

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
División de ciencias Biológicas y de la Salud



**SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS FUCOSILADOS CON  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA EMPLEANDO FUCOSIDASA DE  
*Thermotoga maritima***

---

**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Doctor en Biotecnología

**PRESENTA**

M. en B. Francisco Javier Guzmán Rodríguez

**Directora**

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

**Asesores**

Dr. Carlos Eslava Campos

Dr. Mariano García Garibay

---

o CDMX, 06 de Septiembre de 2018 o

---

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, con la referencia 001466.**

Ciudad de México, a 06 de septiembre de 2018

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

**Síntesis de oligosacáridos fucosilados con actividad biológica empleando la fucosidasa  
de *Thermotoga maritima***

Que presentó

**M. en B. Francisco Javier Guzmán Rodríguez**

COMITÉ TUTORIAL

Directora: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesor: Dr. Mariano García Garibay

Asesor: Dr. Carlos Eslava Campos

JURADO

Presidente: Dra. Gabriela Rodríguez Serrano \_\_\_\_\_.

Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa \_\_\_\_\_.

Vocal: Dr. Carlos Eslava Campos \_\_\_\_\_.

Vocal: Dr. Sergio Alatorre Santamaría \_\_\_\_\_.

## RESUMEN

Los oligosacáridos fucosilados, como la 2'-fucosil-lactosa en la leche humana, tienen importantes funciones biológicas como prebióticos, previniendo infecciones y como inmunomoduladores. En este trabajo, oligosacáridos fucosilados (FUCOS) fueron sintetizados por medio de una reacción enzimática de transfucosilación catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *Thermotoga maritima*, empleando 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido (pNP-Fuc) como sustrato donador y lactosa como sustrato aceptor. Los tópicos abordados en este trabajo fueron el estudio de algunos factores que influyen en los rendimientos de la síntesis, la purificación e identidad de los compuestos sintetizados y finalmente la actividad biológica de los compuestos sintetizados mediante la estimulación de células del sistema inmune para la producción de citocinas. Con respecto al efecto de la concentración de los sustratos, se encontró que conforme la concentración del sustrato aceptor incrementaba, la concentración y velocidad de síntesis de los FUCOS también incrementaron, y la concentración más alta obtenida fue 0.883 mM (rendimiento 25.2 %) cuando se usó la concentración de lactosa mayor (584 mM). En contraste, la concentración del sustrato donador no tuvo efecto sobre la síntesis. Adicionalmente, la proporción molar donador/aceptor (D/A) más baja tuvo la mayor síntesis, de manera que, a una proporción molar de 0.001, se obtuvo una concentración de FUCOS de 0.286 mM (rendimiento 32.5 %). Por otra parte, la influencia de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaCl}$  en la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* también fue evaluada, y mostró un máximo incremento del 67 % en presencia de  $\text{NaCl}$  0.8 M con una actividad de agua ( $a_w$ ) de 0.9672, y de 138 % en presencia de  $\text{CaCl}_2$  1.1 M ( $a_w$  0.9581). Además, la actividad hidrolítica fue mayor cuando se empleó  $\text{CaCl}_2$  comparada con  $\text{NaCl}$  a una  $a_w$  de 0.8956, 0.9581 y 0.9672. Asimismo, el efecto de  $\text{CaCl}_2$  en

la síntesis de FUCOS empleando pNP-Fuc como sustrato donador y lactosa como aceptor, fue estudiado, y aumentaron los rendimientos de síntesis duplicando y triplicándolos a concentraciones de lactosa 146 y 58 mM respectivamente. Lo anterior significa que la concentración del sustrato aceptor, una baja proporción D/A, el efecto activador del  $\text{CaCl}_2$  y la disminución de la  $a_w$  tuvieron un efecto sinérgico favoreciendo la síntesis de FUCOS. Adicionalmente, el método de purificación de FUCOS que presentó los mejores resultados fue por medio de exclusión molecular, con una recuperación del 51.5 % y pureza de 97 %. Por medio de la espectrometría de masas-desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), se demostró que el principal oligosacárido sintetizado corresponde a un trisacárido fucosilado, y un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del compuesto hidrolizado lo confirmó como fucosil-lactosa. Además, el efecto de los FUCOS purificados sobre la estimulación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fue evaluado midiendo la producción de interleucina-10 (IL-10, una citocina antiinflamatoria) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , una citocina proinflamatoria). Se encontró que la estimulación de PBMC con FUCOS previo a una estimulación con lipopolisacárido (un estímulo positivo), incrementa la producción de IL-10 en un 50 %. Por otro lado, el efecto de los FUCOS sobre la producción de TNF- $\alpha$  podría depender de características particulares de cada individuo.

En conclusión, los FUCOS sintetizados por medio de transfucosilación empleando pNP-Fuc como sustrato donador, lactosa como sustrato aceptor y  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. maritima* mostraron una estructura similar a los FUCOS presentes en la leche humana y una actividad inmunomoduladora similar.

## ABSTRACT

Fucosylated oligosaccharides, such as 2'-fucosyllactose in human milk, have important biological functions such as prebiotics, preventing infection and immunomodulators. In this work, fucosylated oligosaccharides (FUCOS) were synthesized by means of an enzymatic reaction of transfucosylation catalyzed by a recombinant  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*, employing 4-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (pNP-Fuc) as a donor substrate and lactose as an acceptor substrate. The topics addressed in this work were the study of some factors that influence the yields of synthesis, the purification and identity of synthesized compounds and finally the biological activity of synthesized compounds towards stimulation of immune cells to produce cytokines. Regarding the effect of concentrations of substrates, it was found that as the concentration of the acceptor substrate increased, the concentration and synthesis rate of the FUCOS also increased, and the highest concentration obtained was 0.883 mM (25.2 % yield) when using the higher lactose concentration (584 mM). In contrast, concentration of donor substrate had no effect on synthesis. Furthermore, the lower donor/acceptor (D/A) ratio had the highest synthesis, so at the molar ratio of 0.001, a concentration of 0.286 mM of FUCOS was obtained (32.5 % yield). On the other hand, the influence of CaCl<sub>2</sub> and NaCl in the hydrolytic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was also evaluated, and hydrolytic activity displayed a maximum increase of 67 % in presence of NaCl 0.8 M with water activity ( $a_w$ ) of 0.9672 and of 138 % in presence of CaCl<sub>2</sub> 1.1 M ( $a_w$  0.9581). In addition, the hydrolytic activity was higher when using CaCl<sub>2</sub> compared to NaCl at  $a_w$  of 0.8956, 0.9581 and 0.9672. Moreover, the effect of CaCl<sub>2</sub> in the synthesis of FUCOS by using 4-nitrophenyl-fucose as donor substrate and lactose as acceptor was studied, and improved the yield of synthesis duplicating and triplicating at lactose

concentrations of 58 and 146 mM, respectively. The above means that acceptor substrate concentration, a low D/A ratio, the activating effect of CaCl<sub>2</sub> and the decrement in a<sub>w</sub> had a synergistic effect favored the synthesis of FUCOS. Furthermore, the purification method of FUCOS that presented the best results was by means of molecular exclusion, with a recovery of 51.5 % and a purity of 97 %. Conducting a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), it was demonstrated that main synthesized oligosaccharide corresponded to a fucosylated trisaccharide, and high performance liquid chromatography (HPLC) of the hydrolyzed compound confirmed it was fucosyllactose. In addition, the effect of purified FUCOS on the stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was evaluated by measuring the production of interleukin-10 (IL-10, an anti-inflammatory cytokine) and tumoral necrosis factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine). It was found that the stimulation of PBMC with FUCOS before a stimulation with lipopolysaccharide (a positive stimulus), triggers the production of IL-10 by 50 %. On the other hand, the effect of FUCOS on TNF- $\alpha$  production could depend on particular characteristics of each individual. In conclusion, FUCOS synthesized by means of transfucosylation employing pNP-Fuc as a donor substrate, lactose as an acceptor substrate and recombinant  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* displayed a structure similar to FUCOS present in human milk and possess a similar immunomodulating activity.

