L., & Juliano, M. A. (2002). Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(1), 494–497. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6172>
- Marti, A., Moreno, M., & Martínez, A. (2003). Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutricion Hospitalaria*, 18(4), 181–188.
- Maximova, T., Moffatt, R., Ma, B., Nussinov, R., & Shehu, A. (2016). Principles and Overview of Sampling Methods for Modeling Macromolecular Structure and Dynamics. *PLoS Computational Biology*, 12(4), 1–70. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004619>
- McVeagh, P., & Miller, J. B. (1997). Human milk oligosaccharides: only the breast. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 33(4), 281–286. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.1997.tb01601.x>
- Mehmood, M. A., Shahid, I., Hussain, K., Latif, F., & Rajoka, M. I. (2014). Thermodynamic properties of the  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga maritima* extend the upper limit of thermophilicity. *Protein and Peptide Letters*, 21(12), 1282–1288. <https://doi.org/10.2174/0929866521666140616123104>
- Meng, X., Zhang, H., Mezei, H., & Cui, M. (2012). Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, 7(2), 146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Meersman, F., Atilgan, C., Miles, A. J., Bader, R., Shang, W., Matagne, A., Wallace, B. A. & Koch, M. H. (2010). Consistent picture of the reversible thermal unfolding of hen egg-white lysozyme from experiment and molecular dynamics. *Biophysical Journal*, 99(7), 2255–2263. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.060>
- Mohamadnezhadi, H., Beiramzadeh, A., Shadman Lakmehsari, M., Khalifeh, K., & Heshmati, E. (2019). Temperature dependent dynamics in highly homologous adenylate kinases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(8), 2110–2117. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1477622>



- Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D. & Oson, A. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.AutoDock4
- Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A. S., Baslé, A., Gray, J., Venditto, I., Briggs, J., Zhang, X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffeto, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R.A., Zhu, Y., O’Neil, M.A., Urbanowicz, B.R., York, W.S., Davies, G.J., Abbott, D.W, Ralet, M.C., Martens, E.C., Henrissat., B. & Gilbert, H. J. (2017). Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, 544(7648), 65–70. <https://doi.org/10.1038/nature21725>
- Nelson, K. E., Clayton, R. a, Gill, S. R., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Haft, D. H., ... Fraser, C. M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399(6734), 323–329. <https://doi.org/10.1038/20601>
- Ninonuevo, M. R., Park, Y., Yin, H., Zhang, J., Ward, R. E., Clowers, B. H., German, J.B., Freeman, S.L., Killen, K., Grimm, R., Lebrilla, C. B. (2006). A strategy for annotating the human milk glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7471–7480. <https://doi.org/10.1021/jf0615810>
- Oliveira, D. L., Wilbey, R. A., Grandison, A. S., & Roseiro, L. B. (2015). Milk oligosaccharides: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 305–321. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12209>
- Osanjo, G., Drone, J., Dion, M., Solleur, C., Tran, V., Rabiller, C., & Tellier, C. (2007). Directed Evolution of the  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* into an  $\alpha$ -L-Transfucosidase. *Biochemistry*, 46(4), 1022–1033. <https://doi.org/10.1021/bi061444w>.
- Pagadala, N., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Pérez-Escalante, E., Alatorre-Santamaría, S., Castañeda-Ovando, A., Salazar-Pereda, V., Bautista-Ávila, M., Cruz-Guerrero, A. E., Flores-Aguilar, J.F. & González-Olivares, L. G. (2020). Human milk oligosaccharides as bioactive compounds in infant formula: recent advances and trends in synthetic methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1813683>
- Pérez-Escalante, E., González-Olivares, L. G., Castañeda-Ovando, A., Cruz-Guerrero, A. E., Trant, J. F., López-Orozco, W., Mendoza-Huizar & Alatorre-Santamaría, S. (2020). An *in silico* approach to enzymatic synthesis of fucooligosaccharides using  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Proceedings*. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-24-08303>
- Petschacher, B. & Nidetzky, B. (2016). Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: Prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems. *Journal of Biotechnology*, 235, 61–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.052>
- Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Wei, J., McGreevy, R., Melo, M.C.R., Radak, B.K., Skeel, R.D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., Kále, L.V., Shulten, K., Chipot, C & Tajkhorshid, E. (2020).

Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *Journal of Chemical Physics*, 153(4). <https://doi.org/10.1063/5.0014475>

Pouwels, J., Moracci, M., Cobucci-Ponzano, B., Perugino, G., Van Der Oost, J., Kaper, T., Lebbink, J.H.G., de Vos, W.M. Ciaramella, M. & Rossi, M. (2000). Activity and stability of hyperthermophilic enzymes: A comparative study on two archaeal  $\beta$ -glycosidases. *Extremophiles*, 4(3), 157–164. <https://doi.org/10.1007/s007920070030>

Pyeon, H. M., Lee, Y. S. & Choi, Y. L. (2019). Cloning, purification, and characterization of GH3  $\beta$ -glucosidase, MtBg185, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *PeerJ* 2019(7), 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.7106>

Reeb, J. & Rost, B. (2018). Secondary structure prediction. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3, 488–496. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20267-7>

ResearchProductsInternational. (2017). 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside. Retrieved from [https://www.rpicorp.com/products/biochemicals/other-enzymes/4-nitrophenyl- \$\alpha\$ -l-fucopyranoside-1-g.html](https://www.rpicorp.com/products/biochemicals/other-enzymes/4-nitrophenyl-alpha-l-fucopyranoside-1-g.html)

Rodríguez-Díaz, J., Carbajo, R. J., Pineda-Lucena, A., Monedero, V. & Yebra, M. J. (2013). Synthesis of fucosyl-*N*-acetylglucosamine disaccharides by transufosylation using  $\alpha$ -L-fucosidases from *Lactobacillus casei*. *Applied and environmental microbiology*, 79(12), 3847-3850. <https://doi.org/10.1128/AEM.00229-13>

Rudloff, S. & Kunz, C. (2012). The Glycobiology of Human Milk Oligosaccharides - Milk Oligosaccharides and Metabolism in Infants. *Advances in Nutrition*, 3(3), 398S-405S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001594>.

Sakurama, H., Fushinobu, S., Hidaka, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H., Kitaoka, M., Kumagai, H., Yamamoto, K. & Katayama, T. (2012). 1,3-1,4- $\alpha$ -L-Fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16709–16719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333781>

Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(4), 1518–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00028>

Saumonneau, A., Champion, E., Peltier-Pain, P., Molnar-Gabor, D., Hendrickx, J., Tran, V., Hederos, M., Dekany, G & Tellier, C. (2016). Design of an  $\alpha$ -L-transufosidase for the synthesis of fucosylated HMOs. *Glycobiology*, 26(3), 261–269. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv099>

Schmid, U. & Waldmann, H. (1998). Synthesis of fucosyl saccharides under neutral conditions in solutions of lithium perchlorate in dichloromethane. *Chemistry Europe. Journal*, 4(3), 494–501. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19980310\)4:3<494::AID-CHEM494>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19980310)4:3<494::AID-CHEM494>3.0.CO;2-8)

Scior, T., Martínez Morales, E., & Salinas Stefanón, E. (2007). Los modelos in silico , una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos*, 68, 45–48.

- Seelig, J., & Schönfeld, H.J. (2016). Thermal protein unfolding by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy Two-state model versus sequential unfolding. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 49. <https://doi.org/10.1017/s0033583516000044>
- Shaikh, F. A., Lammerts Van Bueren, A., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2013). Identifying the catalytic acid/base in GH29  $\alpha$ -L-fucosidase subfamilies. *Biochemistry*, 52(34), 5857–5864. <https://doi.org/10.1021/bi400183q>
- Singh, R., Gradnigo, J., White, D., Lipzen, A., Martin, J., Schackwitz, W., Morlyama, E. & Blum, P. (2015). Complete Genome Sequence of an Evolved *Thermotoga maritima* Isolate. *Genome Announcement*. 3(3), 9–10. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00557-15>
- Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B., & Bourne, Y. (2004). Crystal structure of *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -L-fucosidase: Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13119–13128. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313783200>
- Suryawanshi, V. D., Walekar, L. S., Gore, A. H., Anbhule, P. V., & Kolekar, G. B. (2016). Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.07.001>
- Svensson, S. C. T. & Thiem, J. (1990). Purification of  $\alpha$ -L-fucosidase by C-glycosylic affinity chromatography and the enzymic synthesis of  $\alpha$ -L-fucosyl disaccharides. 200, 391–402. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)84205-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84205-9)
- Tarling, C. A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Bourne, Y., Henrissat, B., & Withers, S. G. (2003). Identification of the Catalytic Nucleophile of the Family 29  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* through Trapping of a Covalent Glycosyl-Enzyme Intermediate and Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47394–47399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306610200>
- Triantis, V., Bode, L., & van Neerven, R. J. J. (2018). Immunological Effects of Human Milk Oligosaccharides. *Frontiers in Pediatrics*, 6(July). <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00190>
- Trincon, A., Giordano, A., Perugino, G., Rossi, M., & Moracci, M. (2005). Highly productive autocondensation and transglycosylation reactions with *Sulfolobus solfataricus* glycosynthase. *ChemBioChem*, 6(8), 1431–1437. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400430>
- Turner, P., Svensson, D., Adlercreutz, P. & Karlsson, E. N. (2007). A novel variant of *Thermotoga neapolitana*  $\beta$ -glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation. *Journal of Biotechnology*, 130(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.016>
- Urashima, T., Taufik, E., Fukuda, K. & Asakuma, S. (2013). Recent Advances in Studies on Milk Oligosaccharides of Cows and Other Domestic Farm Animals. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(3), 455–466. <https://doi.org/10.1271/bbb.120810>

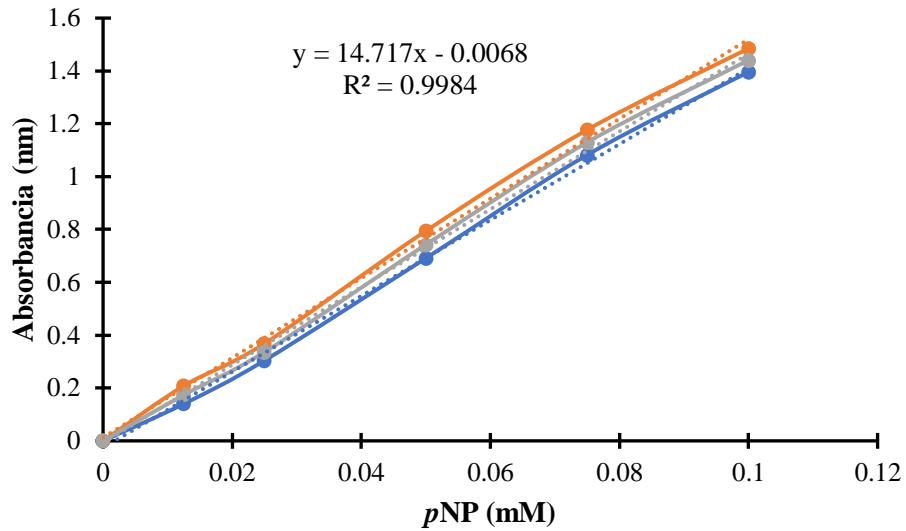
- Vandenplas, Y., Berger, B., Carnielli, V. P., Ksiazek, J., Lagström, H., Luna, M. S., Migacheva, N., Mosselmans, J.M., Picaud, J.C., Possner & Wabitsch, M. (2018). Human milk oligosaccharides: 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lacto-n-neotetraose (LNnT) in infant formula. *Nutrients*, *10*(9). <https://doi.org/10.3390/nu10091161>
- Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research*, *346*(6), 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.030>
- Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L. & Illanes, A. (2017). Optimization of reaction conditions and the donor substrate in the synthesis of hexyl- $\beta$ -D-galactoside. *Process Biochemistry*, *58*(2017), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.005>
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *65*(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>
- Vitoria, I. (2007). Oligosacáridos en la leche humana. *Acta Pediatrica Espanola*, *65*(3), 129–133.
- Wan, L., Zhu, Y., Zhang, W., & Mu, W. (2020).  $\alpha$ -L-Fucosidases and their applications for the production of fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *104*, 5619-5631. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10635-7>
- Warmerdam, A., Wang, J., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2013). Effects of carbohydrates on the  $\alpha$ -NPG converting activity of  $\beta$ -galactosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(26), 6458–6464. <https://doi.org/10.1021/jf4008554>
- Wicinski, M., Sawicka, E., Gebalski, J., Kubiak, K., & Malinowski, B. (2020). Human Milk Oligosaccharides: Health Benefit, Potential Applications in Infant Formulas, and Pharmacology. *Nutrients*, *12*(266), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu12010266>.
- Wu, Y., Yuan, S., Chen, S., Wu, D., Chen, J., & Wu, J. (2013). Enhancing the production of galacto-oligosaccharides by mutagenesis of *Sulfolobus solfataricus*  $\beta$ -galactosidase. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 1588–1595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.052>
- Yahyavi, M., Falsafi-Zadeh, S., Karimi, Z., Kalatari, G., & Galehdari, H. (2014). VMD-SS: A graphical user interface plug-in to calculate the protein secondary structure in VMD program. *Bioinformatics*, *10*(8), 548–550. <https://doi.org/10.6026/97320630010548>
- Yang, J., Gao, R., Zhou, Y., Anankanbil, S., Li, J., Xie, G., & Guo, Z. (2018).  $\beta$ -Glucosidase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10 for exclusive synthesis of galactotrisaccharides: Kinetics and thermodynamics insight into reaction mechanism. *Food Chemistry*, *240*(2017), 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.155>
- Yoon, J. H., & Rhee, J. S. (2000). The efficient enzymatic synthesis of *N*-acetyllactosamine in an organic co-solvent. *Carbohydrate Research*, *327*, 377–383. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00063-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00063-X)

- Yu, Z. T., Chen, C. & Newburg, D. S. (2013). Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*, 23(11), 1281–1292. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt065>
- Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J. D. & Meyer, A. S. (2014). Methods for improving enzymatic transglycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9615–9631. <https://doi.org/10.1021/jf502619p>
- Zeuner, B. & Meyer, A. S. (2020). Enzymatic transfucosylation for synthesis of human milk oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 493(May), 108029. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108029>
- Zeuner, B., Muschiol, J., Holck, J., Lezyk, M., Gedde, M. R., Jers, C., Mikkelsen, J.D. & Meyer, A. S. (2018). Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29  $\alpha$ -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 41, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.002>
- Zeuner, B., Nyffenegger, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2016). Thermostable  $\beta$ -galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 33(3), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.003>
- Zhang, Y., Thiele, I., Weekes, D., Li, Z., Jaroszewski, L., Ginalski, K., Deacon, A.M., Wooley, J., Lesley, S.A., Wilson, I.A., Palsson, B., Osterman, A. & Godzik, A. (2015). Three-Dimensional Structural View of the Central Metabolic Network of *Thermotoga maritima*. *Science*, 325(5947), 1544–1549. <https://doi.org/10.1126/science.1174671>