## Índice

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	3
2.1	Oligosacáridos de leche humana (OLH).....	3
2.2	Oligosacáridos fucosilados (FUCOS).....	9
2.3	Actividad biológica de FUCOS y otros OLH.....	10
2.3.1	Efecto prebiótico .....	10
2.3.2	Efecto anti infeccioso de los OLH .....	11
2.3.3	Efecto inmunomodulador.....	16
2.4	Biosíntesis de FUCOS .....	21
2.5	Síntesis química de oligosacáridos .....	26
2.6	Síntesis química-enzimática de oligosacáridos.....	28
2.7	Síntesis enzimática de oligosacáridos.....	30
2.7.1	Síntesis de FUCOS con fucosiltransferasas (FT).....	31
2.7.2	Síntesis de FUCOS con fucosidasas.....	34
2.7.3	Glicosidasas modificadas .....	43
2.8	$\alpha$ -L-Fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	44
2.9	Purificación de oligosacáridos .....	47
3	Hipótesis .....	49
4	Objetivos.....	49



4.1 Objetivo general.....	49
4.2 Objetivos específicos .....	49
5 Plan de Trabajo.....	50
6 Metodología.....	51
6.1. Análisis electroforético de la fucosidasa.....	51
6.2 Ensayo de actividad fucosidasa .....	51
6.3 Estabilidad del sustrato donador a las condiciones de reacción (tiempo y temperatura) .....	51
6.4 Síntesis de los oligosacáridos por transfucosilación.....	52
6.4.1 Cuantificación de los carbohidratos mediante HPLC .....	52
6.4.2 Cuantificación de pNP mediante espectrofotometría.....	53
6.4.3 Identificación de los FUCOS sintetizados .....	53
6.4.4 Efecto de la concentración de sustrato aceptor (Lactosa) en la síntesis de FUCOS .....	54
6.4.5 Efecto de la concentración de sustrato donador (pNP-Fuc) en la síntesis de FUCOS .....	54
6.4.6 Efecto de la proporción molar donador/aceptor (D/A) en la síntesis de FUCOS	55
6.4.7 Efecto de la presencia de sales sobre las reacciones de síntesis de FUCOS.....	55
6.5 Métodos de purificación de los FUCOS .....	56
6.5.1 Purificación por fermentación con levadura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	56

6.5.2 Purificación por precipitación con etanol.....	57
6.5.3 Purificación con carbón activado .....	57
6.5.4 Purificación por cromatografía de exclusión molecular .....	58
6.6 Actividad biológica inmunomoduladora del oligosacárido sintetizado.....	59
6.7 Análisis estadístico .....	62
7 Resultados.....	63
7.1 Análisis electroforético de la fucosidasa.....	63
7.2 Estabilidad del sustrato donador a las condiciones de reacción (tiempo y temperatura) .....	63
7.3 Síntesis de oligosacáridos .....	64
7.4 Identificación de los oligosacáridos sintetizados.....	65
7.5 Efecto de la concentración de sustrato aceptor (Lactosa) en la síntesis de FUCOS...	69
7.6 Efecto de la concentración de sustrato donador (pNP-Fuc) en la síntesis de FUCOS	73
7.7 Efecto de la proporción molar donador/aceptor (D/A) en la síntesis de FUCOS.....	75
7.8 Efecto de la presencia de sales sobre las reacciones de síntesis de FUCOS .....	76
7.8.1 Determinación de $a_w$ de las soluciones de $\text{CaCl}_2$ y $\text{NaCl}$ .....	77
7.8.2 Efecto de la concentración de $\text{CaCl}_2$ y $\text{NaCl}$ en la actividad fucosidasa (hidrolítica) .....	78
7.8.3 Efecto del $\text{CaCl}_2$ en la actividad hidrolítica y de transfucosilación durante las reacciones de síntesis de FUCOS.....	81

7.9 Purificación del oligosacárido .....	86
7.9.1 Purificación por fermentación con levadura ( <i>S. cerevisiae</i> ) .....	86
7.9.2 Purificación por precipitación con etanol.....	89
7.9.3 Purificación con carbón activado .....	91
7.9.4 Purificación por cromatografía de exclusión molecular .....	93
7.10 Actividad biológica inmunomoduladora del oligosacárido sintetizado.....	95
8 Conclusiones.....	98
9 Referencias .....	100
ANEXO: Artículos Publicados.....	116

## 1 INTRODUCCIÓN

Los oligosacáridos de la leche humana (OLH) se encuentran en concentraciones de 10 a 20 mg/mL y son el tercer componente sólido de mayor concentración en la leche después de lactosa y lípidos. Dentro de este grupo de compuestos destacan los oligosacáridos fucosilados (FUCOS), los cuales se han estudiado profusamente debido a su abundancia y a sus diversos efectos en la salud de los lactantes, entre ellos un efecto prebiótico, antiinfeccioso e inmunomodulador.

En el primer caso algunos FUCOS estimulan específicamente el crecimiento de bifidobacterias, las cuales compiten con los patógenos intestinales por sustratos, además de disminuir el pH intestinal, con lo cual el crecimiento de patógenos se ve inhibido. En cuanto a la actividad antiinfecciosa, algunos FUCOS poseen similitudes con los receptores de membrana presentes en las células del intestino, las cuales son sitios de adhesión para patógenos, de manera que los oligosacáridos actúan como señuelos, adhiriéndose a la superficie de la célula patógena y evitando su adhesión en el intestino. Un ejemplo es la 2'-fucosil-lactosa, asociada a la inhibición de *Campylobacter jejuni* en el intestino de lactantes. En el caso de la actividad inmunomoduladora, algunos FUCOS son capaces de interactuar con los receptores de membrana de distintas células del sistema inmune para estimular la producción de citocinas antiinflamatorias disminuyendo la producción de proinflamatorias. Debido a los beneficios que ejercen sobre la salud de los lactantes, se han estudiado diversas alternativas para la síntesis de estos compuestos. La biosíntesis de los FUCOS se lleva a cabo en el aparato de Golgi de las células de la glándula mamaria por vía enzimática mediante diferentes fucosiltransferasas, cuya expresión está asociada a los mismos genes que determinan los grupos sanguíneos (gen de Lewis y gen secretor), de modo que el perfil de oligosacáridos en la leche depende de dichas características genéticas.

Para sintetizar estos compuestos a nivel laboratorio, se ha recurrido a la síntesis química y a la síntesis enzimática. En el primer caso, el método es largo y complicado debido a los numerosos pasos de protección y desprotección de grupos hidroxilo para sintetizar el oligosacárido, además de ello, en muchas de estas rutas se emplean reactivos no aptos para consumo humano, difícilmente sustituibles por compuestos inocuos. En el caso de la síntesis enzimática, esta se realiza por transfucosilación mediante glicosiltransferasas y glicosilhidrolasas, en dicha reacción se requieren dos sustratos, un donador y un aceptor de fucosa.

La síntesis de 2'- y 3-fucosil-lactosa se puede conseguir utilizando  $\alpha$ -L-fucosidasas, que son glicosilhidrolasas que catalizan la hidrólisis del residuo fucosilo de los oligosacáridos fucosilados. Bajo condiciones adecuadas pueden catalizar la transferencia de grupos fucosilo (transfucosilación). Estas enzimas se pueden encontrar en organismos eucarióticos como *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Aspergillus niger*, etc., y en procarióticos como *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* y *Thermotoga maritima*, entre otros.

*Thermotoga maritima* es una bacteria extremófila que sintetiza una  $\alpha$ -L-fucosidasa con potencial de ser empleada en la síntesis de oligosacáridos fucosilados por transfucosilación. Este trabajo está dirigido a probar la actividad biológica de oligosacáridos fucosilados sintetizados por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA (OLH)

Un oligosacárido es un carbohidrato que comprende de 3 a 11 residuos de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos (Dominguez-Vergara *et al.*, 2009).

La leche humana a diferencia de la de otros mamíferos, posee una compleja matriz de oligosacáridos estructuralmente diversos y en cantidades significativas, de los cuales se han aislado e identificado más de 200, algunos con pesos moleculares de más de 6000 Da, y debido a la posible existencia de isómeros, la variedad de estructuras puede llegar a ser mayor a 1000 (Boehm *et al.*, 2005; Morrow *et al.*, 2004; Ninonuevo *et al.*, 2006).

Los OLH, tienen la característica de no ser metabolizables por el ser humano ni por la mayoría de las bacterias intestinales; sin embargo, son considerados como uno de los factores de crecimiento más importantes de las bifidobacterias intestinales (Chaturvedi *et al.*, 2001; Dominguez-Vergara *et al.*, 2009; Miwa *et al.*, 2010). Además, los OLH constituyen el tercer componente sólido de mayor concentración en la leche (10 a 20 g/mL), después de la lactosa y los lípidos, pudiendo encontrarse como oligosacáridos libres o formando parte de algunos glicoconjugados, como glicolípidos o glicoproteínas (Dominguez-Vergara *et al.*, 2009; Miwa *et al.*, 2010).

La composición estructural de los OLH puede verse en la figura 1. Los monómeros que constituyen a los OLH son: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc), y ácido siálico o ácido *N*-acetilneuramínico (Sia). Sus estructuras pueden verse en la figura 2 (Bode, 2009; Kunz y Rudloff, 2006; Ninonuevo *et al.*, 2006).

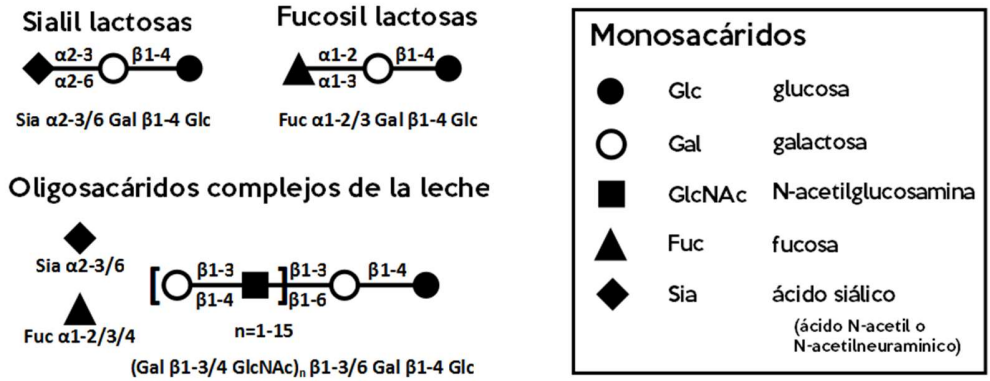


Figura 1. Composición estructural de los OLH (Bode, 2009).

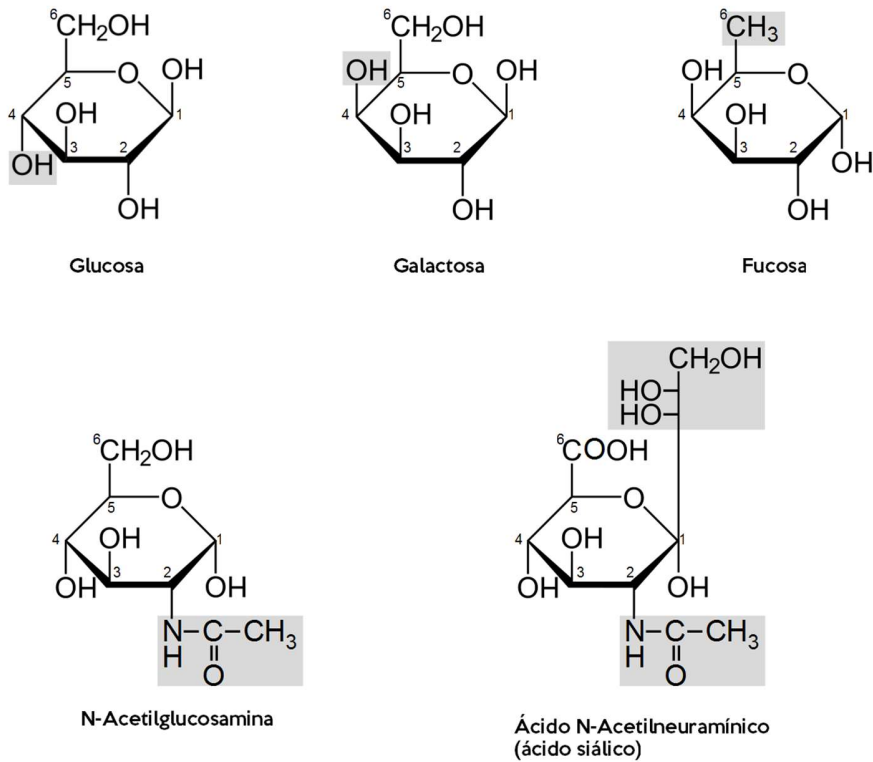


Figura 2. Unidades estructurales para la biosíntesis de los OLH.

Dentro de los OLH más abundantes se encuentran la 2'-fucosil-lactosa (2'FL), lactodifucotetraosa (LDFT), lacto-*N*-difucohexaosa I y Lacto-*N*-fucopentaosa (LNFP). En la tabla 1 se puede apreciar una lista detallada de los OLH más abundantes, sus estructuras y concentraciones en la leche humana (Chaturvedi *et al.*, 2001).

Con base en su composición (tabla 2), los OLH pueden clasificarse en: (1) oligosacáridos neutros, conteniendo un núcleo de galactosa, GlcNAc, fucosa, y lactosa; (2) oligosacáridos aniónicos o ácidos conteniendo la misma composición de oligosacáridos con ácido siálico y (3) oligosacáridos sialil-fucosilados, que son oligosacáridos ácidos conteniendo un residuo de fucosa (Escamilla-Lozano, 2011; Ninonuevo *et al.*, 2006).

En otro criterio de clasificación (tabla 3) se piensa que los oligosacáridos están compuestos por los siguientes tres grupos: (1) oligosacáridos núcleo, constituidos por glucosa, galactosa y GlcNAc; (2) Oligosacáridos fucosilados, derivados de una adición de fucosa a un oligosacárido núcleo; y (3) oligosacáridos sialilados, derivados de la adición de ácido siálico a alguno de los oligosacáridos antes mencionados (Gabrielli *et al.*, 2011).



Tabla 1. Oligosacáridos de la leche humana más abundantes

Nombre trivial	Estructura	Concentración (g /L)
Con presencia de enlaces fucosilo $\alpha$ -1,2:		
2'-Fucosil-lactosa	Fuc $\alpha$ (1→2) Gal $\beta$ (1→4) Glc	2.43± 0.26
Lactodifucotetraosa	Fuc $\alpha$ (1→2) Gal $\beta$ (1→4) $\searrow$ Fuc $\alpha$ (1→3) $\nearrow$ Glc	0.43± 0.04
Lacto- <i>N</i> -difucohexaosa-I	Fuc $\alpha$ (1→2) Gal $\beta$ (1→3) $\searrow$ Fuc $\alpha$ (1→4) $\nearrow$ GlcNAc $\beta$ (1→3) Gal $\beta$ (1→4) Glc	0.5± 0.06
Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa-I	Fuc $\alpha$ (1→2) Gal $\beta$ (1→3) GlcNAc $\beta$ (1→3) Gal $\beta$ (1→4) Glc	1.14± 0.18
Con ausencia de enlaces fucosilo $\alpha$ -1,2:		
3-Fucosil-lactosa	Gal $\beta$ (1→4) $\searrow$ Fuc $\alpha$ (1→3) $\nearrow$ Glc	0.86± 0.10
Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa-II	Gal $\beta$ (1→3) $\searrow$ Fuc $\alpha$ (1→4) $\nearrow$ GlcNAc $\beta$ (1→3) Gal $\beta$ (1→4) Glc	0.77± 0.07
Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa-III	Gal $\beta$ (1→3) $\searrow$ Fuc $\alpha$ (1→4) $\nearrow$ GlcNAc $\beta$ (1→3) Gal $\beta$ (1→4) $\searrow$ Fuc $\alpha$ (1→3) $\nearrow$ Glc	0.77± 0.07
Lacto- <i>N</i> -difucohexaosa-II	Gal $\beta$ (1→3) GlcNAc $\beta$ (1→3) Gal $\beta$ (1→4) Glc	0.09± 0.01
Otros medidos:		
Lacto- <i>N</i> -tetraosa	Gal $\beta$ (1→3) GlcNAc $\beta$ (1→3) Gal $\beta$ (1→4) Glc	0.55± 0.08
Lacto- <i>N</i> -neotetraosa	Gal $\beta$ (1→4) GlcNAc $\beta$ (1→3) Gal $\beta$ (1→4) Glc	0.17± 0.03

Monofucosil lacto- <i>N</i> -hexaosa-III	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1 \rightarrow 3) \searrow \\  \text{Gal } \beta(1 \rightarrow 4) \nearrow \text{GlcNAc } \beta(1 \rightarrow 6) \searrow \\  \text{Gal } \beta(1 \rightarrow 3) \text{GlcNAc } \beta(1 \rightarrow 3) \nearrow \text{Gal } \beta(1 \rightarrow 4) \text{Glc}  \end{array}  $	0.11 ± 0.02
Difucosil lacto- <i>N</i> -hexaosa-a	$  \begin{array}{c}  \text{Fuc } \alpha(1 \rightarrow 3) \searrow \\  \text{Gal } \beta(1 \rightarrow 4) \nearrow \text{GlcNAc } \beta(1 \rightarrow 6) \searrow \\  \text{Gal } \beta(1 \rightarrow 4) \text{Glc}  \end{array}  $	0.15 ± 0.04
Promedio de oligosacáridos totales		7.20 ± 0.62

(Chaturvedi *et al.*, 2001)

*Tabla 2. Clasificación de oligosacáridos de leche humana (I)*

Oligosacáridos neutros	Oligosacáridos ácidos	Oligosacáridos sialilfucosilados
2'-Fucosil-lactosa	Sialil-( $\alpha$ 2,3)-lactosa	3'-Sialil-3-fucosil-lactosa
3-Fucosil-lactosa	Sialil-( $\alpha$ 2,6)-lactosa	Sialil-fucosil-lacto- <i>N</i> -tetraosa
Lactodifucotetraosa	Sialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa-a	Monofucosil-monosialil-lacto- <i>N</i> -
3'-Sialil-lactosa	Sialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa-b	hexosa

(Kunz, 2000; Gudiel-Urbano & Goñi, 2001; Escamilla-Lozano, 2011)