### 13. Anexo

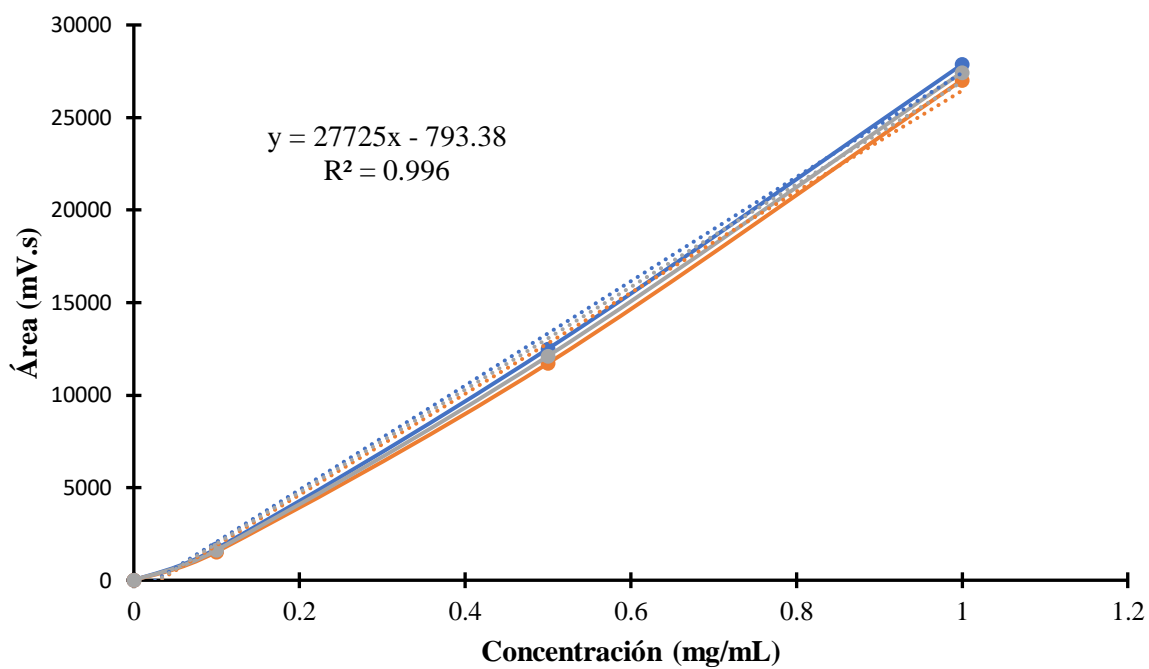
#### 13.1. Curva patrón de 4-nitrofenol (*p*NP) empleada para la cuantificación de *p*NP liberado en la reacción de hidrólisis catalizada por la $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

<i>p</i> NP (mM)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Promedio
<b>0</b>	0	0	0
<b>0.0125</b>	0.14	0.208	0.174
<b>0.025</b>	0.304	0.368	0.336
<b>0.05</b>	0.691	0.794	0.7425
<b>0.075</b>	1.082	1.177	1.1295
<b>0.1</b>	1.396	1.485	1.4405



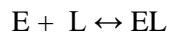
**13.2. Curva patrón de rafinosa empleada para la cuantificación de oligosacáridos fucosilados en la reacción de transfucosilación catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima***

Concentración Rafinosa (mg/ml)	Área 1	Área 2	Promedio
0	0	0	0
0.1	1715.966	1542.252	1629.109
0.5	12504.79	11719.69	12112.24
1	27866.56	27023	27444.782



### 13.3. Autodock convierte la energía libre de unión en $K_i$

Considerando una reacción en el equilibrio de la formación del complejo Enzima (E) con el ligando (L).



Si la reacción está favorecida en la formación del complejo se tiene la constante de unión ( $K_b$ )



Por lo tanto:

$$K_b = \frac{EL}{(E)(L)} \quad \dots \text{Ecuación 13}$$



En cambio, si no hay formación del complejo, se tiene la constante de disociación:



Por lo tanto:

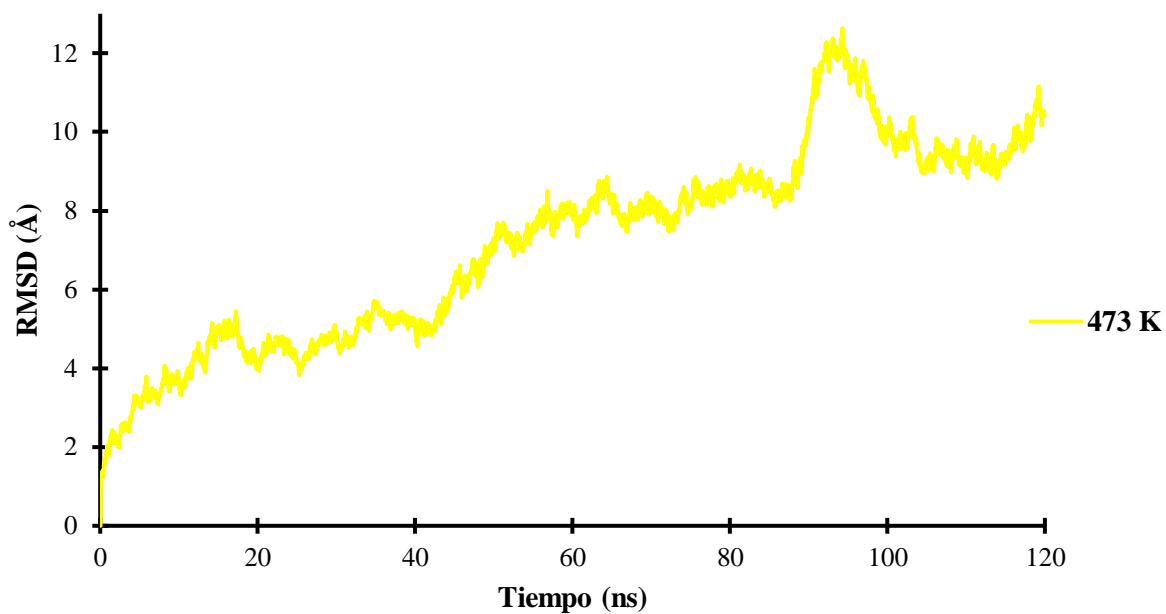
$$K_{d=\frac{(E)(L)}{EL}} \dots \text{Ecuación 14}$$

Con base a lo anterior  $K_b$  se puede expresar de la siguiente manera:

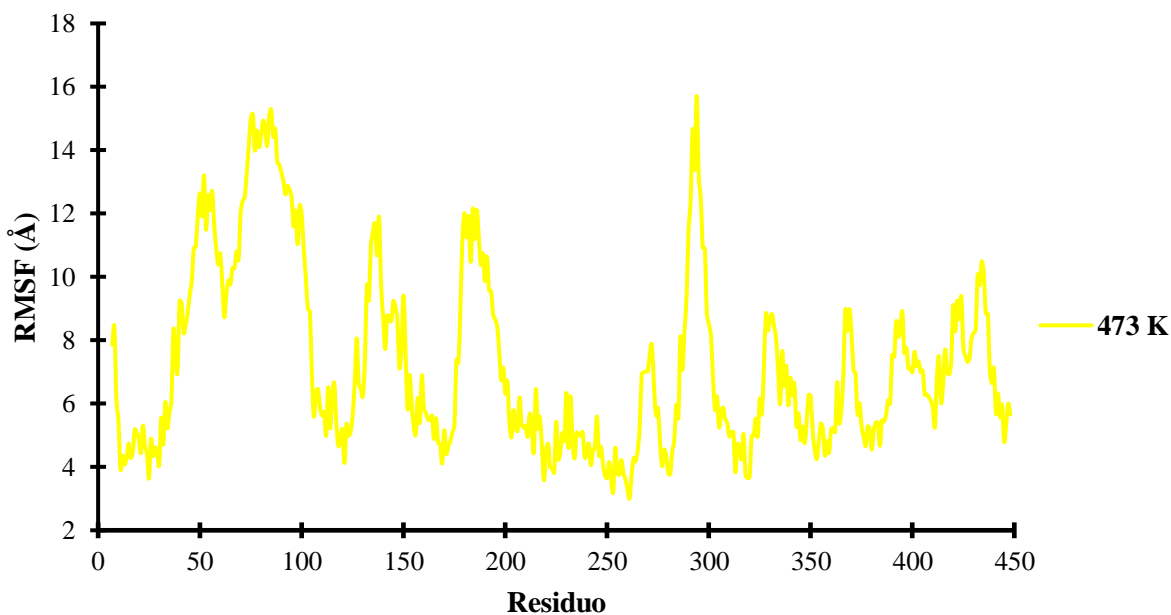
$$K_b = \frac{1}{K_d} \dots \text{Ecuación 15}$$

Por lo anterior, en el caso de querer saber la afinidad en la formación del complejo, simplemente se calcula el inverso de la  $K_d$  con lo que obtendríamos la  $K_b$ .

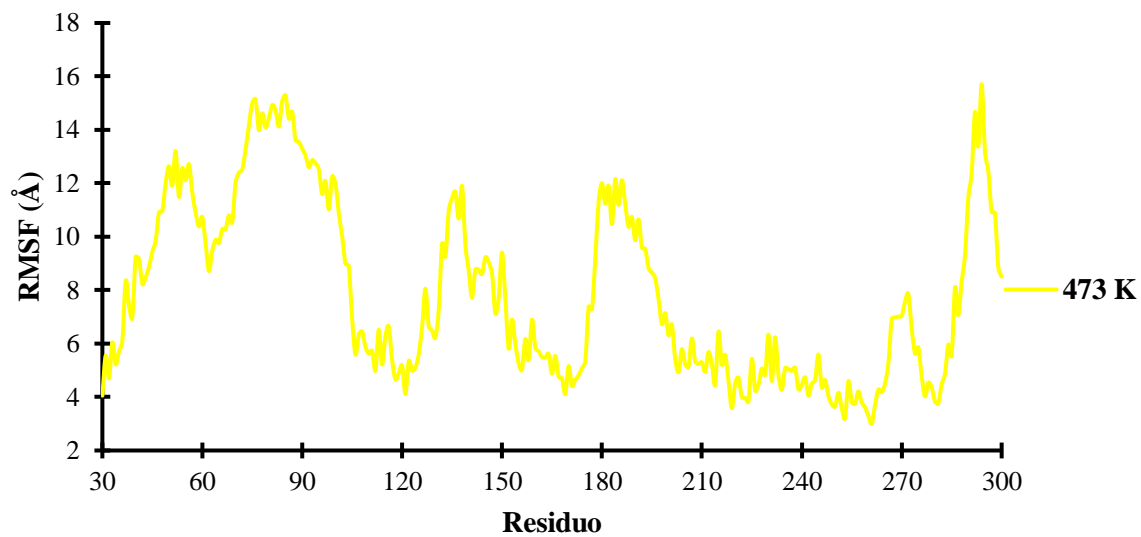
**13.4. RMSD de la estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a 200 °C**



**13.5. RMSF de la estructura cristalográfica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a 200 °C.**

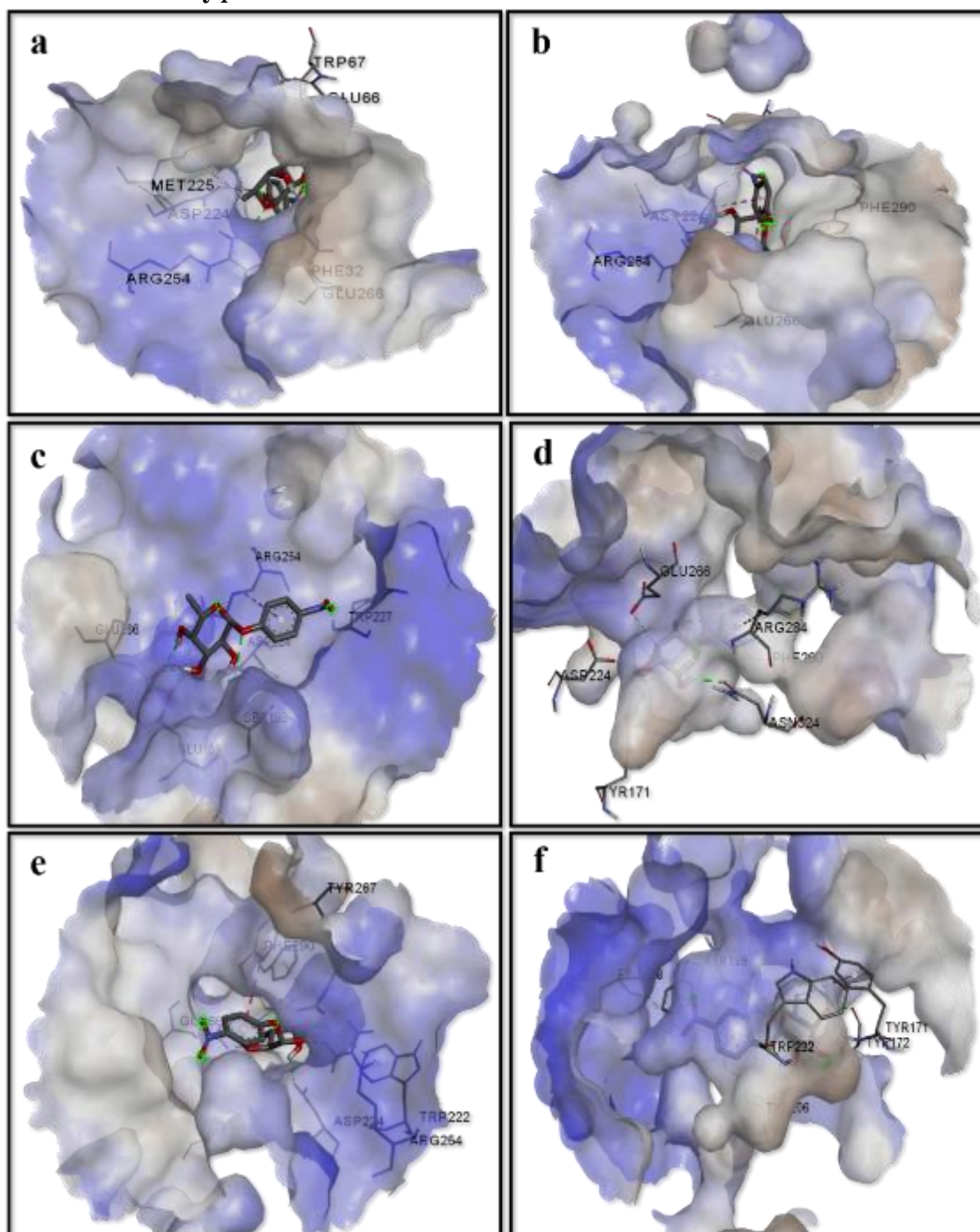


**13.6. RMSD de los residuos catalíticos de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* a 200 °C**





13.8. Efecto de la temperatura en la formación del complejo entre la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* y pNP-fucosa.



a) Control, b) 60 °C, c) 80 °C, d) 90 °C, e) 95 °C y f) 200 °C.

## **13.9. Artículos publicados**

 **$\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima*: hydrolytic and transufucosylation activities** **$\alpha$ -L-Fucosidasa de *Thermotoga maritima*: actividades hidrolíticas y de transufucosilación**M.A. Robles-Arias<sup>1</sup>, F. Guzmán-Rodríguez<sup>1</sup>, M. García-Garibay<sup>1,2</sup>, S. Alatorre-Santamaría<sup>1</sup>, L. Gómez-Ruiz<sup>1</sup>, G. Rodríguez-Serrano<sup>1</sup>, A.E. Cruz-Guerrero<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Ciudad de México, 09340, México.<sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana, Lerma. Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, Lerma de Villada, Edo. de México, 52006, México.

Received: March 23, 2021; Accepted: May 17, 2021

**Abstract**

Fucosylated oligosaccharides play several biologically relevant roles. They are naturally present in human milk and offers to infants, short- and long-term health benefits. These compounds can be obtained also by enzymatic synthesis. In this work, the effects of pH and temperature on hydrolytic and transufucosylation activities of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* were evaluated. The optimal pH for the enzyme-catalyzed hydrolysis was found in a range from 6 to 8 while the highest conversions for transufucosylation reactions were observed within the range of 7-10. The best temperature for both enzymatic activities was 95 °C. Fucosylated oligosaccharides were synthesized with the highest productivity of 3.54 mM/h at pH 8 and 95 °C. Overall, optimization of the conditions of transufucosylation reaction catalyzed by the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*, allowed for higher yields of fucosylated oligosaccharides as well as shorter reaction time and a lower concentration of the employed enzyme.