*Tabla 3: Clasificación de oligosacáridos de leche humana (II)*

Oligosacáridos núcleo	Oligosacáridos fucosilados	Oligosacáridos sialilados
Lacto- <i>N</i> -neotetraosa	Difucosil-lacto- <i>N</i> -hexaosa II	Fucosialil-lacto- <i>N</i> -neohexaosa
Lacto- <i>N</i> -neohexaosa	Trifucosil-lacto- <i>N</i> -hexaosa	6'-sialil-lactosa
Lacto- <i>N</i> -tetraosa	Difucosil-p-lacto- <i>N</i> -neohexaosa	3'-sialil-lactosa
Lacto- <i>N</i> -hexaosa	Difucosil-p-lacto- <i>N</i> -hexaosa	Sialil-lacto- <i>N</i> -neotetraosa-a
Lacto- <i>N</i> -octaosa	Difucosil-lacto- <i>N</i> -hexaosa	Sialil lacto- <i>N</i> -neotetraosa-b
Lacto- <i>N</i> -decaosa	3-fucosil-lactosa	Sialil-lacto- <i>N</i> -neotetraosa-c
Lacto- <i>N</i> -dodecaosa	Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa-III	Disialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa
	Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa-II	
	Lactodifucotetraosa	
	2'-Fucosil-lactosa	
	Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa-I	
	Monofucosil lacto- <i>N</i> -hexaosa-II	

(Gabielli *et al.*, 2011; Kunz *et al.*, 2000)

También se han encontrado oligosacáridos sulfatados en la leche humana. Las estructuras de tres de ellos (dos octasacáridos sulfatados y un nonasacárido sulfatado) han sido reportadas usando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como espectrometría de masas de electro-spray (ESMS). Estos tres oligosacáridos tienen el mismo núcleo, lacto-*N*-hexaosa, con unidades de fucosa en diferentes posiciones (Guerardel *et al.*, 1999).

## 2.2 OLIGOSACÁRIDOS FUCOSILADOS (FUCOS)

Como puede apreciarse en la tabla 1, los oligosacáridos más abundantes en la leche humana son los oligosacáridos fucosilados (FUCOS). Su característica principal es la de poseer un residuo de L-fucosa en su extremo no reductor. La L-fucosa, es una aldohexosa con ausencia de un grupo hidroxilo en el carbono 6 (desoxialdohexosa), fue identificada por primera vez en oligosacáridos estructurales de algas, de ahí que el origen de su nombre provenga del vocablo griego *phykos* que significa “alga”. La L-fucosa es de los pocos azúcares que se encuentran en la naturaleza en forma de isómero-L y su presencia se ha confirmado no sólo en los OLH sino también diversos compuestos como mucinas intestinales, antígenos de los grupos sanguíneos, en polisacáridos estructurales como fucoidán y xiloglucano, entre otros (Culleton *et al.*, 2013; Myron *et al.*, 2014; Orntoft *et al.*, 1991).

Los FUCOS están involucrados en numerosos y cruciales procesos fisiológicos como lo son la respuesta inmune, transducción de señales, embriogénesis temprana y desarrollo, regulación del crecimiento, apoptosis, adhesión de patógenos, extravasación de leucocitos, maduración e interacción de gametos, procesos patológicos como arteriosclerosis y cáncer, etc. (Benešová *et al.*, 2013; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012; Venditti *et al.*, 2010).

De acuerdo con diversos autores, dentro de los FUCOS de la leche humana, el más importante, debido a sus papeles biológicos y a su abundancia, es la 2'FL, un trisacárido constituido por una unidad de fucosa unida en posición  $\alpha$ -1,2 al extremo no reductor de una molécula de lactosa. Como se observa en la tabla 1, este FUCO se encuentra en una concentración de 2.4 g/L y representa aproximadamente el 30 % de todos los OLH. (Chaturvedi *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2012; Newburg, 2009).

Quizá una de las características más atractivas de 2'FL es su simplicidad, que facilita su síntesis por vía química, enzimática, y procesos biotecnológicos. Junto con lacto-N-tetraosa (LNT), fueron los primeros oligosacáridos de la leche cuya bioactividad fue determinada y los primeros en ser sintetizados de forma fiable en sistemas vivos mediante la inserción de genes de glicosiltransferasas. Otros FUCOS de la leche humana importantes por su actividad biológica son LNFP I y LNFP III (Castanys-Munoz *et al.*, 2013; Prieto *et al.*, 1995; Ruiz-Palacios *et al.*, 2003).

## **2.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FUCOS Y OTROS OLH**

### **2.3.1 EFECTO PREBIÓTICO**

De acuerdo con Gibson *et al.* (2004) los prebióticos han sido definidos como “ingredientes alimenticios no digeribles que ejercen un efecto benéfico al hospedero por estimulación selectiva de un limitado número de bacterias en el colon, lo que contribuye a mejorar la salud del hospedero”. Estos permiten cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal (Dominguez-Vergara *et al.*, 2009).

No se han encontrado enzimas en el intestino humano capaces de liberar fucosa, ácido siálico y GlcNA a partir de OLH, por lo que estos carbohidratos llegan intactos al colon, donde sirven de alimento sólo a aquellas bacterias capaces de expresar enzimas como la  $\alpha$ - y  $\beta$ -

galactosidasa, la xilanasa y otras glicosidasas (Dominguez-Vergara *et al.*, 2009; Gnoth *et al.*, 2000).

En 1954 Gyorgy *et al.* reportaron el efecto prebiótico de los OLH mostrando que una mezcla de aproximadamente diez de ellos fue capaz de promover el crecimiento de bacterias benéficas en lactantes, como *Bifidobacterium bifidum*. Este factor bifidogénico fue inicialmente llamado ginolactosa, y está relacionado con la presencia de GlcNAc y LNT (Bode, 2009; Gyorgy *et al.*, 1954; Kunz *et al.*, 2000; Prieto, 2012).

Locascio *et al.* (2007), reportaron que *B. longum* biovar. *infantis*, prefiere ciertos OLH de cadena corta (siete o menos unidades de monosacárido) entre ellos LNT, lacto-*N*-neohexaosa, lacto-*N*-hexaosa y difucosil-lacto-*N*-hexaosa.

Los galactooligosacáridos, son abundantes en la leche humana y son fermentados selectivamente por la microbiota benéfica del intestino, particularmente lactobacilos y bifidobacterias. En contraste, el crecimiento de otras especies se ve disminuido, por ejemplo, el género *Bacteroides* y la familia Enterobacteriaceae, de los cuales algunas especies son patógenas (Boehm *et al.*, 2005).

Con respecto a los FUCOS, *B. longum* biovar. *infantis* miembro de la microbiota del intestino de los lactantes, muestra preferencia por glicanos solubles de la leche, incluyendo 2'FL y 3FL como fuente de carbono. *B. bifidum* hidroliza preferentemente 2'FL y LNT, liberando monosacáridos que pueden ser sustratos metabolizables por otras especies de bacterias, en relaciones simbióticas (Castanys-Munoz *et al.*, 2013).

### **2.3.2 EFECTO ANTI INFECCIOSO DE LOS OLH**

Una de las causas de la diarrea infantil (además de la exposición a ambientes que producen una alta exposición a patógenos) puede ser la falta de amamantamiento: los infantes que no

son amamantados tienen una mayor incidencia de enfermedades comparados con aquellos que sí los son, y es aquí donde los OLH desempeñan un papel importante como parte del sistema de defensa innato de los infantes. Dado que los OLH son sintetizados por enzimas similares a aquellas que sintetizan glicoconjugados de la superficie celular, comparten epítomos comunes con los receptores huésped de las bacterias patógenas (adhesinas, lectinas y hemaglutinina), estas similitudes les permiten actuar como señuelo, de manera que inhiben la adhesión de patógenos, protegiendo de este modo al recién nacido contra diversos patógenos entéricos (Coppa *et al.*, 2004; Chaturvedi *et al.*, 2001; Morrow *et al.*, 2004).

Como se aprecia en la tabla 4 existen patógenos para los cuales un ligando específico ha sido descrito en la leche humana. Por ejemplo, los OLH son capaces de inhibir la adhesión de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* al epitelio de boca y faringe humanas, y virus de Norwalk a sus células hospederas (Andersson *et al.*, 1986; El-Hawiet *et al.*, 2011; Marionneau *et al.*, 2005).

En el caso de los oligosacáridos sialilados, podrían ser una fuente importante de ácido siálico, esencial para el desarrollo del cerebro (Burchell *et al.*, 1987; Chaturvedi *et al.*, 2001; Gabrielli *et al.*, 2011; McVeagh y Miller, 1997).

Los FUCOS, por su parte, se han reportado por exhibir protección contra la infección de bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar. *fyris*, *E. coli* enterotoxigénica, *Pseudomonas aeruginosa*. Además de inhibir la adhesión de estos patógenos, también se ha reportado que los FUCOS protegen los infantes de la toxina termoestable de *E. coli* debido a que interactúan con el receptor guanilil ciclasa, inhibiendo con ello la adhesión de la toxina (Crane *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2012; Weichert *et al.*, 2013). De manera particular, la 2'FL está asociada a la protección contra *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter pylori*, ya que previenen su adhesión a las células epiteliales del intestino

(Baumgärtner *et al.*, 2013; Weichert *et al.*, 2013). En consecuencia, bajos niveles de 2'FL en la dieta, están asociados a una alta incidencia de diarrea en lactantes. Por lo anterior la 2'FL es un oligosacárido prometedor para propósitos nutracéuticos y farmacéuticos especialmente como un aditivo nutricional en fórmulas lácteas infantiles (Crane *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2012; Morrow *et al.*, 2004; Weichert *et al.*, 2013).