**Keywords:** Fucosylated oligosaccharides, fucosidase, *Thermotoga maritima*.

**Resumen**

Los oligosacáridos fucosilados desempeñan varias funciones biológicamente relevantes. Están presentes de forma natural en la leche materna, lo que ofrece a los bebés beneficios a la salud a corto y largo plazo. Estos compuestos pueden obtenerse también mediante síntesis enzimática. En este trabajo, se evaluaron los efectos de pH y temperatura en las actividades hidrolíticas y de transufucosilación de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*. El pH óptimo para la hidrólisis catalizada por la enzima se encontró en un rango de 6 a 8, mientras que la mayor conversión en las reacciones de transufucosilación se observó en el rango 7-10. La mejor temperatura para ambas actividades enzimáticas fue 95 °C. Los oligosacáridos fucosilados fueron sintetizados con la productividad más alta de 3.54 mM/h a pH 8 y 95 °C. En general, la optimización de las condiciones de la reacción de transufucosilación catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* permitió mayores rendimientos de oligosacáridos fucosilados así como un tiempo de reacción más corto y una menor concentración de enzima.

**Palabras clave:** Oligosacáridos fucosilados, fucosidasa, *Thermotoga maritima*.

**1 Introduction**

L-Fucose is present in many biological entities such as blood group antigen, glycoproteins, glycolipids and in human milk oligosaccharides (HMO) such as fucosylated oligosaccharides (Becker and Lowe, 2003; Lezyk *et al.*, 2016). The latter represent between

50-80% of the total HMO, in fact, 2'-fucosyllactose is one of the most abundant components in human milk (2.43 g/L) (Chaturvedi *et al.*, 2001). Fucosylated oligosaccharides show many important beneficial effects on infant health, for example, they act as prebiotics, modulators of gut motility, and pathogen adhesion blocking agents, that help to avoid enteric infections (Rudloff and Kunz 2012; Zehra *et al.*, 2018).

\*Corresponding author. E-mail: aec@xanum.uam.mx  
Tel. +(52)(55) 5804-4720, Fax +(52) (55) 5804-4712  
<https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2407>  
ISSN:1665-2738, issn-e: 2395-8472



Fucosylated oligosaccharides are synthesized *in vivo* in the Golgi apparatus of the alveolar cells in mammary glands through the activity of specific transferases (Gabielli *et al.*, 2011). *In vitro*, fucosylated oligosaccharides can be obtained by biotransformations with  $\alpha$ -L-fucosidases (E.C. 3.2.1.51) that belong to GH29 family. These glycosidases are capable of catalyzing the synthesis of fucosylated oligosaccharides, provided that the reaction conditions are manipulated, so that they favor the transufucosylation activity over hydrolysis. The mechanism of enzymatic catalysis leading to the formation of fucosylated oligosaccharides involves, in the first step, hydrolysis of a fucosyl residue at the non-reducing end of fucosylated oligosaccharides, and fucoglycoconjugates resulting in a glycosyl-enzyme intermediate. Then, this intermediate undergoes nucleophilic attack either by a water molecule, leading to an undesirable hydrolysis reaction, or by another glycosidic acceptor resulting in the formation of fucosylated oligosaccharides (Escamilla-Lozano *et al.*, 2015; Zeuner *et al.*, 2014; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018).

In order to improve the yield of the fucosidase-catalyzed synthesis of carbohydrates, it is a decisive factor to work at the optimum reaction conditions of pH and temperature. In this way, the kinetic equilibrium of the reaction is forced towards transufucosylation (Zeuner *et al.*, 2016; Abdul-Manas *et al.*, 2018, Guo *et al.*, 2018). Furthermore, thermodynamic parameters such as energy activation must be considered while analyzing the efficiency of an enzyme (Haq *et al.*, 2020; Munir *et al.*, 2020). The aim of this work was to study the effects of pH and temperature on the hydrolytic and transufucosylation activities in the synthesis of fucosylated oligosaccharides using the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Material

4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (pNP-Fuc), 4-nitrophenol (pNP), D-lactose, L-fucose and 2'-fucosyllactose were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Sodium monophosphate, sodium diphosphate and sodium hydroxide were purchased from J.T. Baker (Mexico State, Mexico). Recombinant  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga*

*maritima* (E.C. 3.2.1.51) was purchased from Megazyme (Leinster, Ireland) at 5 U/mL (2.6 U/mg) in 3.2 M ammonium sulphate solution. The working solution was obtained by 1:1000 dilution in 0.1 M phosphate buffer at the corresponding pH. Milli-Q® water (Merck, Germany) was used throughout all experiments.

### 2.2 Effect of pH on the $\alpha$ -L-fucosidase hydrolytic and transufucosylation activities

The hydrolytic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase was determined in a pH range from 5 to 10 at 60 °C during 5 min, following the protocol previously reported by Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018) with minor modifications. Briefly, 50  $\mu$ L of  $\alpha$ -L-fucosidase (0.0065 U/mL) from *T. maritima* were added to 400  $\mu$ L of pNP-Fuc (3.5 mM) in phosphate buffer (0.1 M). The reaction progress was analyzed at 0.5, 1, 1.5, 2, 3, and 5 min. The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ L of NaOH (1 M). Released pNP was quantified spectrophotometrically (Shimadzu UV-1800, Tokyo, Japan) at 410 nm by plotting the obtained value on a standard curve. Hydrolytic activity was represented as initial velocity ( $V_0$ ).

The transufucosylation activity was evaluated in a similar way, except that D-lactose (438 mM) was added to the mixture. The reaction was incubated at 60 °C for 60 min and analyzed at 10, 20, 40, and 60 min. Transufucosylation activity was monitored through the synthesized fucosylated oligosaccharides which were quantified as described in section 2.5. The activity was represented as  $V_0$ .

### 2.3 Effect of temperature on the $\alpha$ -L-fucosidase hydrolytic and transufucosylation activities

Hydrolytic activity of the  $\alpha$ -L-fucosidase was determined at pH 8 in a temperature range from 60 to 95 °C. The reaction progress was analyzed every minute during 15 min. Briefly, 50  $\mu$ L of  $\alpha$ -L-fucosidase (0.0065 U/mL) were added to 400  $\mu$ L of pNP-Fuc (3.5 mM) in phosphate buffer (0.1 M). The reaction was stopped by placing the vial in an ice bath for 1 min and subsequent addition of 50  $\mu$ L of NaOH (1 M). Released pNP was quantified spectrophotometrically as described previously in section 2.2. Hydrolytic activity was represented as  $V_0$ .



The transufucosylation activity was evaluated in a similar way, except that D-lactose was added to the reaction mixture (438 mM). The reaction was incubated for 60 min and analyzed at 10, 20, 40 and 60 min. The synthesized fucosylated oligosaccharides were quantified as described in section 2.5. Transufucosylation activity was represented as  $V_0$ . To determine the corresponding activation energy ( $E_a$ ) of the studied reactions, the Arrhenius plot was obtained by plotting the natural logarithm of the initial velocity (ordinate) versus inverse temperature ( $1/T$ ) on the abscissa (Fig. 3). Finally,  $E_a$  was calculated by applying the Arrhenius equation expressed as Equation 1:

$$E_a = -mR. \quad (1)$$

where  $m$  is the slope of the interpolation curves described above and  $R$  is the universal gas constant (1.987 kcal/mol K).

#### 2.4 $\alpha$ -L-Fucosidase thermal stability

The  $\alpha$ -L-fucosidase thermal stability was evaluated at 90 and 95 °C in 0.1 M phosphate buffer pH 8 for different time intervals with duration up to 30 min. Briefly, 100  $\mu$ L of  $\alpha$ -L-fucosidase (0.0065 U/mL) were suspended in phosphate buffer (0.1 M) and left to incubate. For each time interval, reactions were stopped by placing the vials in an ice bath for 1 min. Afterwards, an aliquot of 50  $\mu$ L was withdrawn and added to 450  $\mu$ L of pNP-Fuc solution (3.5 mM) to determine the residual hydrolytic activity. The mixture was incubated at 60 °C for 10 min in a Temperature-Controlled Cell-Holder. The released pNP was quantified spectrophotometrically as already described.

#### 2.5 Carbohydrate quantification

The quantification of the synthesized fucosylated oligosaccharides and the released fucose was performed on a HPLC apparatus (LabAlliance, State College, PA, USA) with an ion-exclusion column Rezex RNO-Oligosaccharides Na<sup>+</sup> (4%) (60 x 10 mm; particle size 12  $\mu$ m) (Phenomenex; Amstelveen, Netherlands) and oven temperature of 75 °C. The HPLC was equipped with a SOFTA 300S light scattering detector (Chrom Tech, Minnesota, USA) with a nitrogen flow of 62.5 psi, spray chamber temperature of 10 °C, and a drift tube temperature of 45 °C.

Prior to injection on HPLC, samples were filtered through 0.22  $\mu$ m Millipore Durapore membranes and eluted with Milli-Q water at a flow rate of 0.3 mL/min. A calibration curve of 2'-fucosyllactose was used to estimate the amount of product formed. Additionally, standard solutions of 2'-fucosyllactose, lactose and fucose were used to determine their corresponding retention times in order to identify the reaction products.

#### 2.6 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and results are reported as a mean value  $\pm$  standard deviation. For statistical analysis, IBM SPSS Statistic version 25.0 for Windows (IBM, New York, USA) software was used to carry out a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tuckey's test for comparing all pairs of groups. A P value of 0.05 was considered statistically significant.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Effect of pH on the $\alpha$ -L-fucosidase hydrolytic and transufucosylation activities

The highest hydrolytic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was found in the pH range between 6 and 8, with no significant difference between these values ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1). The obtained results are in accordance with those reported by Lezyk *et al.* (2016) who described higher activity at pH range of 4 - 7 for the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* at 30 °C and 1 mM of pNP-Fuc as substrate. In general, most of  $\alpha$ -L-fucosidases exhibit hydrolytic activity at a wide pH range. For example, Berteau *et al.* (2004) found pH 4 as optimal for the performance of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Pecten maximus*, whereas, Cobucci-Ponzano *et al.* (2005) reported that the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Sulfolobus solfataricus* displayed its maximum activity at pH 5. In a study carried out by Benešová *et al.* (2013) the recombinant  $\alpha$ -L-fucosidase from *Paenibacillus thiaminolyticus*, which was cloned and expressed in *E. coli*, worked most efficiently at pH of 8.2.

In addition, Fig. 1 also shows the transufucosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*.

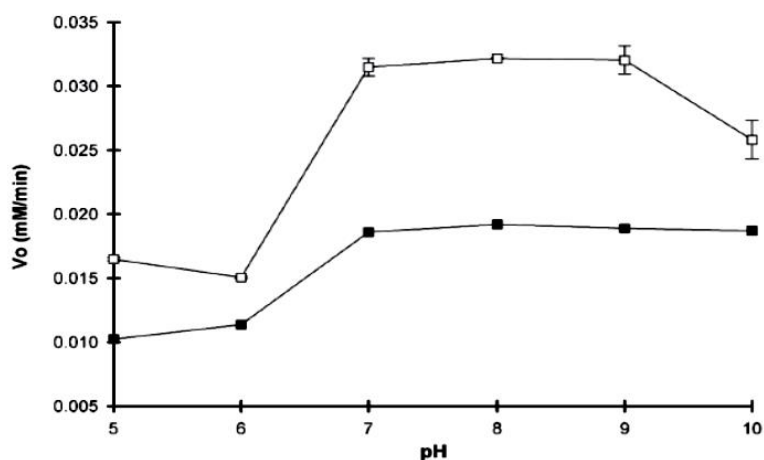


Fig. 1. Effect of pH on the hydrolytic ( $\square$ ) and transufucosylation ( $\blacksquare$ ) activities of the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Hydrolytic activity was performed at 60 °C using 3.5 mM pNP-Fuc and 0.0065 U/mL  $\alpha$ -L-fucosidase. Transufucosylation activity was performed under the same conditions, adding 438 mM D-lactose. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates.

The highest activity was found in the pH range from 7 to 10 ( $p < 0.05$ ). The enhanced transufucosylation activity was observed when pH increased from 5 to 8 that led to a 6.7-fold higher yield (from 6.07 to 40.67%). The obtained results are in accordance with other studies on optimum reaction conditions of glycosidases from thermophilic sources. Wu *et al.* (2013) reported an enhancement of galactooligosaccharides (GOS) synthesis when pH was modified from 4 to 6 for  $\beta$ -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*, whereas for the two recombinant  $\beta$ -glycosidases expressed in *E. coli* (F441Y and F359Q) GOS increased when varying pH from 4 to 6.5. Additionally, Ji *et al.* (2005) observed an improvement in GOS yields for biotransformation catalyzed by a recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima* expressed in *E. coli* when pH was changed from 5 to 6. In another study, the improved GOS production was linked to the pH rise from 5 to 5.5 using  $\beta$ -mannosidase from *Pyrococcus furiosus* as a catalyst (Hansson *et al.* 2001).

It is observed that hydrolysis and transglycosylation activities exhibit similar profiles at pH 5 - 9, conversely, at pH 10, the hydrolytic activity decreased meanwhile for transufucosylation activity remained unchanged. Sulzenbacher *et al.* (2004) and Tarling *et*

*al.* (2003) suggested that changes in pH of the reaction medium affected the pKa of the key amino acids involved in the catalysis, while Abdul-Manas *et al.* (2018) concluded that the ionization of this key amino acid was a determinant factor that favored interactions either with water, resulting in hydrolysis reaction, or a sugar acceptor improving transufucosylation reaction yields as observed in this work.

### 3.2 Effect of temperature on the $\alpha$ -L-fucosidase hydrolytic and transufucosylation activities

As can be seen in Fig. 2, the highest hydrolytic activity was observed at 95 °C, conversely, no significance difference was observed in the temperature range 60-70 °C ( $P < 0.05$ ). Similar results were reported for other heat resistant glycosidases. For example, Turner *et al.* (2007) reported an optimum temperature of 90 °C for  $\beta$ -glycosidase B from *Thermotoga neapolitana* while Gumerov *et al.* (2015) found that 85 °C was an optimum temperature for a  $\beta$ -galactosidase from *Acidilobus saccharovorans*. In other studies, *Pyrococcus furiosus*  $\alpha$ -glycosidase was shown to have the highest activity at temperatures ranging from 105 to 115 °C (Costantino *et al.*, 1990).

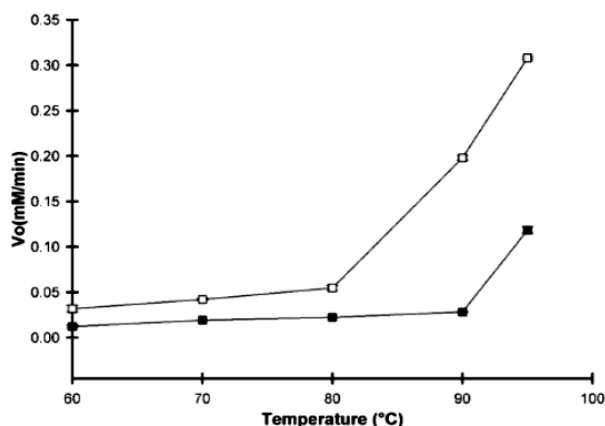


Fig. 2. Effect of temperature on the hydrolytic ( $\square$ ) and transufucosylation ( $\blacksquare$ ) activities of the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Hydrolytic activity was performed using 3.5 mM pNP-Fuc and 0.0065 U/mL  $\alpha$ -L-fucosidase. Transufucosylation activity was performed under the same conditions, adding 438 mM D-lactose. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates.

Among numerous benefits of working with thermophilic enzymes at elevated temperatures, the most important are improved reaction kinetics and increased substrate solubility (Liu *et al.* 2015). Likewise, in our studies the rise of temperature enhanced the transufucosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase (Fig. 2). The reaction yield at 95 °C was three times higher than that obtained at 60 °C (32.01 and 10.58% respectively). Similar results were recorded by Vera *et al.* (2011) who reported an increase in the production yields of both GOS and lactulose with temperature. Authors suggested that the observed results might be related to the positive effect of temperature on the hydrolytic activity. Hence, it can be assumed that the enhanced yield of fucosylated oligosaccharides obtained in this work is associated with the effect of temperature on the improvement of enzymatic hydrolysis. In another work, the conversion yield of GOS in the presence of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* was three times greater at 60 than at 25 °C (5 and 15 g/L, respectively) (Warmerdam *et al.*, 2013). Moreover, the research group of Fourage *et al.* (2000) reported a 2.6 times higher reaction yield in the pNP-Fuc-Fuc synthesis (from 16 to 42%) catalyzed by  $\beta$ -glycosidase from *Thermus thermophilus*, in response to the temperature rise from 37 to 75 °C. Recently, Zeuner *et al.* (2016) reported

a six-fold increase of the reaction yield (from 0.9 to 5.4%) in the N-acetyllactosamine synthesis catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *Pyrococcus furiosus* when temperature was risen from 40 to 60 °C.

Additionally, the  $E_a$  values for the  $\alpha$ -L-fucosidase catalyzed hydrolysis and transufucosylation reactions were determined at 13.83 and 14.27 kcal/mol, respectively. According to Segel (1976) and Keleti (1983),  $\log V_{max}$  versus  $1/T$  is the ideal approach to determine  $E_a$  values. As reported in our previous work (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2021)  $V_{max}$  was reached at pNP-Fuc concentration of 0.136 mM, as the concentration of donor substrate employed in this work was 3.5 mM, we can assume to be working at  $V_{max}$ , hence, data obtained from the Arrhenius plot (Fig. 3) of this work were deemed valid. The obtained values indicate that transufucosylation is a thermodynamically disfavored reaction, and the enzyme would have to overcome a higher energy barrier to perform the synthesis of fucosylated oligosaccharides in comparison to the energy required for hydrolysis. Similar results were obtained by Yang *et al.* (2018) who determined a higher  $E_a$  value for the synthesis of galactotrisaccharides (7.42 kcal/mol) than that for the lactose hydrolysis (6.4 kcal/mol) in a reaction catalyzed by recombinant  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga naptophila* RKU-10.



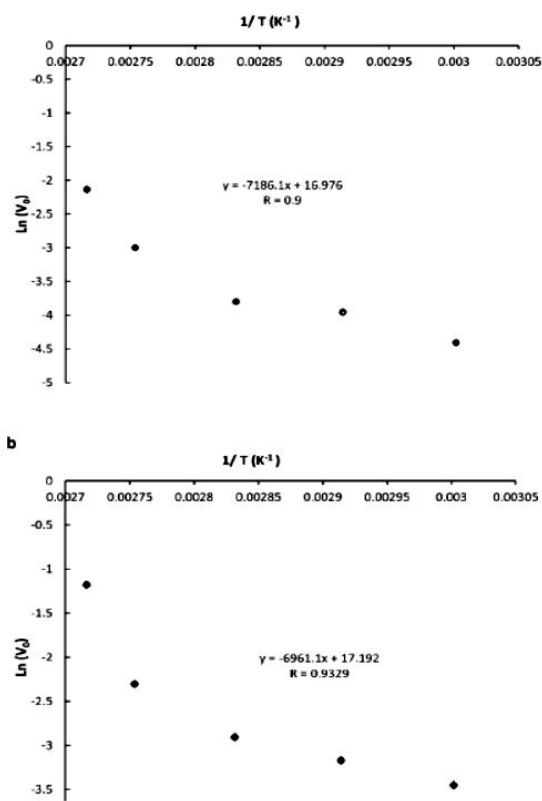


Fig. 3 Arrhenius plots of  $\ln(V_0)$  as a function of  $1/T$ . a) Hydrolytic activity, b) Transglycosylation activity. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates.

Furthermore, the  $E_a$  for the hydrolytic activity obtained in this work is lower than that reported by Pouwels *et al.* (2000) for the hydrolysis of par-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside catalyzed by a  $\beta$ -glycosidase from *P. furiosus* (15.52 kcal/mol) and for a  $\beta$ -glycosidase from *S. solfataricus* (16.96 kcal/mol). When an enzyme binds its substrate, residues in the active site may form interactions with substrate molecules which lowers the reaction's  $E_a$  (Marana *et al.*, 2002). Difference between hydrolytic and transglycosylation activities can be because of the different effect of the acceptor substrates on the enzyme active site.

It is remarkable that Arrhenius plots are distinctly nonlinear (Fig. 3). Vieille & Zeikus (2001) reported that hyperthermophilic enzymes are an important exception to the typical Arrhenius behavior. Furthermore, as temperature increase, this kind of

enzymes suffers catalytically structural changes, which are frequently correlated with functionally conformational alterations (Londesborough, J., 1980; Hensel *et al.*, 1987).

It is noteworthy that by using an activated donor substrate (such as pNP-Fuc) for  $\alpha$ -L-fucosidase, as described in this study, the energy liberated by the cleavage of glycosyl bond may contribute to lowering the activation energy of transglycosylation (Escamilla-Lozano *et al.*, 2019). Then, it is possible that higher  $E_a$  values could be obtained for non-activated substrates.

### 3.3 Thermal stability of the $\alpha$ -L-fucosidase

As shown in the previous section, the  $\alpha$ -L-fucosidase showed the highest activity at pH 8 and temperatures of 90 and 95 °C. Therefore, its thermal stability was determined by incubating the enzyme at these temperatures. The half-lives of enzyme at 90 and 95 °C were 30.13 and 17.28 min, respectively. Zeuner *et al.* (2018) studied the thermal stability of the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* at pH 5. These authors established that this enzyme presented half-lives of 15 and 4.4 min when incubated at 90 and 95 °C, respectively. The results reported by these authors differ from those obtained in this study, which can be attributed to the different concentrations of enzyme and substrate used, as well as a different pH. The  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* showed higher activity in alkaline media as discussed in section 3.1. In another study, a recombinant  $\beta$ -glucosidase expressed in *E. coli* showed half-life times of 71 and 9.2 h at 90 and 100 °C, respectively (Mehmood *et al.*, 2014).

### 3.4 Synthesis of fucosylated oligosaccharides

As the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* exhibited the highest activity at pH 8 and good stability between 90 and 95 °C, these conditions were applied to synthesize fucosylated oligosaccharides. The highest conversion rates of fucosylated oligosaccharides at these temperatures were 0.76 and 3.54 mM/h, respectively (Fig. 4). However, it was observed that after 20 min at 95 °C the concentration of fucosylated oligosaccharides started to decrease and show no significance difference compared to 90 °C in the interval from 40-60 min ( $P < 0.05$ ). This decline could be explained in two ways; either product accumulation shifted the reaction equilibrium towards hydrolysis or long chain oligosaccharides were formed. The former explanation was discarded due to the lack of evidence in HPLC chromatograms.

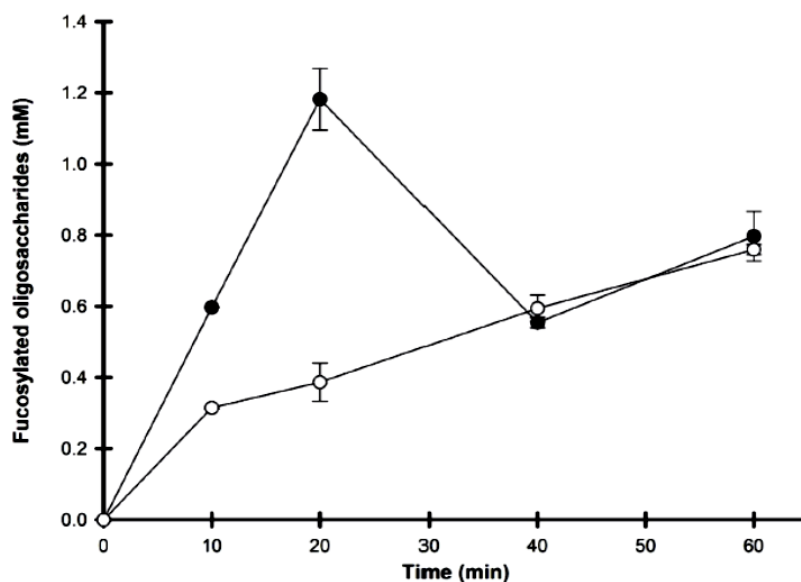


Fig. 4. Kinetics of transufosylation reaction catalyzed by the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Reaction was performed at 90 (○) and 95 °C (●) and pH 8, using 3.5 mM pNP-Fuc as donor substrate, 438 mM D-lactose as acceptor substrate and 0.0065 U/mL  $\alpha$ -L-fucosidase. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates.

However, the latter assumption may be a viable explanation since the HPLC column employed during analyses separated compounds according to molecular weight, and traces of long chain oligosaccharides produced in the reaction could be underestimated. This hypothesis needs to be further explored, for example, by performing tandem mass spectroscopy (MALDI-TOF) in order to identify all the possible compounds obtained during the transufosylation reaction.

Lezyk *et al.* (2016) reported a conversion rate of 0.23 mM/h in the synthesis of 2'-fucosyllactose using 0.51  $\mu$ g/mL  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*, 20 mM pNP-Fuc and 25 mM D-lactose at pH 5.0 and 30 °C. In another study, the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was employed at concentration of 0.13  $\mu$ g/mL to catalyze the synthesis of fucosyllactose, using 3.5 mM pNP-Fuc and 584 mM D-lactose at pH 5.9 and 60 °C. The highest conversion rate achieved in these conditions was 0.29 mM/h (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018). The conversion rate obtained in this study was higher than those reported by the aforementioned authors, noteworthy using lower concentration of  $\alpha$ -L-fucosidase (0.013  $\mu$ g/mL). However, in the present study different pH and temperature were employed.

## Conclusions

$\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* is already known for its capacity to synthesize fucosylated oligosaccharides through transufosylation. Nevertheless, this enzyme has not been previously tested at the conditions presented in this research. At the best reaction conditions determined in this work (pH 8 and 95 °C), the fucosyl-oligosaccharides were yielded at 3.54 mM/h. It is possible that the fucosylated oligosaccharides synthesized in this study have biological functions like human milk oligosaccharides and can be used either for clinical applications or as an additive to infant formula.

## Acknowledgements

We gratefully acknowledge to the National Council for Science and Technology (CONACyT) of Mexico for the scholarship received. Besides to the Autonomous University Metropolitan to financial support for this project



## References

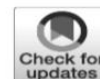
---

- Abdul Manas, N.H., Md. Ilias, R. and Mahadi, N.M. (2018). Strategy in manipulating ransglycosylation activity of glycosyl hydrolase for oligosaccharide production. *Critical reviews in biotechnology* 38, 272-293. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1339664>
- Becker, D.J. and Lowe, J.B. (2003). Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13, 41R-53R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg054>
- Benešová, E., Lipovová, P., Dvořáková, H. and Králová, B. (2013).  $\alpha$ -L-fucosidase from *Paenibacillus thiaminolyticus*: its hydrolytic and transglycosylation abilities. *Glycobiology* 23, 1052-1065. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt041>
- Berteau, O., Bielicki, J., Kilonda, A., Machy, D., Anson, D.S. and Kenne, L. (2004).  $\alpha$ -L-Fucosidases: exoglycosidases with unusual transglycosylation properties. *Biochemistry* 43, 7881-7891. <https://doi.org/10.1021/bi036066z>
- Chaturvedi, P., Warren, C.D., Altaye, M., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G., Pickering, L.K. and Newburg, D.S. (2001). Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* 11, 365-372. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.5.365>
- Cobucci-Ponzano, B., Mazzone, M., Rossi, M. and Moracci, M. (2005). Probing the catalytically essential residues of the  $\alpha$ -L-fucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry* 44, 6331-6342. <https://doi.org/10.1021/bi047495f>
- Costantino, H.R., Brown, S.H. and Kelly, R.M. (1990). Purification and characterization of an  $\alpha$ -glucosidase from a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, exhibiting a temperature optimum of 105 to 115 °C. *Journal of Bacteriology* 172, 3654-3660. <http://doi.org/10.1128/jb.172.7.3654-3660.1990>
- Escamilla-Lozano, Y., García-Garibay, M., López-Munguía-Canales, A., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G. and Cruz-Guerrero, A. (2015). Synthesis of  $\alpha$ -L-fucosidase in different strains of lactic acid bacteria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 623-629. <http://www.rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/1301/550>
- Escamilla-Lozano, Y., Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G. and Cruz-Guerrero, A. (2019). Synthesis of fucosyl-oligosaccharides using  $\alpha$ -L-fucosidase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Molecules* 24, 2402. <https://doi.org/10.3390/molecules24132402>
- Fourage, L., Dion, M. and Colas, B. (2000). Kinetic study of a thermostable  $\beta$ -glycosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of temperature and glucose on hydrolysis and transfucosylation reactions. *Glycoconjugate Journal* 17, 377-383. <https://doi.org/10.1023/A:1007104030314>
- Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C. and Coppa, G.V. (2011). Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* 128, e1520-e1531. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1206>
- Gumerov, V.M., Rakitin, A.L., Mardanov, A.V. and Ravin, N.V. (2015). A novel highly thermostable multifunctional beta-glycosidase from crenarchaeon *Acidilobus saccharovorans*. *Archaea* 2015, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2015/978632>
- Guo, L., Chen, X., Xu, L., Xiao, M. and Lu, L. (2018). Enzymatic synthesis of 6'-sialyllactose, a dominant sialylated human milk oligosaccharides, by a novel exo- $\alpha$ -sialidase from *Bacteroides fragilis* NTC9343. *Applied and Environmental Microbiology* 84, 1-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00071-18>
- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M. and Cruz-Guerrero, A. (2018). Synthesis of a fucosylated trisaccharide via transfucosylation by  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry*

- and *Biotechnology* 186, 681-691. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2771-x>
- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M. and Cruz-Guerrero, A. (2021). Synthesis of fucosylated oligosaccharides with  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* immobilized on Eupergit® CM. *Extremophiles*. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01230-3>
- Haq, I.U., Javed, M.U., Nawaz, A., Arshad, Y. and Mukhtar, H. (2020). Biosynthesis, purification, kinetic and thermodynamic analysis of phytase from *Aspergillus oryzae*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 19, 227-242. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1684>
- Hansson, T., Kaper, T., van der Oost, J., De Vos, W.M. and Adlercreutz, P. (2001). Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of  $\beta$ -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnology and Bioengineering* 73, 203-210. <https://doi.org/10.1002/bit.1052>
- Hensel, R., Laumann, S., Lang, J., Heumann, H. and Lottspeich, F. (1987). Characterization of two D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extremely thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*. *European Journal of Biochemistry* 170, 325-333. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13703.x>
- Ji, E.S., Park, N.H. and Oh, D.K. (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 759-764. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5487-8>
- Keleti, T.A. (1983). Errors in the evaluation of Arrhenius and van't Hoff plots. *Biochemical Journal* 209, 277-280. <https://doi.org/10.1042/bj2090277>
- Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulff, L., Gotfredsen, C.H., Mikkelsen, M.D. and Mikkelsen, J.D. (2016). Novel  $\alpha$ -L-fucosidases from a soil metagenome for production of fucosylated human milk oligosaccharides. *PLoS ONE* 11, 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147438>
- Liu, Z., Zhao, C., Deng, Y., Huang, Y. and Liu, B. (2015). Characterization of a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from a thermophilic anaerobic bacterial consortium YTY-70. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 29, 547-554. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1015244>
- Londesborough, J. (1980). The causes of sharply bent or discontinuous Arrhenius plots for enzyme-catalysed reactions. *European Journal of Biochemistry* 105, 211-215. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04491.x>
- Marana, S.R., Lopes, A.R., Juliano, L., Juliano, M.A., Ferreira, C. and Terra, W.R. (2002). Subsites of trypsin active site favor catalysis or substrate binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 494-497. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6172>
- Mehmood M.A., Shahid, I., Hussain, K., Latif, F. and Rajoka M.I. (2014). Thermodynamic properties of the  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga maritima* extend the upper limit of thermophilicity. *Protein & Peptide Letters* 21, 1282-1288. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.3654-3660.1990>
- Munir, M., Abdullah, R., Haq, I.U., Kaleem, A., Iqtedar, M. and Ashraf, S. (2020). Purification, characterization, kinetics and thermodynamic analysis of polygalacturonase from *Aspergillus tamarii* for industrial applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 19, 293-304. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1753>
- Pouwels, J., Moracci, M., Cobucci-Ponzano, B., Perugino, G., van der Oost, J., Kaper, T., Lebbink, J.H.G., de Vos, W.M. Ciaramella, M. and Rossi, M. (2000). Activity and stability of hyperthermophilic enzymes: a comparative study on two archaeal  $\beta$ -glycosidases. *Extremophiles* 4, 157-164. <https://doi.org/10.1007/s007920070030>
- Rudloff, S. and Kunz, C. (2012). The glycobiology of human milk oligosaccharides - milk oligosaccharides and metabolism in infants. *Advances in Nutrition* 3, 398S-405S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001594>