Tabla 4. Oligosacáridos de la leche humana, como receptores para microorganismos patógenos o sus metabolitos.

Oligosacáridos receptores	Microorganismos
Glicoproteínas conteniendo manosa Man( $\alpha$ 1,3)[Man( $\alpha$ 1,6)]Man-R	<i>Escherichia coli</i> (fimbrias tipo 1)
Oligosacáridos fucosilados	<i>Escherichia coli</i> (enterotoxina termoestable) <i>Vibrio cholerae</i>
2'-Fucosil-lactosa	<i>Campylobacter jejuni</i>
2-Fucosil-glicanos	Virus de Norwalk
Lacto-N-difucohexaosa I	Norovirus
Tetra- y pentasacáridos fucosilados	<i>Escherichia coli</i>
Sialil-( $\alpha$ 2,3)-lactosa y glicoproteínas	<i>Escherichia coli</i> (fimbrias S)
Sialil-( $\alpha$ 2,3)-galactosidos en mucinas	<i>Escherichia coli</i> (fimbrias S)
Oligosacáridos neutros (LNT, LNnT)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Sia( $\alpha$ 2,3) Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc-R	<i>Haemophilus influenzae</i>
Gal( $\beta$ 1,3/4)GlcNAc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fuc( $\alpha$ 1,2)Gal	<i>Candida albicans</i>

(Continúa)

Tabla 4. (Continuación)

Oligosacáridos receptores	Microorganismos
Sialil-lactosa	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>Streptococcus sanguis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Aspergillus fumigatus</i> (conidia)
	<i>Escherichia coli</i>
	Virus de la influenza
	Poliomavirus
	<i>Vibrio cholerae</i> (toxina)
Sialil-lactosa y glicoproteínas sialiladas	<i>Helicobacter pylori</i>
Glicoproteínas sialiladas (enlaces $\alpha$ -2,3)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Poli-N-acetil lactosamina sialilada	
Poli-N-acetilactosaminoglicanos (enlaces $\alpha$ -2,3) sialilados	<i>Streptococcus suis</i>
Sia( $\alpha$ 2,3)0,1Gal( $\beta$ 1,4)GlcNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc-R	<i>Haemophilus influenzae</i>
Lactadherina (glicoproteína sialilada)	Rotavirus
Sialil-( $\alpha$ 2,6)-lactosa	Virus de la influenza tipo A
Sialil-( $\alpha$ 2,3)-lactosa	Virus de la influenza tipo B
Glicoproteínas $\alpha$ -2,3 sialiladas	Virus de la influenza tipo C

(Kunz *et al.*, 2000; Kunz y Rudloff, 2006; Morrow *et al.*, 2004; Ruiz-Palacios *et al.*, 1990; Yolken *et al.*, 1992)

### **2.3.3 EFECTO INMUNOMODULADOR**

#### 2.3.3.1 El sistema inmune

El sistema inmune es el conjunto de estructuras y procesos biológicos del organismo, cuyo propósito es reconocer y responder a una amplia variedad de patógenos y lesiones. Está constituido por el sistema inmune innato, y el sistema inmune adaptativo. El primero posee una respuesta general y no se altera con la exposición. El segundo aumenta su respuesta conforme se aumenta su exposición, y exhibe especificidad y memoria. Dentro de las barreras de primera línea (defensas externas) del sistema inmune innato se encuentran epitelio y mucosas, cilios, lisozima en lágrimas y otras secreciones, el pH gástrico, etc. En las barreras de segunda línea (defensas internas) se encuentran la fagocitosis e inflamación mediada por células especializadas (neutrófilos, monocitos, células NK, etc.) y proteínas solubles (complemento, proteínas de fase aguda, interferones, etc.). El sistema inmune adaptativo exhibe una tercera línea de defensa, que consiste en una respuesta humoral mediada por linfocitos B (Cota y Midwinter, 2015).

Como parte de la respuesta inmune, la inflamación es la rápida respuesta del cuerpo hacia estímulos dañinos como lesiones e infección, en la cual células del sistema inmune y mediadores colaboran para neutralizar y eliminar el estímulo dañino, permitiendo así la restauración de la homeostasis (Ahmad *et al.*, 2018).

Los mediadores que participan en el proceso son conocidos como citocinas. Éstas, son pequeñas proteínas y glucoproteínas solubles, producidas por diversos grupos celulares, que median la comunicación entre células inmunes y no inmunes, actuando así, como reguladores sistémicos. La interacción de las citocinas con receptores de membrana específicos, desencadenan una cascada de reacciones en el interior de la célula diana que determina su acción biológica (Arango Duque y Descoteaux, 2014; Filella *et al.*, 2002). Existen citocinas

tanto proinflamatorias como antiinflamatorias y el balance entre ellas determina la respuesta inflamatoria (Filella *et al.*, 2002).

Un tipo de células que participa en esta red de comunicación son los macrófagos, los cuales son células fagocíticas y bactericidas. Éstos constituyen un elemento importante del sistema inmune debido a la variedad de citocinas que producen, lo cual les permite mediar la transición del sistema inmune innato al adaptativo además de jugar un importante papel en patologías como enterocolitis necrotizante, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, etc. Estas células son activadas después de una exposición a estímulos como el lipopolisacárido (LPS) y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), con lo cual se liberan citocinas proinflamatorias y óxido nítrico (Arango Duque y Descoteaux, 2014; Hodzic *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014a).

Una de las citocinas proinflamatorias, es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), una citocina producida fundamentalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos T activados, en los cuales ejerce su función a través de los receptores TNF-R-I y TNF-R-II. Dentro de sus funciones biológicas destacan la producción de una necrosis hemorrágica en algunos tipos tumorales además de actuar como mediador en el desarrollo del choque séptico y en la caquexia (Filella *et al.*, 2002).

En el caso de las citocinas antiinflamatorias, destaca la interleucina-10 (IL-10) producida por algunas células mononucleares como los linfocitos T de tipo Th2 y los macrófagos. Su función antiinflamatoria la ejerce al inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-2 (producidas por linfocitos T), IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  (producidas por macrófagos) (Filella *et al.*, 2002).

Si bien el proceso inflamatorio promueve la eliminación de estímulos dañinos al cuerpo, por sí mismo, el proceso puede contribuir al daño de los tejidos circundantes e incluso

incrementar la severidad de la patología (Ahmad *et al.*, 2018). El evento fisiológico conocido como tormenta de citocinas consiste en una respuesta inflamatoria aguda y potencialmente mortal que ocurre en respuesta a patógenos y a restos de las células hospedadoras dañadas (Tabas y Glass, 2013). En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal (que abarca la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, etc.), las citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos, incluyendo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ , pueden dañar monocapas intestinales (Oh *et al.*, 2017). Por su parte, durante las infecciones entéricas en el intestino de los neonatos, ocasionada por bacterias Gram-negativas, el LPS en la superficie de estas células patógenas, es reconocido por receptores específicos en la membrana de diferentes células humanas, lo cual conduce a la producción de citocinas proinflamatorias con la finalidad de contrarrestar el ataque (He *et al.*, 2016). Sin embargo, el intestino inmaduro del neonato se caracteriza por la sobreexpresión de genes inflamatorios y por la expresión insuficiente de genes retro-reguladores de esta señal, lo cual podría conducir a una inflamación excesiva (Kulinich y Liu, 2016). Existen otras enfermedades crónicas que poseen un componente inflamatorio importante, entre ellas artritis reumatoide, arteriosclerosis, obesidad, resistencia a la insulina, Alzheimer, enterocolitis necrotizante, esclerosis múltiple, etc. (Good *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014a; Oh *et al.*, 2017; Sotgiu *et al.*, 2006; Tabas y Glass, 2013). Debido a lo anterior, existe un interés en la búsqueda de terapias enfocadas a la respuesta inflamatoria

#### 2.3.3.2 Efecto de los OLH en la respuesta inmune

Como se ha mencionado, durante la lactancia, el intestino es aún inmaduro, por lo que los OLH desempeñan un papel regulador de la respuesta inmune a nivel de epitelio y a nivel sistémico. Esta regulación sistémica se da una vez que los OLH han atravesado la pared intestinal y han entrado al torrente sanguíneo. La tasa de absorción de los OLH en el tracto gastrointestinal ha sido reportada de alrededor del 1 % P/P y se ha sugerido que la

concentración de OLH en la sangre se encuentra entre 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que puede ser suficiente para la interacción con los receptores celulares (Kulinich y Liu, 2016; Kunz *et al.*, 2014).

Los OLH interactúan con algunos receptores en la membrana de diferentes poblaciones celulares, ejerciendo influencia sobre los niveles de diferentes tipos de citocinas, principalmente promoviendo la producción de antiinflamatorias y disminuyendo la de proinflamatorias.

Se ha reportado que la adhesión de diferentes tipos de leucocitos aislados de sangre periférica humana sobre células endoteliales (células HUVEC, o células endoteliales de vena umbilical humana) activadas por  $\text{TNF-}\alpha$ , fue reducida hasta en un 50 % utilizando OLH sialilados (Bode *et al.*, 2004; Kannagi, 2002). Varios componentes activos dentro de la fracción de oligosacáridos de la leche humana fueron identificados, por ejemplo, 3'-sialil-lactosa y 3'-sialil-3-fucosil-lactosa. Estos resultados indican que oligosacáridos específicos en la leche humana puede servir como componentes antiinflamatorios y podrían por lo tanto contribuir a la menor incidencia de enfermedades inflamatorias en los lactantes alimentados con leche humana (Kunz y Rudloff, 2006).

La capacidad de los OLH de ejercer efectos directos sobre el sistema inmune fue reportada por Eiwegger *et al.* (2004), quienes encontraron que OLH sialilados estimularon células T influyendo en la producción de citocinas, pues se incrementó la producción de interferón gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) y disminuyó la producción de interleucina 4.

En el caso de algunos FUCOS como 2'FL y LNFP-I, se ha propuesto que los receptores de membrana celular manosil-fucosilo pueden estar involucrados en transducción de la señal (Kulinich y Liu, 2016; Sotgiu *et al.*, 2006).

Los TLR (Toll-like receptors) son receptores en la superficie de diversos grupos de células que reconocen un amplio rango de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), por ejemplo, LPS, conduciendo a la producción de citocinas proinflamatorias (Kulinich y Liu, 2016). Los OLH pueden actuar como análogos de ligandos para TLR, siendo así capaces de modular la expresión de estos receptores, así como su ruta de transducción de señales, por ejemplo, los OLH del calostro pueden regular las rutas de señalización de PAMP dependientes de TLR3, TLR5 e IL-1b (He *et al.*, 2016; He *et al.*, 2014; Kulinich y Liu, 2016; Li *et al.*, 2014b).

El CD14 (cluster of differentiation 14) es un receptor de membrana que en conjunto con TLR4 y otros receptores, tiene la función biológica de reconocer al LPS. Se ha reportado que el oligosacárido 2'FL disminuyó los niveles de mRNA y de la forma ligada a membrana de CD14, contribuyendo a disminuir la inflamación causada por LPS, durante la infección por diferentes especies de *Escherichia coli* en enterocitos (He *et al.*, 2016).

Los OLH más estudiados con respecto a su función inmunomoduladora son 2'FL y LNFP-I. Se ha reportado que disminuyen la proliferación de células mononucleares activadas con LPS tanto en pacientes sanos como con esclerosis múltiple, en macrófagos aumentan la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 y disminuyen la producción de las citocinas proinflamatorias IFN- $\gamma$  e IL-12 (Sotgiu *et al.*, 2006). Además, la 2'FL inhibe la producción de las citocinas proinflamatorias IL-8 e IL-1b en las líneas celulares HEp-2 y HT-29 en intestino de ratón infectados con *Campylobacter jejuni* (Yu *et al.*, 2016).

LNFP-III, es capaz de inducir la producción de IL-10 y prostaglandina E2 en esplenocitos, dos moléculas capaces de regular las células Th1 (Velupillai y Harn, 1994).

Li *et al.* (2014b) reportaron que una mezcla de OLH suministrada a cerdos tanto sanos como infectados con rotavirus, fue capaz de estimular la producción de IL-10 e IFN- $\gamma$  en el íleon.

## 2.4 BIOSÍNTESIS DE FUCOS

Al igual que otros OLH, los FUCOS de la leche humana son sintetizados en el aparato de Golgi de las células que revisten el alveolo y los ductos menores de la glándula mamaria; ahí son sintetizados por la acción de glicosiltransferasas específicas conocidas como fucosiltransferasas (FT) a través de la adición secuencial de fucosa a la molécula de lactosa (Gabrielli *et al.*, 2011; McVeagh y Miller, 1997).

Para que las FT lleven a cabo esta síntesis, requieren de sustratos conocidos como fucosil-nucleótidos y el preferido por las FT es la GDP-fucosa (guanosina-difosfato-fucosa) la cual se puede sintetizar en el citosol mediante dos vías, la vía *de novo* y la *de salvamento* (Figura 3). La vía *de novo* parte de GDP-manosa como precursor, la cual se transforma en GDP-fucosa mediante un paso de deshidratación dependiente de NADP, catalizado por GDP-D-manosa-4,6-dehidratasa y dos pasos (epimerización y reducción con NADPH) catalizados por GPD-4-Ceto-6-deoxi-D-manosa-3,5-epimerasa-4-reductasa. La vía *de salvamento* parte de la L-fucosa como precursor, la cual proviene de la degradación lisosomal o bien es obtenida de la nutrición. La enzima L-fucosa-quinasa fosforila la L-fucosa utilizando ATP para formar ADP y L-fucosa-1-fostato, que es convertida posteriormente a GDP-L-fucosa por la enzima GDP-L-fucosa pirofosforilasa (Arteaga-Cabello, 2013).



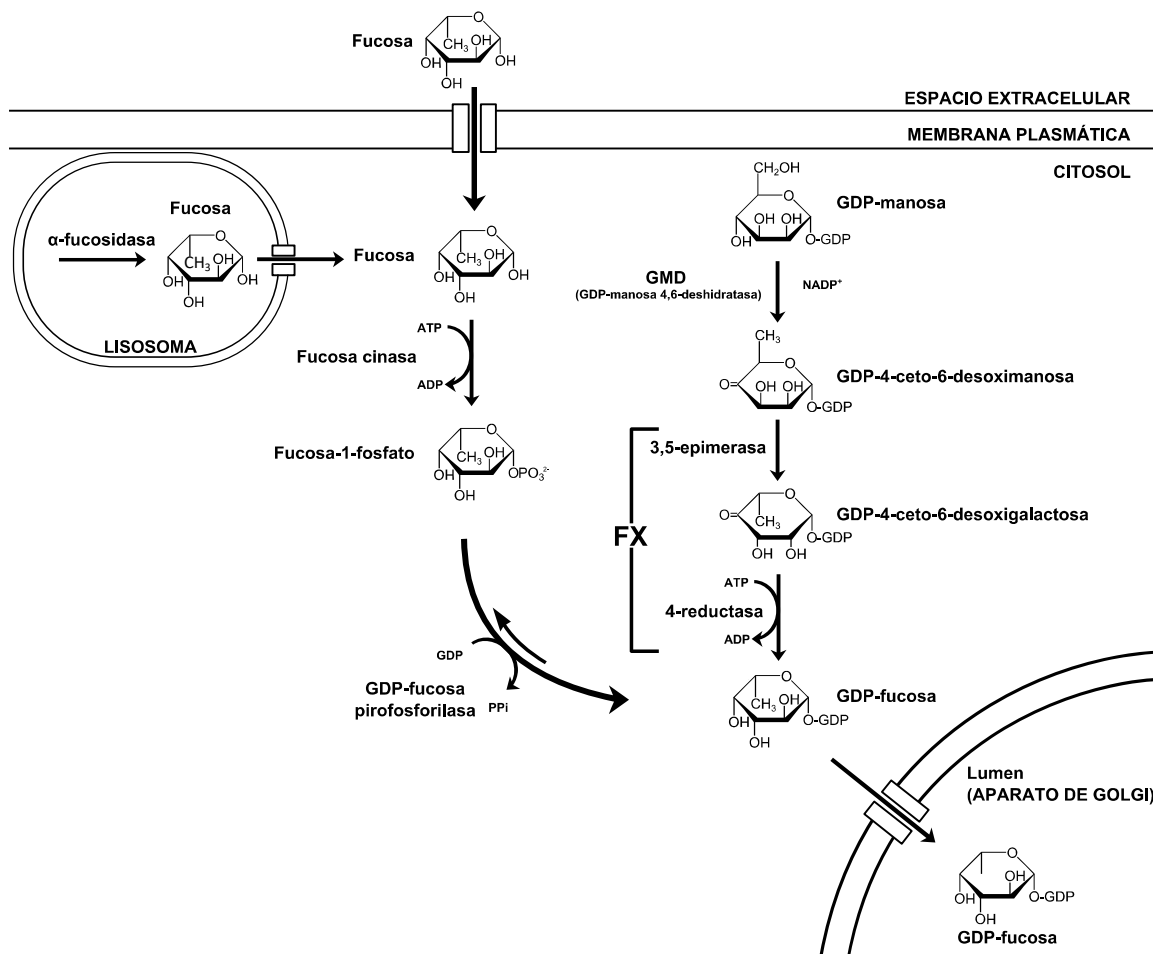


Figura 3. Biosíntesis de GDP-fucosa: A) vía de salvamento, B) vía de novo (Arteaga-Cabello, 2013).