- Segel, I.H. (1976). Enzymes. In: *Biochemical Calculations*, (Segel, I.H, ed), Pp 208-319. Wiley, New York.
- Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C.A., Withers, S.G., Henrissat, B. and Bourne, Y. (2004). Crystal structure of *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -L-fucosidase: insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 13119-13128. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313783200>
- Tarling, C.A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Bourne, Y., Henrissat, B. and Withers, S.G. (2003). Identification of the catalytic nucleophile of the family 29  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47394-47399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306610200>
- Turner, P., Svensson, D., Adlercreutz, P. and Karlsson, E.N. (2007). A novel variant of *Thermotoga neapolitana*  $\beta$ -glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transfucosylation. *Journal of Biotechnology* 130, 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.016>
- Vieille, C. and Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and molecular biology reviews* 65, 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>
- Vera, C., Guerrero, C. and Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research* 346, 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.030>
- Warmerdam, A., Wang, J., Boom, R. M. and Janssen, A. E. M. (2013). Effects of carbohydrates on the oNPG converting activity of  $\beta$ -galactosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 6458-6464. <https://doi.org/10.1021/jf4008554>
- Wu, Y., Yuan, S., Chen, S., Wu, D., Chen, J. and Wu, J. (2013). Enhancing the production of galacto-oligosaccharides by mutagenesis of *Sulfolobus solfataricus*  $\beta$ -galactosidase. *Food Chemistry* 138, 1588-1595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.052>
- Yang, J., Gao, R., Zhou, Y., Anankanbil, S., Li, J., Xie, G. and Guo, Z. (2018).  $\beta$ -Glucosidase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10 for exclusive synthesis of galactotrisaccharides: Kinetics and thermodynamics insight into reaction mechanism. *Food chemistry* 240, 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.201.07.155>
- Zehra, S., Khambati, I., Vierhout, M., Mian, M.F., Buck, R. and Forsythe, P. (2018). Human milk oligosaccharides attenuate antigen-antibody complex induced chemokine release from human intestinal epithelial cell lines. *Journal of Food Science* 83, 499-508. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14039>
- Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J.D. and Meyer, A.S. (2014). Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 9615-9631. <https://doi.org/10.1021/jf502619p>
- Zeuner, B., Nyffenegger, C., Mikkelsen, J.D. and Meyer, A.S. (2016). Thermostable  $\beta$ -galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology* 33, 355-360. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.003>
- Zeuner, B., Muschiol, J., Holck, J., Lezyk, M., Gedde, M.R., Jers, C., Dalgaard, M. and Meyer, A.S. (2018). Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29  $\alpha$ -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology* 41, 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.002>





## Improvement of Fucosylated Oligosaccharides Synthesis by $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* in Water-Organic Cosolvent Reaction System

Mónica A. Robles-Arias<sup>1</sup> · Mariano García-Garibay<sup>1,2</sup> · Sergio Alatorre-Santamaría<sup>1</sup> · Salvador R. Tello-Solís<sup>3</sup> · Francisco Guzmán-Rodríguez<sup>1</sup> · Lorena Gómez-Ruiz<sup>1</sup> · Gabriela Rodríguez-Serrano<sup>1</sup> · Alma E. Cruz-Guerrero<sup>1</sup>

Received: 16 April 2021 / Accepted: 12 July 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

The effects of water activity ( $a_w$ ), pH, and temperature on transglycosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* in the synthesis of fucosylated oligosaccharides were evaluated using different water-organic cosolvent reaction systems. The optimum conditions of transglycosylation reaction were the pH range between 7 and 10 and temperature 90–95 °C. The addition of organic cosolvent decreased  $\alpha$ -L-fucosidase transglycosylation activity in the following order: acetone > dimethyl sulfoxide (DMSO) > acetonitrile (0.51 > 0.42 > 0.18 mM/h). However, the presence of DMSO and acetone enhanced enzyme-catalyzed transglycosylation over hydrolysis as demonstrated by the obtained transglycosylation/hydrolysis rate ( $r_{T/H}$ ) values of 1.21 and 1.43, respectively. The lowest  $r_{T/H}$  was calculated for acetonitrile (0.59), though all cosolvents tested improved the transglycosylation rate in comparison to a control assay (0.39). Overall, the study allowed the production of fucosylated oligosaccharides in water-organic cosolvent reaction media using  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* as biocatalyst.

**Keywords** Fucosylated oligosaccharides · Fucosidase · *Thermotoga maritima* ·  $a_w$  · Organic solvents

✉ Alma E. Cruz-Guerrero  
aec@xanum.uam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340 Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias de La Alimentación, Universidad Autónoma Metropolitana, Lerma, Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, 52006 Lerma de Villada, State of Mexico, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, 09340 Mexico City, Mexico

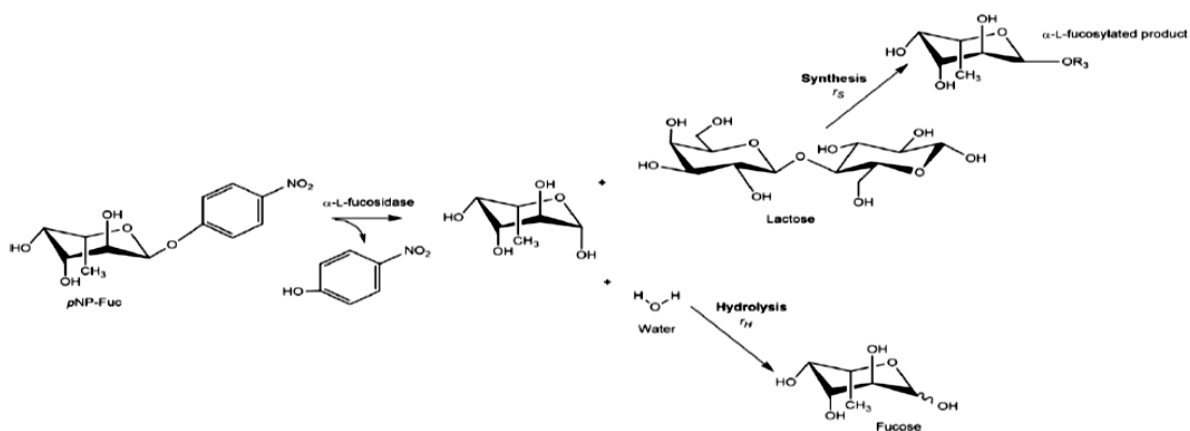
## Introduction

Although highly abundant, human milk oligosaccharides (HMOs) are unique to human breast milk (10–15 g/L). They are widely known to play an important role in infant health by acting as prebiotics, modulators of gut motility, as well as they prevent enteric infections by blocking the adhesion of pathogenic bacteria [1, 2]. Chemical structures of HMOs follow a similar blueprint, for example, 3-fucosyllactose can be formed when the hydroxyl group at C-3 of glucose at the reducing end of a lactose molecule is substituted by fucose while the most abundant 2'-fucosyllactose is obtained by the substitution of the hydroxyl group at C-2 of galactose [3].

In vivo biosynthesis of fucosylated oligosaccharides is catalyzed by specific transferases found in the Golgi apparatus of the mammary alveolar cells [4]. Since these enzymes are difficult to express and purify, as well as require expensive nucleotide-activated substrates, which add to the high cost of their production, their usage for the in vitro synthesis of fucosylated oligosaccharides is limited [5, 6]. In contrast, glycosidases with transfucosylation activity like  $\alpha$ -L-fucosidases (E.C. 3.2.1.51) are more available and relatively inexpensive with broad substrate specificity which is an advantageous characteristic in the synthesis of fucosylated oligosaccharides [7, 8]. Under conventional conditions, fucosidases inherently catalyze the glycosidic bond hydrolysis [6]. However, when an acceptor molecule other than water is present in the reaction media, it can attack the nucleophilic glycosyl-enzyme intermediate, and the transglycosylation reaction can proceed (Fig. 1). The most recent reports have described successful protocols to obtain fucosylated oligosaccharides in the  $\alpha$ -L-fucosidase-assisted enzymatic reactions [9–12].

Owing to the fact that fucosidase-catalyzed synthesis of carbohydrates can be controlled kinetically, it has been possible to shift reaction equilibrium in favor of transglycosylation by manipulating reaction conditions [13]. The implemented strategies rely on the suppression of water activity ( $a_w$ ) in the media by either the addition of high concentrations of acceptor substrate [14] or the incorporation of organic cosolvents [15–17].

The main limitation to these approaches lies in the fact that enzymes may show lower activity in the presence of organic cosolvents compared to an aqueous medium while solubility of nonpolar substrates and products is increased [13, 16]. However, successful



**Fig. 1** Scheme of reaction mechanism of  $\alpha$ -L-fucosidase. If the acceptor is a glucosyl molecule, transglycosylation occurs, meanwhile if the acceptor is water hydrolysis occurs



applications of miscible organic solvents in enzymatic reactions, such as dimethyl sulfoxide (DMSO) [18, 19], acetone [20, 21], or acetonitrile [22], have been reported.

Thus, this work aimed at studying the effects of water-miscible organic solvents in the reaction system on transglycosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* to produce fucosylated oligosaccharides.

## Materials and Methods

### Material

4-Nitrophenyl  $\alpha$ -L-fucopyranoside (*p*NP-Fuc), 4-nitrophenol (*p*NP), 2'-fucosyllactose, D-lactose, and L-fucose were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); sodium monophosphate, sodium diphosphate, NaOH, acetone, acetonitrile, and DMSO were purchased from J.T. Baker (Mexico State, Mexico). Recombinant  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* (E.C. 3.2.1.51) was acquired from Megazyme (Leinster, Ireland) at a concentration of 5 U/mL (2.6 U/mg) in 3.2-M ammonium sulfate and diluted 1:1000 (v/v) in 0.1-M phosphate buffer at the corresponding pH. Milli-Q® water (Merck, Germany) was used throughout all experiments.

### $\alpha$ -L-Fucosidase Activity Assay

$\alpha$ -L-Fucosidase activity assay was carried out for 10 min at 60 °C. Briefly, 50  $\mu$ L of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was added to 450  $\mu$ L of *p*NP-Fuc (3.5 mM) in phosphate buffer (0.1 M, pH 8) and the reaction progress was analyzed every minute. The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ L of NaOH (1 M). Released *p*NP was quantified by measuring absorbance (Shimadzu UV-1800, Tokyo, Japan) at 410 nm. One unit of  $\alpha$ -L-fucosidase is defined as the amount of enzyme required to release 1 mmol of *p*NP under the assay conditions.

### Synthesis of Fucosylated Oligosaccharides

Enzymatic synthesis of fucosylated oligosaccharides was performed in phosphate buffer (0.1 M, pH 8) for 120 min at 90 °C. The reaction mixture consisted of  $\alpha$ -L-fucosidase (0.0065 U/mL), *p*NP-Fuc (3.5 mM) as a donor substrate, and D-lactose (438 mM) as an acceptor substrate. The reaction progress was analyzed every 30 min until stopped by adding 50  $\mu$ L of NaOH (1 M). The synthesized fucosylated oligosaccharides were quantified as described in the "Carbohydrate Quantification" section. Released *p*NP was quantified by measuring absorbance (Shimadzu UV-1800, Tokyo, Japan) at 410 nm.

### Effects of pH, Temperature, and Enzyme Concentration on Transglycosylation Activity of $\alpha$ -L-Fucosidase

The effect of pH on transglycosylation activity was determined in the pH range from 5 to 10 for 1 h at 60 °C. Briefly, 50  $\mu$ L of  $\alpha$ -L-fucosidase (0.0065 U/mL) from *T. maritima* was added to 400  $\mu$ L of phosphate buffer (0.1 M) containing *p*NP-Fuc (3.5 mM) and D-lactose (438 mM). The reaction progress was analyzed at 10, 20, 40, and 60 min until stopped by

adding 50  $\mu\text{L}$  of NaOH (1 M). The synthesized fucosylated oligosaccharides were quantified as described in the “Carbohydrate Quantification” section. In a similar way, the effect of temperature on transglycosylation activity was determined. Experiments were carried out in a temperature range from 60 to 95  $^{\circ}\text{C}$ . The effect of enzyme concentration was determined similarly, employing 0.013, 0.026, 0.052, and 0.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  at pH 8 and 90  $^{\circ}\text{C}$ . The conversion yield was defined as the ratio of the synthesized fucosylated oligosaccharides to the initial concentration of donor substrate (*p*NP-Fuc). One unit of  $\alpha$ -L-fucosidase was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu\text{mol}$  of *p*NP per minute under the conditions described.

### Estimation of $a_w$

In this study,  $a_w$  was estimated for DMSO, acetone, and acetonitrile in different proportions using a combination of the models reported by Bell et al. [23] and García-Garibay et al. [24]. Firstly, Wilson coefficients were calculated considering the molar volume of water as 18 mL/mol, DMSO as 71.3 mL/mol, acetone as 74.05 mL/mol, and acetonitrile as 52.86 mL/mol, with a gas constant (*R*) of 8.314 J/mol K at a temperature of 333 K (temperature of the enzymatic reaction). Calculated intermediate values were DMSO ( $\Lambda_{ws} = 6.0306$  and  $\Lambda_{sw} = 0$ ), acetone ( $\Lambda_{ws} = 0.4619$  and  $\Lambda_{sw} = 0.1298$ ), and acetonitrile ( $\Lambda_{ws} = 0.3589$  and  $\Lambda_{sw} = 0.1483$ ). Later, the coefficients of water activity for each water:solvent media were calculated, and finally  $a_w$  of the system were determined.

### Effect of $a_w$ on the Stability and Hydrolytic Activity of $\alpha$ -L-Fucosidase

The effect of  $a_w$  on enzyme stability was evaluated by the addition of organic cosolvent to the reaction system during 180 min at 60  $^{\circ}\text{C}$ . The test solvents were acetone ( $a_w$  0.97), acetonitrile ( $a_w$  0.96), or DMSO ( $a_w$  0.99). Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -L-fucosidase was mixed with 10  $\mu\text{L}$  of cosolvent and 40  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer (0.1 M, pH 8). Reaction progress was monitored every 30 min. The enzyme activity was measured spectrophotometrically through the release of *p*NP as already described. Residual hydrolytic activity was determined as the percentage of enzyme activity compared to control.

The effect of  $a_w$  on the  $\alpha$ -L-fucosidase hydrolytic activity was evaluated by varying the volume of cosolvent in phosphate buffer (0.1 M, pH 8). The reactions were carried out at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min. In brief, 50  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was added to the reaction mixture containing 3.5 mM *p*NP-Fuc, and different concentrations of test cosolvents in the reaction volume of 450  $\mu\text{L}$  as specified in Table 1. The reaction was monitored every minute

**Table 1**  $a_w$  values estimated at different solvent concentrations

Solvent volume ( $\mu\text{L}$ )	*Buffer volume ( $\mu\text{L}$ )	$a_w$ acetone	$a_w$ acetonitrile	$a_w$ DMSO
50	400	0.97	0.96	0.99
100	350	0.95	0.93	0.96
150	300	0.93	0.91	0.91
200	250	0.91	0.90	0.83
250	200	0.90	0.88	0.74

\*Phosphate buffer (0.1 M pH 8)

until stopped by adding 50  $\mu\text{L}$  of NaOH (1 M). The hydrolytic activity was measured spectrophotometrically through the release of *p*NP as already described. Residual hydrolytic activity was determined as the percentage of enzyme activity compared to control.