Una vez que el fucosil-nucleótido ha entrado al aparato de Golgi, las FT llevan a cabo la transferencia sucesiva de fucosa hacia la molécula de lactosa. El tipo de FT que participa en esta síntesis, depende de la expresión de dos genes, el gen secretor o *FUT2* (*Se*), y el gen de Lewis o *FUT3* (*Le*), mismos genes que determinan los antígenos de los grupos sanguíneos (Gabrielli *et al.*, 2011; Morrow *et al.*, 2004). La FT del gen *Se* regula la síntesis de enlaces fucosídicos  $\alpha$ -1,2, mientras que la del gen *Le* promueve la síntesis de enlaces fucosídicos  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4. Debido a lo anterior, la expresión uno u otro gen condiciona el perfil de FUCOS en la leche humana. También existen otras FT independientes del gen *Le* y presentes en todas

las mujeres, pueden sintetizar oligosacáridos con enlaces fucosídicos  $\alpha$ -1,3 (Gabrielli *et al.*, 2011).

En un estudio sobre la población de Europa, se han planteado cuatro diferentes grupos de leche, en función de la expresión de los genes *Se* y *Le*. El grupo 1 ( $Se^+/Le^+$ ) correspondiente al 70 % de la población, el cual contiene FUCOS con enlaces fucosídicos  $\alpha$ -1,2/3/4. El grupo 2 ( $Se^-/Le^+$ ) corresponde al 20 % de la población, el cual no contiene  $\alpha$ -1,2 FUCOS debido a la ausencia de la expresión del gen *Se*. El grupo 3 ( $Se^+/Le^-$ ) 9 % de la población, caracterizado por la ausencia de  $\alpha$ -1,4 FUCOS, por la inactividad del gen *Le*. El grupo 4 ( $Se^-/Le^-$ ) el 1 % de la población, contiene únicamente  $\alpha$ -1,3 FUCOS, debidos a la expresión de FT independientes al gen de Lewis (Gabrielli *et al.*, 2011).

Además de lo anterior, el perfil de FUCOS, también varía en el transcurso del periodo de lactación, como se observa en la tabla 5 (Chaturvedi *et al.*, 2001; Gabrielli *et al.*, 2011).

*Tabla 5. Concentración de FUCOS y otros OLH en diferentes etapas de la lactancia (Madres Se<sup>+</sup>/Le<sup>+</sup>)*

Oligosacáridos	Concentración (media ± s, g /L)			
	Día 4	Día 10	Día 20	Día 30
FUCOS				
2'-Fucosil-lactosa	7.23 ± 3.39	5.36 ± 2.58	4.72 ± 2.01	4.41 ± 1.70
Lacto- <i>N</i> -difucohexaosa II	0.09 ± 0.09	0.16 ± 0.17	0.17 ± 0.15	0.19 ± 0.14
Trifucosil-lacto- <i>N</i> -hexaosa	0.46 ± 0.29	0.68 ± 0.36	0.83 ± 0.50	0.78 ± 0.63
Difucosil- <i>p</i> -lacto- <i>N</i> -neohexaosa	0.39 ± 0.37	0.57 ± 0.48	0.58 ± 0.45	1.02 ± 1.39
Difucosil- <i>p</i> -lacto- <i>N</i> -hexaosa	0.33 ± 0.20	0.60 ± 0.92	0.36 ± 0.24	0.44 ± 0.35
Difucosil-lacto- <i>N</i> -hexaosa	2.63 ± 1.17	2.71 ± 1.41	2.77 ± 1.20	2.74 ± 1.49
3-Fucosil-lactosa	0.42 ± 0.23	0.74 ± 0.69	0.67 ± 0.46	0.66 ± 0.53
Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa III	0.49 ± 0.26	0.40 ± 0.22	0.35 ± 0.20	0.40 ± 0.24
Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa II	0.28 ± 0.18	0.47 ± 0.28	0.44 ± 0.21	0.41 ± 0.29
Lacto-difuco-tetraosa	1.17 ± 0.73	0.86 ± 0.53	0.66 ± 0.44	0.84 ± 0.61
Lacto- <i>N</i> -fucopentaosa I	1.99 ± 0.92	1.89 ± 1.30	1.68 ± 1.19	1.40 ± 1.01
Fucosil-lacto- <i>N</i> -hexaosa II	0.34 ± 0.14	0.34 ± 0.18	0.31 ± 0.12	0.27 ± 0.12
Total FUCOS	15.82	14.77	13.5	13.54

*Continúa*

Tabla 5. Continuación

Oligosacárido	Concentración (media $\pm$ s, g /L)			
	Día 4	Día 10	Día 20	Día 30
<b>Oligosacáridos núcleo</b>				
13: Lacto- <i>N</i> -neotetraosa	1.97 $\pm$ 1.51	1.66 $\pm$ 1.23	1.64 $\pm$ 1.22	1.61 $\pm$ 1.37
14: Lacto- <i>N</i> -neohexaosa	0.10 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.07	0.08 $\pm$ 0.07
15: Lacto- <i>N</i> -tetraosa	1.26 $\pm$ 0.71	1.64 $\pm$ 0.86	1.74 $\pm$ 0.75	1.54 $\pm$ 0.77
16: Lacto- <i>N</i> -hexaosa	0.08 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.03
Total oligosacáridos núcleo	3.41	3.45	3.52	3.29
<b>Sialil oligosacáridos</b>				
Fucosil-sialil-lacto- <i>N</i> -neohexaosa	0.43 $\pm$ 0.17	0.54 $\pm$ 0.24	0.43 $\pm$ 0.14	0.35 $\pm$ 0.14
Sialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa c	1.31 $\pm$ 0.54	1.22 $\pm$ 0.52	0.67 $\pm$ 0.34	0.49 $\pm$ 0.37
6'-Sialil-lactosa	0.65 $\pm$ 0.37	0.87 $\pm$ 0.47	0.77 $\pm$ 0.45	0.59 $\pm$ 0.43
3'-Sialil-lactosa	0.28 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.14	0.25 $\pm$ 0.11	0.22 $\pm$ 0.10
Sialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa a	0.28 $\pm$ 0.22	0.31 $\pm$ 0.20	0.33 $\pm$ 0.22	0.28 $\pm$ 0.23
Sialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa b	0.11 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.10	0.18 $\pm$ 0.14	0.17 $\pm$ 0.11
Disialil-lacto- <i>N</i> -tetraosa	1.07 $\pm$ 0.41	1.19 $\pm$ 0.47	1.13 $\pm$ 0.51	1.02 $\pm$ 0.56
Total sialil oligosacáridos	4.14	4.58	3.76	3.11
Total oligosacáridos	23.36	22.80	20.79	19.94

(Gabielli *et al.*, 2011)

## 2.5 SÍNTESIS QUÍMICA DE OLIGOSACÁRIDOS

Tradicionalmente los métodos químicos han sido los más usados para la síntesis de oligosacáridos, pero son complicados e involucran un gran número de pasos. Debido a que los carbohidratos tienen varios grupos hidroxilo de similar reactividad, se requieren numerosos pasos de protección y desprotección para alcanzar la regioselectividad deseada. Además, el número de pasos se incrementa al aumentar el tamaño del oligosacárido haciendo la síntesis de oligosacáridos simples un largo proceso. Por ejemplo, se necesitan al menos siete pasos para sintetizar un disacárido, y al menos 10 para un trisacárido. Estos métodos necesitan reactivos relativamente costosos y los rendimientos son muy bajos comparados con otros métodos como la síntesis por glicosiltransferasas (Maitin y Rastall, 2006).

Para ejemplificar la complejidad de estos procesos de síntesis, puede citarse el trabajo de Xia *et al.*, (2000), quienes diseñaron y sintetizaron un pentasacárido ramificado **1** (Figura 4) obtenido de la siguiente manera: Tras 3 pasos de protección/desprotección (i, iii, iv, v) y uno de glicosilación (ii), se obtuvo el disacárido **8**, un donador cuyo grupo 6-OH se acopló regioselectivamente (vii) a un trisacárido donador tipo Lewis-x. Este paso de la reacción fue promovido con NIS/TfOH (simportador de Na<sup>+</sup>-I<sup>-</sup>/ ácido trifluorometansulfónico). El producto de esta reacción fue sometido a una O-decloroacetilación, una sulfatación regioselectiva del grupo 6-OH de la galactosa y una remoción sistemática de los grupos protectores, para obtener el pentasacárido objetivo.