### Effect of Organic Media on the Transglycosylation Reaction

The effect of acetone ( $a_w$  0.97), acetonitrile ( $a_w$  0.96), and DMSO ( $a_w$  0.99) on the  $\alpha$ -L-fucosidase transglycosylation activity was evaluated for 180 min at 60 °C. Reaction volume of 450  $\mu\text{L}$  was kept constant while varying the organic cosolvent concentration in phosphate buffer (0.1 M, pH 8) as specified in Table 1. The reaction mixture consisted of 50  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* (0.0065 U/mL), *p*NP-Fuc (3.5 mM), and D-lactose (438 mM). The reaction progress was analyzed every 30 min until stopped by adding 50  $\mu\text{L}$  of NaOH (1 M). The synthesized fucosylated oligosaccharides were quantified by HPLC as described in the “Carbohydrate Quantification” section. The hydrolytic activity was evaluated under the same conditions of transglycosylation, through the *p*NP released as already described. The rate of transglycosylation to hydrolysis ( $r_{T/H}$ ) was expressed as the concentration ratio of the synthesized fucosylated oligosaccharides to the released *p*NP.

### Carbohydrate Quantification

The quantification of the synthesized fucosylated oligosaccharides and the released fucose was performed on the HPLC (LabAlliance, State College, PA, USA) with an ion-exclusion column Rezex RNO-Oligosaccharides Na<sup>+</sup> (4%) (60  $\times$  10 mm; particle size 12  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex; Amstelveen, Netherlands) and oven temperature of 75 °C. The HPLC was equipped with a SOFTA 300S light scattering detector (Chrom Tech, MN, USA) with a nitrogen flow of 62.5 psi, spray chamber temperature of 10 °C, and a drift tube temperature of 45 °C.

Samples were filtered through 0.22- $\mu\text{m}$  Millipore Durapore membranes prior to assay by HPLC and were eluted with Milli-Q water at a flow rate of 0.3 mL/min. A calibration curve of 2'-fucosyllactose was used to estimate the amount of the product formed. Additionally, a standard 2'-fucosyllactose, D-lactose, and L-fucose were used to determine their retention times and identify the reaction products.

### Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate and results are reported as a mean value  $\pm$  standard deviation. For statistical analysis, the statistical software IBM SPSS Statistic version 25.0 for Windows (IBM, NY, USA) was used to carry out a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test for comparing all pairs of groups. A *p* value of 0.05 was considered statistically significant.

## Results and Discussion

### Synthesis of Fucosylated Oligosaccharides

The synthesis of fucosylated oligosaccharides was carried out using *p*NP-Fuc and D-lactose as donor and acceptor substrates, respectively. Figure 2b shows a typical HPLC

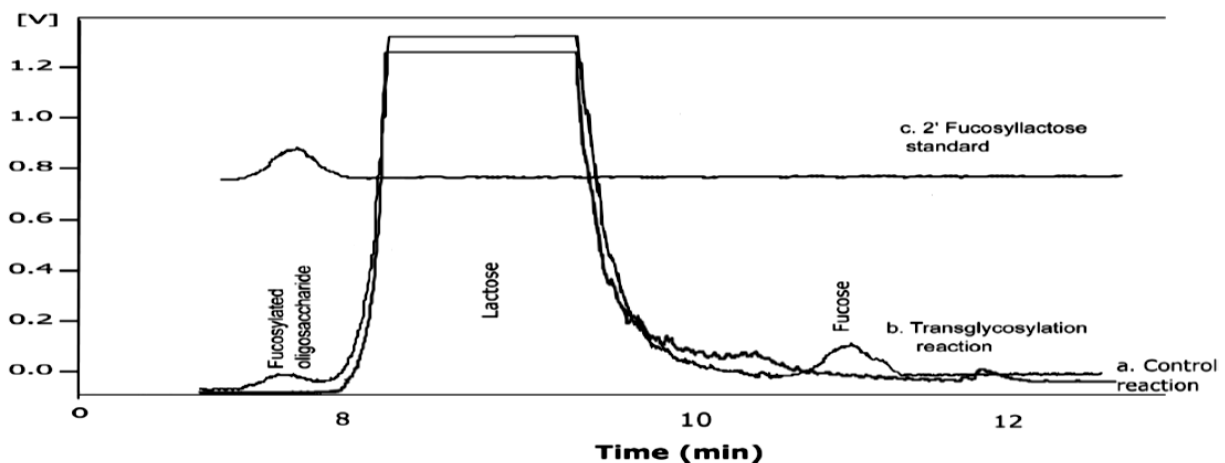


chromatogram of transglycosylation products. Retention time of the obtained fucosylated oligosaccharide (7.7 min) coincided with that of 2'-fucosyllactose standard (Fig. 2c). In addition, Fig. 2b reveals the presence of fucose and fucosylated oligosaccharides which is indicative that the enzyme catalyzed both the hydrolysis of *p*NP-Fuc and transglycosylation, respectively.

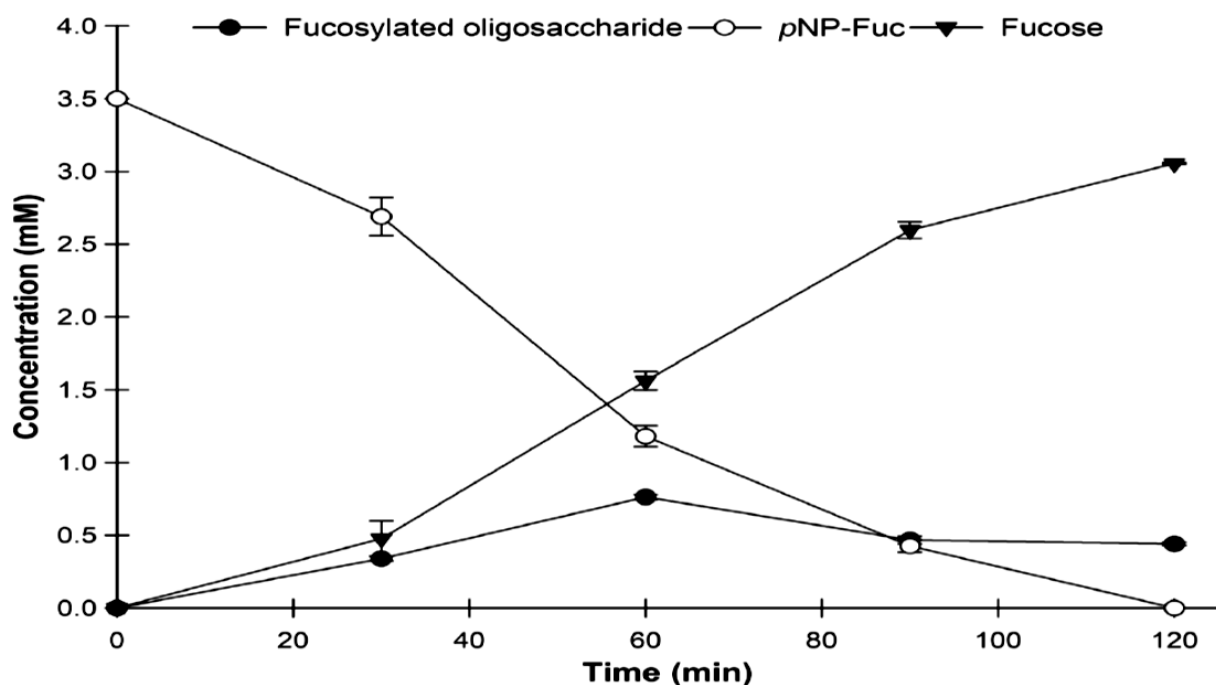
More detailed observations of the reaction progress of typical transglycosylation reaction are shown in Fig. 3. The highest concentration of fucosylated oligosaccharide (0.76 mM) was detected after 60 min. As can be observed, in parallel to the *p*NP-Fuc hydrolysis, some of the released fucose was enzymatically transferred to lactose leading to the formation of fucosylated oligosaccharide while the remaining fucose was observed as free fucose in the reaction medium. Similar results have been described by other authors; Lezyk et al. [10] reported an activity of 0.0038 UE/mL in the synthesis of 2'-fucosyllactose using  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* at a concentration of 51  $\mu$ g/mL, employing 20-mM *p*NP-Fuc and 25-mM D-lactose at pH 5.0 and 30 °C. On the other hand, Okuyama et al. [25] reported an activity of 0.004 UE/mL in the synthesis of galactosyl oligosaccharides by using a retaining  $\alpha$ -galactosidase mutant of *Bacteroides thetaiotaomicron* (BtGH97b) at a concentration of 4.8  $\mu$ mol/mL. The activity obtained in this study (0.0127 UE/mL) was higher than those reported by the aforementioned authors and using lower concentration of  $\alpha$ -L-fucosidase (0.013  $\mu$ g/mL).

### Effect of pH and Temperature on the $\alpha$ -L-Fucosidase Transglycosylation Activity

Figure 4a shows the transglycosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. The highest activity was found in the pH range from 7 to 10 since no statistically significant difference was calculated for this pH interval ( $p < 0.05$ ). Additionally, the enhanced transglycosylation activity was observed with the increasing pH from 5 to 8, which resulted in the improved yields from 6.07 to 40.67%, respectively. It is remarkable how



**Fig. 2** Typical chromatograms obtained by HPLC from **a** control reaction, **b** sample of the transglycosylation reaction, and **c** 2'-fucosyllactose standard. Transglycosylation reaction was performed at 90 °C and pH 8 by using 3.5-mM *p*NP-Fuc as the donor substrate, 438-mM D-lactose as the acceptor substrate, and 0.0065 U/mL  $\alpha$ -L-fucosidase



**Fig. 3** Kinetics of transglycosylation reaction catalyzed by  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Reaction was performed at 90 °C using 3.5-mM pNP-Fuc as donor substrate, 438-mM D-lactose as acceptor substrate, and 0.0065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase. All reacts were dissolved in 0.1-M phosphate buffer at pH 8

transglycosylation reaction yields can be increased by working at optimum conditions. The obtained data are comparable with those reported for other glycosidases from thermophilic sources when reaction conditions were optimized. In accordance with our results, Wu et al. [26] reported improved yields in galactooligosaccharides (GOS) synthesis by changing pH from 4 to 6 in a reaction catalyzed by  $\beta$ -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. Similarly, Ji et al. [27] determined pH 6 as the optimum for the GOS production catalyzed by a recombinant  $\beta$ -galactosidase from *T. maritima* expressed in *Escherichia coli* in contrast to pH above 7 at which the enzyme activity was remarkably reduced. In another study, the improved yields of GOS were linked to the pH rise from 5 to 5.5 using  $\beta$ -mannosidase from *Pyrococcus furiosus* as a catalyst [28].

It is noteworthy that conversion yields of enzymatic transglycosylation increase in alkaline media. Sulzenbacher et al. [29] and Tarling et al. [30] suggested that pH changes of the reaction medium affected the  $pK_a$  of the key amino acids involved in the catalysis: Asp224 and Glu266. Abdul Manas et al. [13] concluded that ionization of this key amino acid was a determinant factor in favoring interactions with either water, which would lead to hydrolysis, or sugar acceptor resulting in the improved yield of transglycosylation product as observed in the present work.

As for the effect of temperature, the highest transglycosylation activity was observed at 95 °C (Fig. 4b). Furthermore, the product yield at 95 °C was three times higher than that obtained at 60 °C (32.01 and 10.58% respectively). Similar results were observed by Zeuner et al. [31] who reported a sixfold increase of the product yield (from 0.9 to 5.4%) of *N*-acetyllactosamine catalyzed by  $\beta$ -galactosidase from *P. furiosus* when the



**Fig. 4** Effect of pH (a), temperature (b), and enzyme concentration (c) on the initial velocity of transglycosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. The effect of pH on the initial reaction velocity of the transglycosylation activity was performed at different pH and 60 °C by using pNP-Fuc 3.5 mM and lactose 438 mM. The effect of temperature was evaluated under the same conditions but at pH 8 and different temperatures. The effect of enzyme concentration was evaluated under the same conditions but at pH 8 and 90 °C. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates

temperature was raised from 40 to 90 °C. In another work, the concentration of GOS in the presence of  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* was three times greater at 60 °C than at 25 °C (5 and 15 g/L, respectively) [32]. Moreover, the research group of Fourage et al. [33] reported a 2.6-fold increase of yield in the pNP-Fuc-Fuc synthesis (from 16 to 42%) catalyzed by  $\beta$ -glycosidase from *Thermus thermophilus*, in response to the temperature rise from 37 to 75 °C.

Figure 4c shows the results obtained after varying the concentration enzyme. The highest transglycosylation activity was found at 0.013  $\mu$ g/mL. When adding more enzyme, the reaction predominant was hydrolysis. Similar results were reported by other authors. Bridiau et al. [34] reported that a lower enzyme concentration (28.5 UE/mL) obtained higher transglycosylation yield in the N-acetyl-lactosamine synthesis, using the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans*. Moreover, Abdul Manas et al. [35] reported that transglycosylation was dominant at an enzyme concentration of 10 U and lower in the malto-oligosaccharide production from *Bacillus lehensis* G1. In another study,  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was employed at a concentration of 0.13  $\mu$ g/mL to catalyze the synthesis of fucosyllactose, using 3.5-mM pNP-Fuc and 584-mM D-lactose at pH 5 and 60 °C. The highest concentration in these conditions was 0.29 mM at 60 min [9], being less than that obtained in this study.

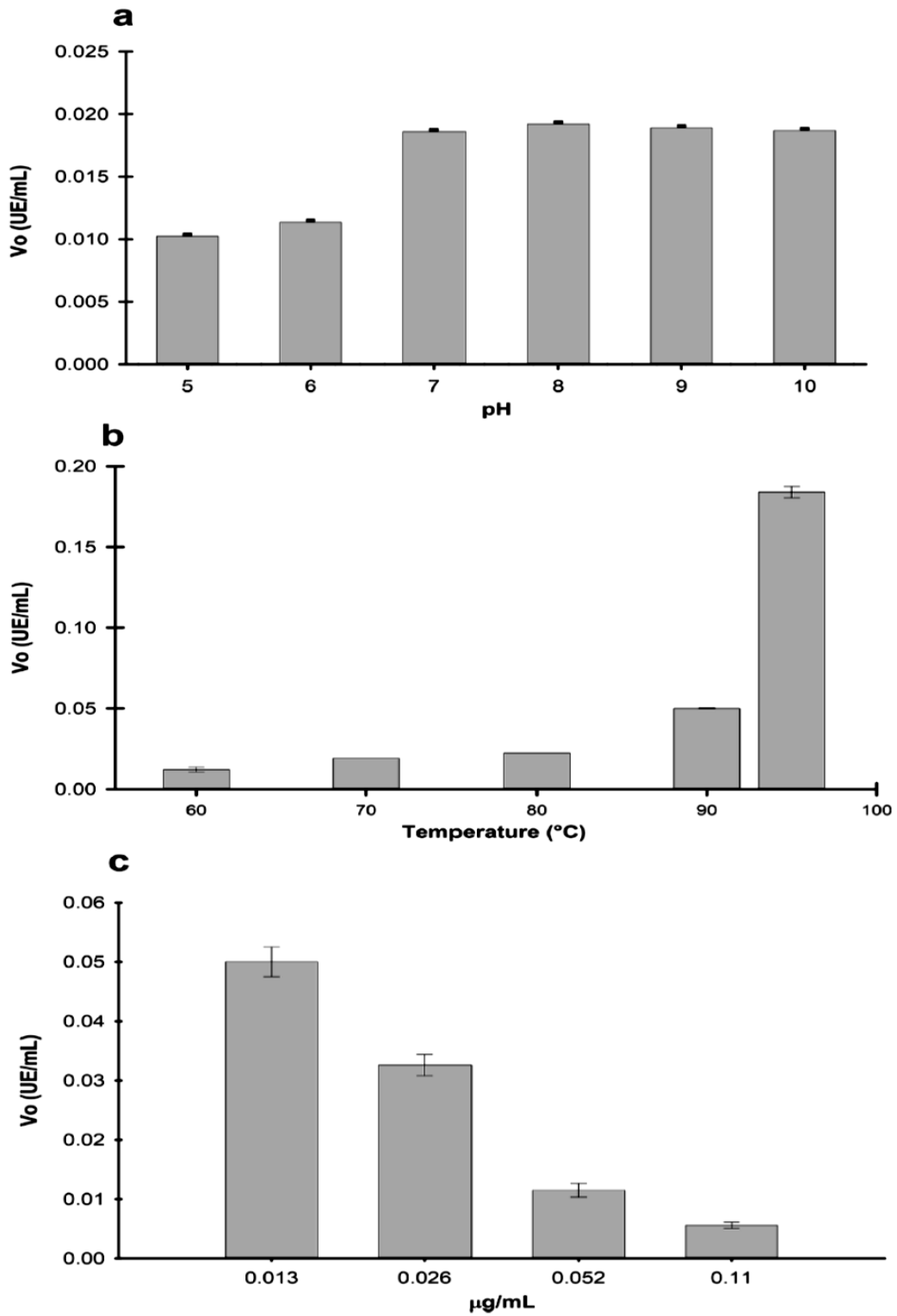
### Estimation of $a_w$ in the Reaction System

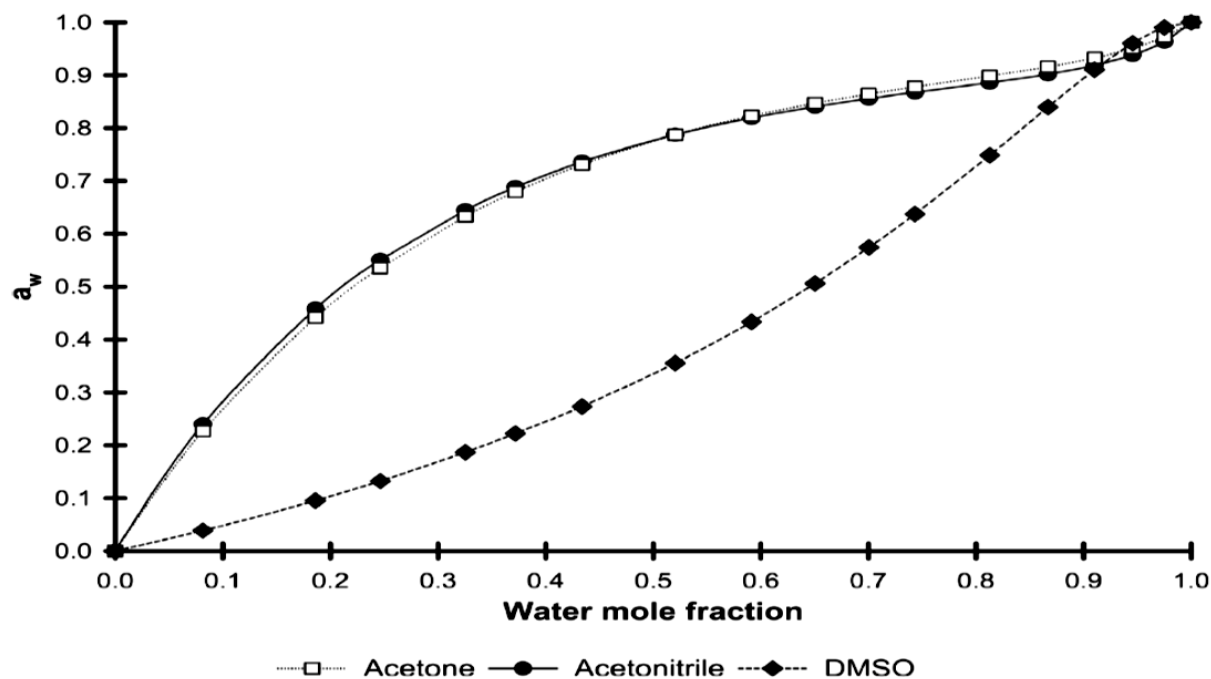
Since water distribution in the reaction medium of enzymatic process tends to maintain balance with all the components of such system, the thermodynamic parameter  $a_w$  is the best variable to determine water availability in mixed-solvents systems. The  $a_w$  values of media containing test cosolvents were evaluated, according to a model previously described for enzymatic reactions in organic media [23, 24] and reported in Fig. 5 and Table 1. As can be seen, the test solvents affected the  $a_w$  of reaction system differently. Since the obtained isotherms followed the same pattern as those reported by Bell et al. [23] and Cruz-Guerrero et al. [20], the data were deemed valid.

### Effect of $a_w$ on the Hydrolytic Activity and Stability of $\alpha$ -L-Fucosidase

By changing  $a_w$  of the reaction medium, it is possible to increase production yield of fucosylated oligosaccharides. Prior to the experiment, enzyme stability was examined in a test medium with a variable  $a_w$  value obtained by the addition of a water-miscible cosolvent. The three organic solvents and the corresponding  $a_w$  of the reaction medium were acetone ( $a_w$  0.97), acetonitrile ( $a_w$  0.96), and DMSO ( $a_w$  0.99). As shown in Fig. 6a, no difference in enzyme activity was observed for the reaction systems tested ( $p < 0.05$ ) during the reaction course, and the enzyme retained around 76% of its activity after 180 min in comparison to control. Pyeon et al. [36] reported that the recombinant  $\beta$ -glycosidase from *Microbulbifer thermotolerans* displayed 93, 79, and 20% of



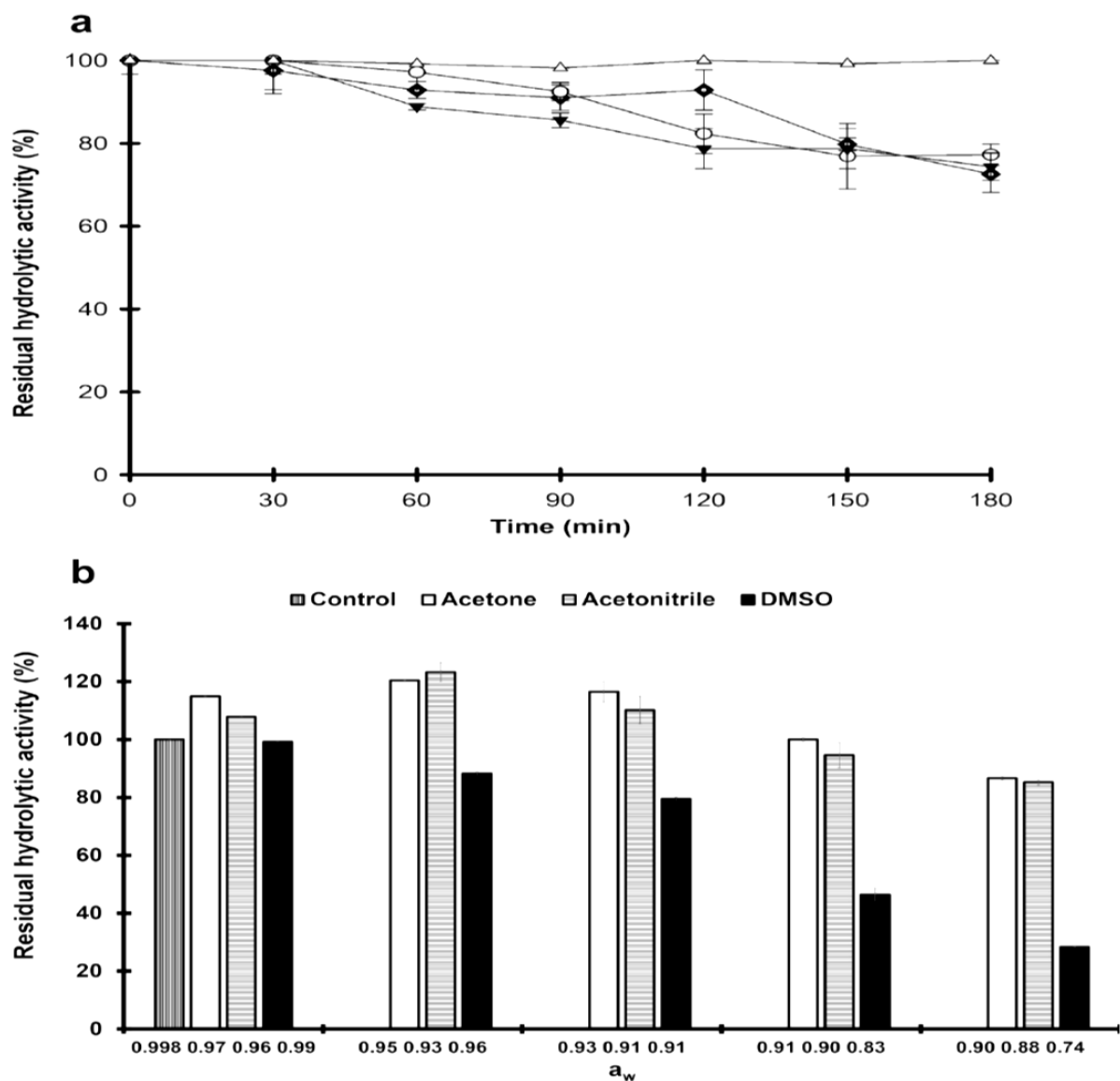




**Fig. 5** Sorption isotherms for acetone ( $\square$ ), acetonitrile ( $\bullet$ ), and DMSO ( $\blacklozenge$ ). The  $a_w$  values at different ratios were estimated by a combination of the models reported by Bell et al. [23] and García-Garibay et al. [24]

its activity after incubation in acetone ( $a_w$  0.97), DMSO ( $a_w$  0.98), and acetonitrile ( $a_w$  0.96), respectively. In their previous study [37], a recombinant chitinase MtCh509 from *M. thermotolerans* was reported to retain up to 100% its activity in media with DMSO as an additive at  $a_w$  of 0.99 and 0.96, whereas in the presence of acetone and acetonitrile, the enzyme activity decreased remarkably. As a general rule, it is assumed that thermophilic enzymes possess rigid structures that directly contribute to their apparent resistance to organic solvents [38]. In this context, the preserved enzymatic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase used in this work in the presence of the three cosolvents can be explained in a similar manner.

As can be seen in Fig. 6b, residual hydrolytic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase exceeded 100% in the presence of acetone ( $a_w$  0.97, 0.95, 0.93) and acetonitrile ( $a_w$  0.96, 0.93, 0.91). Nevertheless, at the  $a_w$  values lower than 0.91, the enzyme activity declined. In case of DMSO as cosolvent in the reaction system at  $a_w$  0.99, no significant improvement of enzymatic activity was observed in comparison to the control assay ( $p < 0.05$ ), but at lower  $a_w$ , the  $\alpha$ -L-fucosidase performance was negatively affected. Conversely, Mallek-Fakhfakh and Belghith [39] described no changes in the activity of  $\beta$ -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* in the presence of DMSO at  $a_w$  of 0.97, while further drop of  $a_w$  to 0.91 caused remarkable enzyme deactivation. Furthermore, Jiang et al. [40] reported that the activity of xylanase B from *T. maritima* was unaffected by the addition of DMSO ( $a_w$  0.96). The solvent impact on enzyme activity is mostly correlated with Log  $P$  or another measure of its polarity rather than a combination of factors such as the dielectric constant, the dipole moment, the ability to form hydrogen



**Fig. 6** Stability **(a)** and residual hydrolytic activity **(b)** of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. The time course of change in the stability of the  $\alpha$ -L-fucosidase was determined by incubating 0.013 U/mL  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* at 60 °C in phosphate buffer (0.1 M, pH 8) as control ( $a_w$  0.998) and buffer-organic solvent; acetone ( $a_w$  0.97), acetonitrile ( $a_w$  0.96), and DMSO ( $a_w$  0.99) during 180 min:  $\Delta$  control,  $\square$  acetone,  $\bullet$  acetonitrile, and  $\blacklozenge$  DMSO. To observe the residual hydrolytic activity, reaction was performed at 60 °C and using either acetone, acetonitrile, or DMSO as a cosolvent, 3.5-mM *p*NP-Fuc and 0.0065 U/mL  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Control assay was performed in the absence of cosolvent under the same conditions and considered 100% of the residual hydrolytic activity. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates



**Fig. 7** Effect of the solvents on the **a** synthesis of fucosylated oligosaccharides, **b** hydrolytic activity, and **c**  $r_{S/H}$  ratio catalyzed by  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Hydrolysis reaction was performed at 60 °C during 180 min either with acetone ( $a_w$  0.97), acetonitrile ( $a_w$  0.96), and DMSO ( $a_w$  0.99) as cosolvent in the reaction medium, 3.5-mM *p*NP-Fuc and 0.0065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Transglycosylation reaction was performed at the same conditions but adding 438-mM D-lactose as the acceptor:  $\square$  acetone,  $\bullet$  acetonitrile, and  $\blacktriangle$  DMSO. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicate

bonds, as well as denaturation capability. Taken together, these properties determine how the solvent affects the way reactants interact with the active site of the enzyme [41]. The extremophile  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* employed in this work displayed higher resistance in the presence of different concentrations of organic solvents. This is an attractive feature for their usage in many industrial processes.

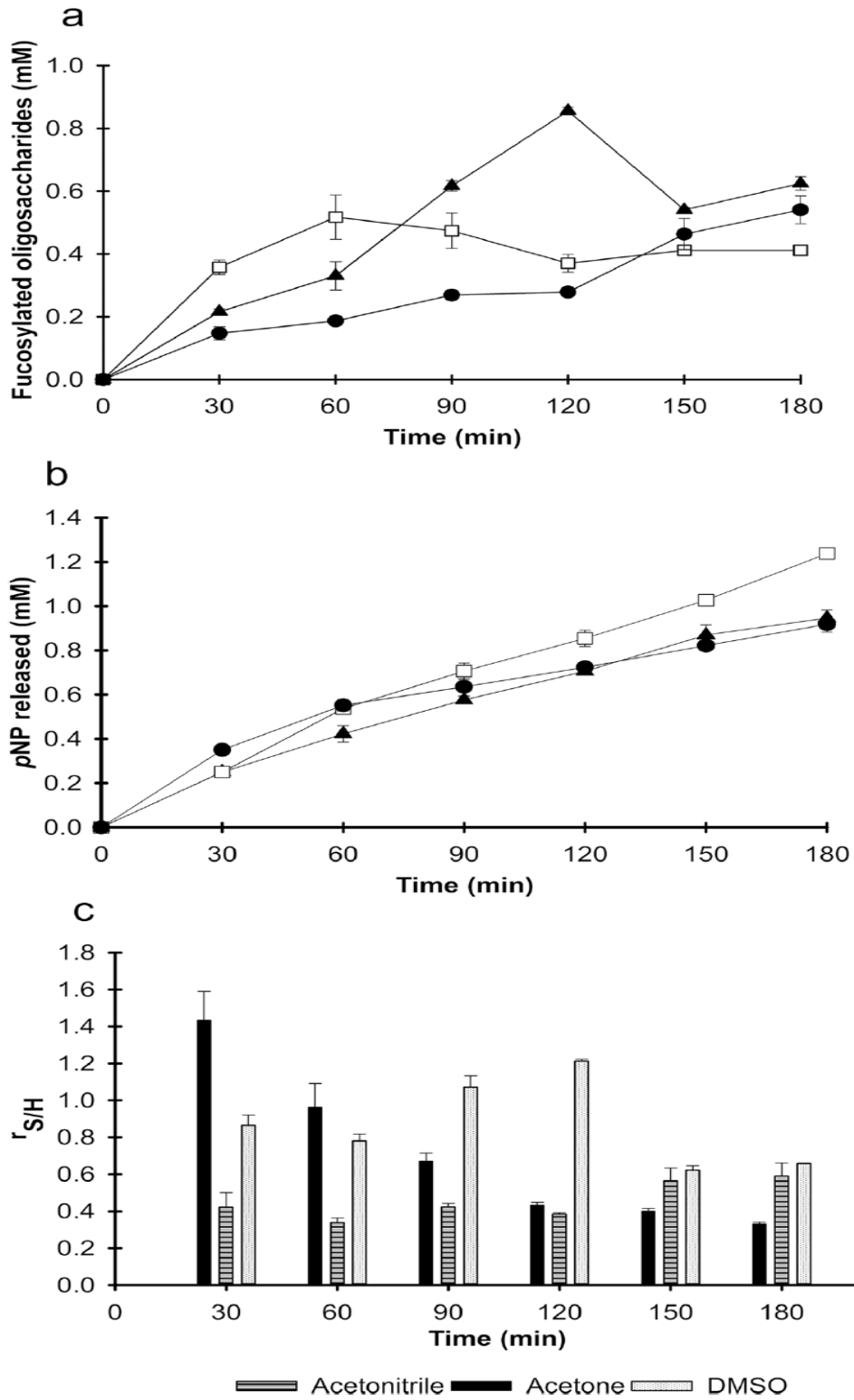
### Effect of Organic Media on the $\alpha$ -L-Fucosidase Transglycosylation Activity

Based on the results from previous experiments,  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* showed high stability and activity in the reaction media containing acetone ( $a_w$  0.97), acetonitrile ( $a_w$  0.96), and DMSO ( $a_w$  0.99) at reaction conditions of 60 °C and pH 8. Thus, these cosolvents were studied in the enzymatic synthesis of fucosylated oligosaccharides. Figure 7a demonstrates the reaction course of transglycosylation using different cosolvents in a reaction system. The highest productivity was achieved in the medium with the addition of acetone followed by DMSO and acetonitrile (acetone > DMSO > acetonitrile = 0.51 > 0.42 > 0.18 mM/h).

On the contrary, Trincone et al. [42] reported improved yields in the synthesis of  $\beta$ -D-glucopyranoside disaccharides and trisaccharides catalyzed by a mutant  $\beta$ -glycosidase from *S. solfataricus* (Ss- $\beta$ -glyE387G) when acetonitrile was added to the reaction system. In other studies, a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase was used in the synthesis of GOS in water–acetone system at  $a_w$  of 0.49 and the highest conversion rate was 0.01  $\mu$ mol/min mL [20]. In the case of porcine liver  $\alpha$ -L-fucosidase employed to produce fucopyranosides in the reaction system with DMSO, the extended reaction time was needed, by approximately 9%, to afford the same yield as in conventional media [19]. The hydrolytic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was quantified in the presence of different cosolvents. As it can be observed in Fig. 7b, similar patterns were obtained.

The effect of water activity and cosolvents on the  $r_{T/H}$  ratio was also evaluated in the present study (Fig. 7c). In the presence of acetone,  $\alpha$ -L-fucosidase showed higher transglycosylation than hydrolytic activity which corresponded to the  $r_{T/H}$  value greater than 1, with a maximum recorded at 30 min ( $r_{T/H}$  1.43). In case of DMSO, the highest  $r_{T/H}$  was obtained after 120 min and equaled to 1.21. Among the three cosolvents, acetonitrile presented the  $r_{T/H}$  below 1, indicating on the predominant hydrolytic activity rather than transglycosylation. Overall, the addition of cosolvents, such as acetone and DMSO, to the reaction media improved kinetic equilibrium toward enzymatically catalyzed transglycosylation, as indicated by their maximal  $r_{T/H}$  values when compared to the control (0.39). However, it was observed that by working on acetone and DMSO media, once that maximum concentration of fucosylated oligosaccharides was reached, they start to decrease. This decline could be due to the hydrolysis of the reaction product, which might be used as a precursor of long-chain oligosaccharides as reported by Cruz-Guerrero et al. [20].

Similar results were reported by Li et al. [43], who observed a decrease in the transglycosylation activity of a commercially available collection of thermophilic glycosidases (CLONEZYME) in the reaction media containing acetonitrile at  $a_w$  of 0.88. On the





contrary, Li et al. [44] showed that addition of DMSO as a cosolvent at  $a_w$  of 0.94 improved the yield of daidzein transglycosylation product by 14% (from 39 to 44.47%). The reaction was catalyzed by a recombinant maltosyl transferase from *T. maritima* expressed in *E. coli*. Additionally, Baek et al. [45] reported higher yield of transglycosylation products in a reaction catalyzed by maltogenic amylase from a *Thermus* strain when acetone was added as a cosolvent to the reaction media. The authors observed suppressed hydrolytic activity.

## Conclusions

The gathered results indicate that  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* can catalyze the synthesis of fucosylated oligosaccharides in water-organic cosolvent media. The best results were observed for acetone (0.51 mM/h). Moreover, the addition of acetone or DMSO to the medium shifted the reaction equilibrium favoring transglycosylation over the enzyme-assisted hydrolysis as the calculated  $r_{T/H}$  values of 1.43 and 1.21, respectively, were higher compared to the value recorded for the control assay (0.39). Finally, it is possible that the fucosylated oligosaccharides synthesized in this study have biological functions, like human milk oligosaccharides, and can be used either for clinical applications or as an additive in infant formulas.

**Author Contribution** **R-A. M.**—methodology, formal analysis and investigation, writing (original draft preparation). **A-S. S.**—formal analysis and investigation, writing (review and editing). **G-G. M.**—conceptualization, formal analysis and investigation, funding acquisition, resources. **G-R. F.**—methodology. **G-R. L.**—formal analysis and investigation, writing (review and editing). **R-S. G.**—funding acquisition, resources. **C-G.A.**—conceptualization, formal analysis and investigation, writing (original draft preparation), funding acquisition, resources, supervision.

**Funding** This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant number 592532) and Universidad Autónoma Metropolitana.

## Declarations

**Ethics Approval** This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

**Consent to Participate** Not applicable.

**Consent for Publication** Not applicable.

**Conflict of Interest** The authors declare no competing interests.

## References

1. Bode, L. (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*, 91(11), 619–622. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
2. Zehra, S., Khambati, I., Vierhout, M., Mian, M. F., Buck, R., & Forsythe, P. (2018). Human milk oligosaccharides attenuate antigen-antibody complex induced chemokine release from human intestinal epithelial cell lines. *Journal of Food Science*, 83(2), 499–508. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14039>
3. Bode, L., & Jantscher-Krenn, E. (2012). Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Advances in Nutrition*, 3(3), 383S–391S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001404>



4. Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C., & Coppa, G. V. (2011). Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*, *128*(6), e1520–e1531. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1206>
5. Romero-Téllez, S., Lluch, J. M., González-Lafont, À., & Masgrau, L. (2019). Comparing hydrolysis and transglycosylation reactions catalyzed by *Thermus thermophilus*  $\beta$ -glycosidase. A combined MD and QM/MM study. *Frontiers in Chemistry*, *7*, 200. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00200>
6. Zeuner, B., & Meyer, A. S. (2020). Enzymatic transufucosylation for synthesis of human milk oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, *493*, 108029. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108029>
7. Van Rantwijk, F., Woudenberg-van Oosterom, M., & Sheldon, R. A. (1999). Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *6*(6), 511–532. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(99)00042-9)
8. Wan, L., Zhu, Y., Zhang, W., & Mu, W. (2020).  $\alpha$ -L-Fucosidases and their applications for the production of fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*, 5619–5631. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10635-7>
9. Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018). Synthesis of a fucosylated trisaccharide via transglycosylation by  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *186*(3), 681–691. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2771-x>
10. Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulff, L., Gotfredsen, C. H., Mikkelsen, M. D., & Mikkelsen, J. D. (2016). Novel  $\alpha$ -L-fucosidases from a soil metagenome for production of fucosylated human milk oligosaccharides. *PLoS ONE*, *11*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147438>
11. Liu, P., Zhang, H., Wang, Y., Chen, X., Jin, L., Xu, L., & Xiao, M. (2020). Screening and characterization of an  $\alpha$ -L-fucosidase from *Bacteroides fragilis* NCTC9343 for synthesis of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(18), 7827–7840. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10759-w>
12. Zeuner, B., Muschiol, J., Holck, J., Lezyk, M., Gedde, M. R., Jers, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2018). Substrate specificity and transufucosylation activity of GH29  $\alpha$ -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, *41*, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.002>
13. Manas, N. H., Illias, R. M., & Mahadi, N. M. (2017). Strategy in manipulating transglycosylation activity of glycosyl hydrolase for oligosaccharide production. *Critical Reviews in Biotechnology*, *38*(2), 272–293. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1339664>
14. Mangas-Sánchez, J., & Adlercreutz, P. (2015). Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *122*, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.08.014>
15. Hansson, T., Andersson, M., Wehtje, E., & Adlercreutz, P. (2001). Influence of water activity on the competition between  $\beta$ -glycosidase-catalysed transglycosylation and hydrolysis in aqueous hexanol. *Enzyme and Microbial Technology*, *29*(8–9), 527–534. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00421-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00421-5)
16. Khatami, S., Ashtiani, F. Z., Bonakdarpour, B., & Mehrdad, M. (2014). The enzymatic production of lactulose via transglycosylation in conventional and non-conventional media. *International Dairy Journal*, *34*(1), 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.010>
17. Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2014). Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(40), 9615–9631. <https://doi.org/10.1021/jf502619p>
18. Farkas, E., Thiem, J., & Ajsaka, K. (2000). Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified  $\alpha$ -L-fucosidase from *Penicillium multicolor*. *Carbohydrate Research*, *328*(3), 293–299. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00113-0)
19. Svensson, S. C., & Thiem, J. (1990). Purification of  $\alpha$ -L-fucosidase by C-glycosylic affinity chromatography, and the enzymic synthesis of  $\alpha$ -L-fucosyl disaccharides. *Carbohydrate Research*, *200*, 391–402. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)84205-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84205-9)
20. Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L., Viniestra-González, G., Bárzana, E., & García-Garibay, M. (2006). Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase in an organic medium. *Biotechnology and Bioengineering*, *93*(6), 1123–1129. <https://doi.org/10.1002/bit.20824>
21. Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2017). Optimization of reaction conditions and the donor substrate in the synthesis of hexyl- $\beta$ -D-galactoside. *Process Biochemistry*, *58*, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.005>



22. Akiba, S., Yamamoto, K., & Kumagai, H. (1999). Transglycosylation activity of the Endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* IFO31125 and its application. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(5), 576–580. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(99\)80117-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80117-0)
23. Bell, G., Janssen, A. E., & Halling, P. J. (1997). Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(6), 471–477. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00204-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00204-9)
24. García-Garibay, M., López-Munguía, A., & Bárzana, E. (2000). Effect of  $\beta$ -galactosidase hydration on alcoholysis reaction in organic one-phase liquid systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(6), 647–653. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001220\)70:6%3c647::AID-BIT6%3e3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001220)70:6%3c647::AID-BIT6%3e3.0.CO;2-Z)
25. Okuyama, M., Matsunaga, K., Watanabe, K. I., Yamashita, K., Tagami, T., Kikuchi, A., Ma, M., Klahan, P., Mori, H., & Kimura, A. (2017). Efficient synthesis of  $\alpha$ -galactosyl oligosaccharides using a mutant *Bacteroides thetaiotaomicron* retaining  $\alpha$ -galactosidase (BtGH97b). *The FEBS Journal*, 284(5), 766–783. <https://doi.org/10.1111/febs.14018>
26. Wu, Y., Yuan, S., Chen, S., Wu, D., Chen, J., & Wu, J. (2013). Enhancing the production of galacto-oligosaccharides by mutagenesis of *Sulfolobus solfataricus*  $\beta$ -galactosidase. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1588–1595. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.052>
27. Ji, E. S., Park, N. H., & Oh, D. K. (2005). Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 759–764. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-5487-8>
28. Hansson, T., Kaper, T., van der Oost, J., De Vos, W., & Adlercreutz, P. (2001). Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of  $\beta$ -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(3), 203–210. <https://doi.org/10.1002/bit.1052>
29. Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B., & Bourne, Y. (2004). Crystal structure of *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -L-fucosidase: Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13119–13128. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313783200>
30. Tarling, C. A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Bourne, Y., Henrissat, B., & Withers, S. G. (2003). Identification of the catalytic nucleophile of the family 29  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47394–47399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306610200>
31. Zeuner, B., Nyffenegger, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2016). Thermostable  $\beta$ -galactosidases for the synthesis of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 33(3), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.003>
32. Warmerdam, A., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2013).  $\beta$ -Galactosidase stability at high substrate concentrations. *Springerplus*, 2(1), 402. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-402>
33. Fourage, L., Dion, M., & Colas, B. (2000). Kinetic study of a thermostable  $\beta$ -glycosidase of *Thermus thermophilus*. Effects of temperature and glucose on hydrolysis and transglycosylation reactions. *Glycoconjugate Journal*, 17(6), 377–383. <https://doi.org/10.1023/A:1007104030314>
34. Bridiau, N., Issaoui, N., & Maugard, T. (2010). The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1278–1289. <https://doi.org/10.1002/btpr.445>
35. Manas, N. H., Pachelles, S., Mahadi, N. M., & Ilias, R. M. (2014). The characterisation of an alkali-stable maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1 and improved malto-oligosaccharide production by hydrolysis suppression. *PLoS ONE*, 9(9), e106481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106481>
36. Pyeon, H. M., Lee, Y. S., & Choi, Y. L. (2019). Cloning, purification, and characterization of GH3  $\beta$ -glucosidase, MtBgl85, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *PeerJ*, 7, e7106. <https://doi.org/10.7717/peerj7106>
37. Lee, H. J., Lee, Y. S., & Choi, Y. L. (2018). Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221. *Biotechnology for Biofuels*, 11(303), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1299-1>
38. Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>
39. Mallek-Fakhfakh, H., & Belghith, H. (2016). Physicochemical properties of thermotolerant extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Talaromyces thermophilus* and enzymatic synthesis of cello-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 419, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.10.014>
40. Jiang, Z., Zhu, Y., Li, L., Yu, X., Kusakabe, I., Kitaoka, M., & Hayashi, K. (2004). Transglycosylation reaction of xylanase B from the hyperthermophilic *Thermotoga maritima* with the ability of synthesis of tertiary alkyl  $\beta$ -D-xylobiosides and xylosides. *Journal of Biotechnology*, 114(1–2), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.05.007>



41. Bankova, E., Bakalova, N., Petrova, S., & Kolev, D. (2006). Enzymatic synthesis of oligosaccharides and alkylglycosides in water-organic media via transglycosylation of lactose. *Biotechnology and Bio-technological Equipment*, 20(3), 114–119. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817387>
42. Trincone, A., Giordano, A., Perugino, G., Rossi, M., & Moracci, M. (2005). Highly productive auto-condensation and transglycosylation reactions with *Sulfolobus solfataricus* glycosynthase. *ChemBio-Chem*, 6(8), 1431–1437. <https://doi.org/10.1002/cbic.200400430>
43. Li, J., Cheng, H. N., Nickol, R. G., & Wang, P. G. (1999). Enzymatic modification of hydroxyethyl-cellulose by transgalactosylation with  $\beta$ -galactosidases. *Carbohydrate Research*, 316(1–4), 133–137. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00041-5)
44. Li, D., Park, J. H., Park, J. T., Park, C. S., & Park, K. H. (2004). Biotechnological production of highly soluble daidzein glycosides using *Thermotoga maritima* maltosyltransferase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2561–2567. <https://doi.org/10.1021/jf035109f>
45. Baek, J. S., Kim, M. J., Cha, H., Lee, H. S., Li, D., Kim, J. W., Kim, Y. R., Moon, T. W., & Park, K. (2003). Enhanced transglycosylation activity of *Thermus* maltogenic amylase in acetone solution. *Food Science and Biotechnology*, 12(6), 639–643.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.