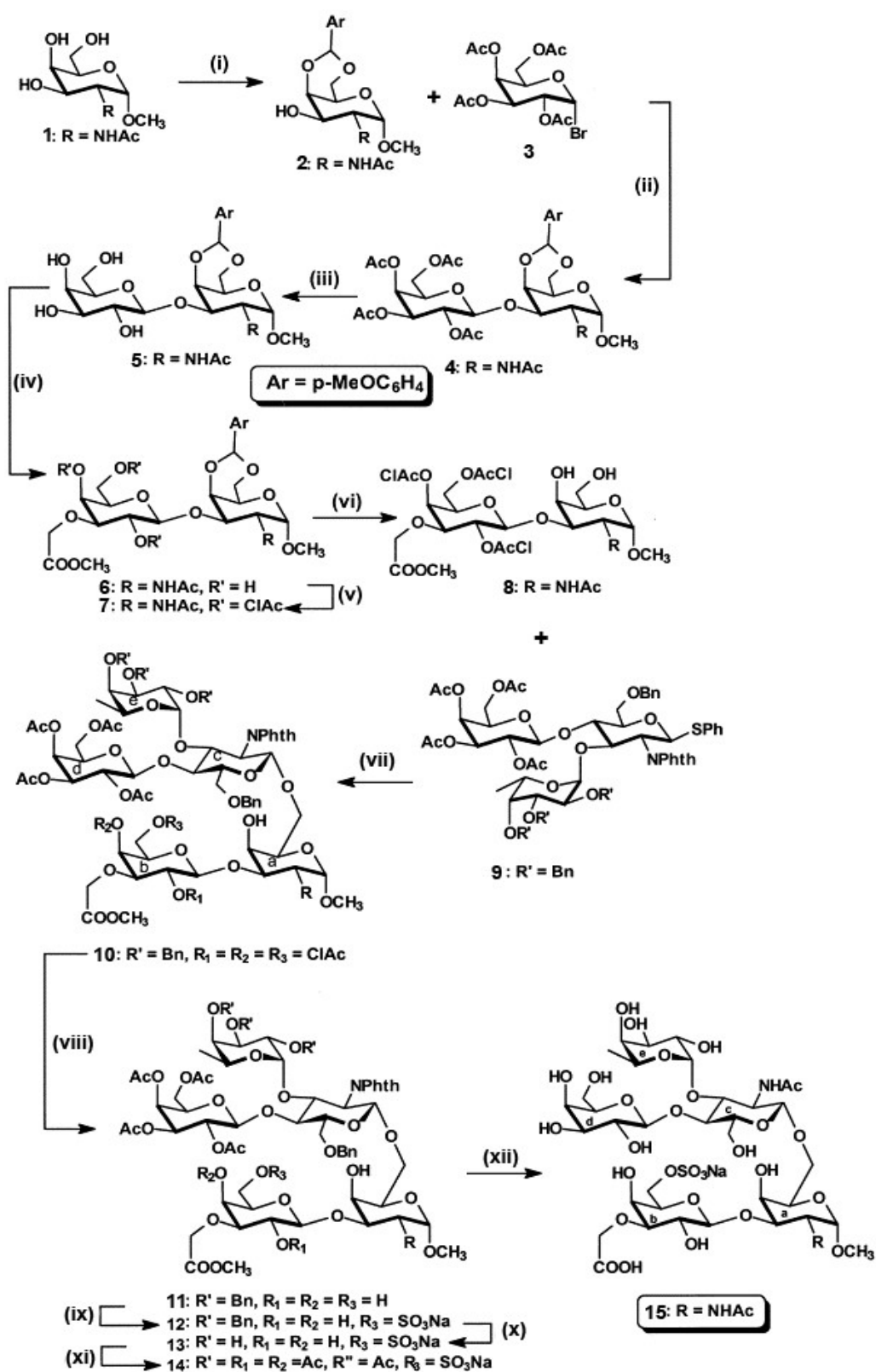


Figura 4. Síntesis de un pentasacárido ramificado núcleo tipo 2 (Xia *et al.*, 2000)

## 2.6 SÍNTESIS QUÍMICA-ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS

Algunas estrategias para síntesis química de oligosacáridos involucran enzimas en algunos pasos del proceso.

La Ferla *et al.* (2002), describen la síntesis de un tetrasacárido fucosilado protegido, con la posibilidad de utilizarse posteriormente como un bloque de construcción en la síntesis de oligosacáridos más complejos (Figura 5). La estrategia de síntesis inició con la obtención del compuesto precursor **18** a partir de dos derivados de *N*-acetil-lactosamina (**16** y **17**). Posteriormente, la remoción del grupo bencilideno de **18** seguida de una desacetilación dio lugar al compuesto **20**. Usando una lipasa de *Candida antarctica* (su especificidad no fue reportada) y acetato de vinilo, en acetonitrilo como disolvente, fue posible acetilar selectivamente los grupos 6-OH de ambas unidades del compuesto **20**, obteniendo así el compuesto **21**. Los grupos 3-OH y 4-OH del compuesto obtenido **21**, fueron entonces protegidos mediante la introducción de un grupo isopropilideno obteniendo el diol **22**. Tal compuesto se usó como aceptor para la síntesis del tetrasacárido deseado, empleando el donador **23** y trimetilsilil trifluorometanosulfonato (TMSOTf) como ácido de Lewis, obteniendo finalmente el tetrasacárido difucosilado **24**.

Rencurosi *et al.* (2002), emplearon la 6'-O-acilación de la lactosa enzimáticamente catalizada para diseñar un versátil bloque de construcción de lactosa protegida quimioenzimáticamente para utilizarse en la síntesis de 3'- y 6'-O-sialil-lactosas y sus análogos (Figura 6). En este caso se utilizó una reacción enzimática catalizada por la lipasa de *C. antarctica* (CAL, su especificidad no fue reportada) para proteger selectivamente los grupos 6'-OH de la estructura **25** con un grupo levulinoilo. Adicionalmente a subsecuentes protecciones y desprotecciones se llevaron a cabo reacciones de sialilación (reacciones xxiii y xxvi) empleando la estructura **35** como donador y TMSOTf como promotor de la reacción. Los

oligosacáridos sialilados sintetizados fueron 6'-sialil-lactósidos (**30** y **31**), y 3'-sialil-lactósido (**34**).

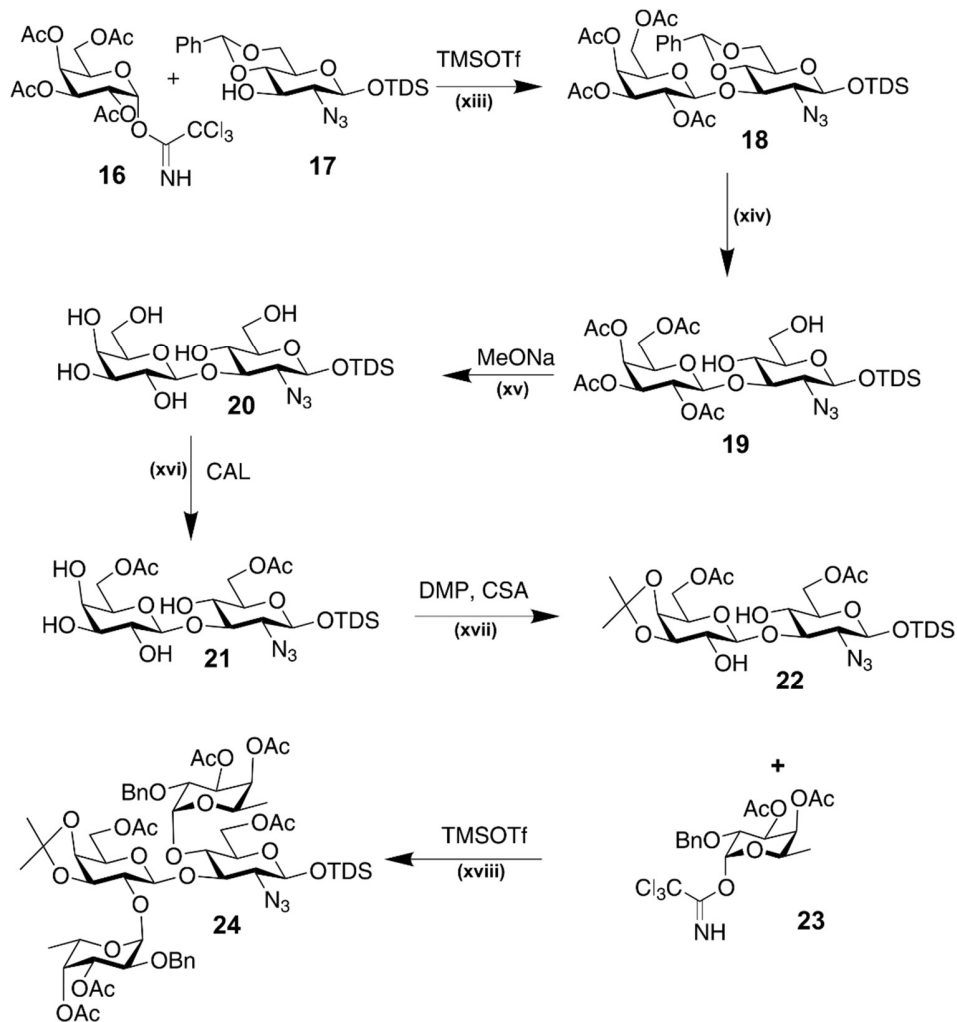


Figura 5. Esquema de síntesis química-enzimática de texildimetilsilil 3,4-di-O-acetil-2-O-benzil- $\alpha$ -L-fucopiranosil-(1-2)-6-O-acetil-3,4-O-isopropilideno- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-3)-[3,4-di-O-acetil-2-O-benzil- $\alpha$ -L-fucopiranosil-(1-4)]-6-O-acetil-2-azido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido (**24**) un derivado difucosilado protegido, mediante síntesis química-enzimática (La Ferla et al., 2002).



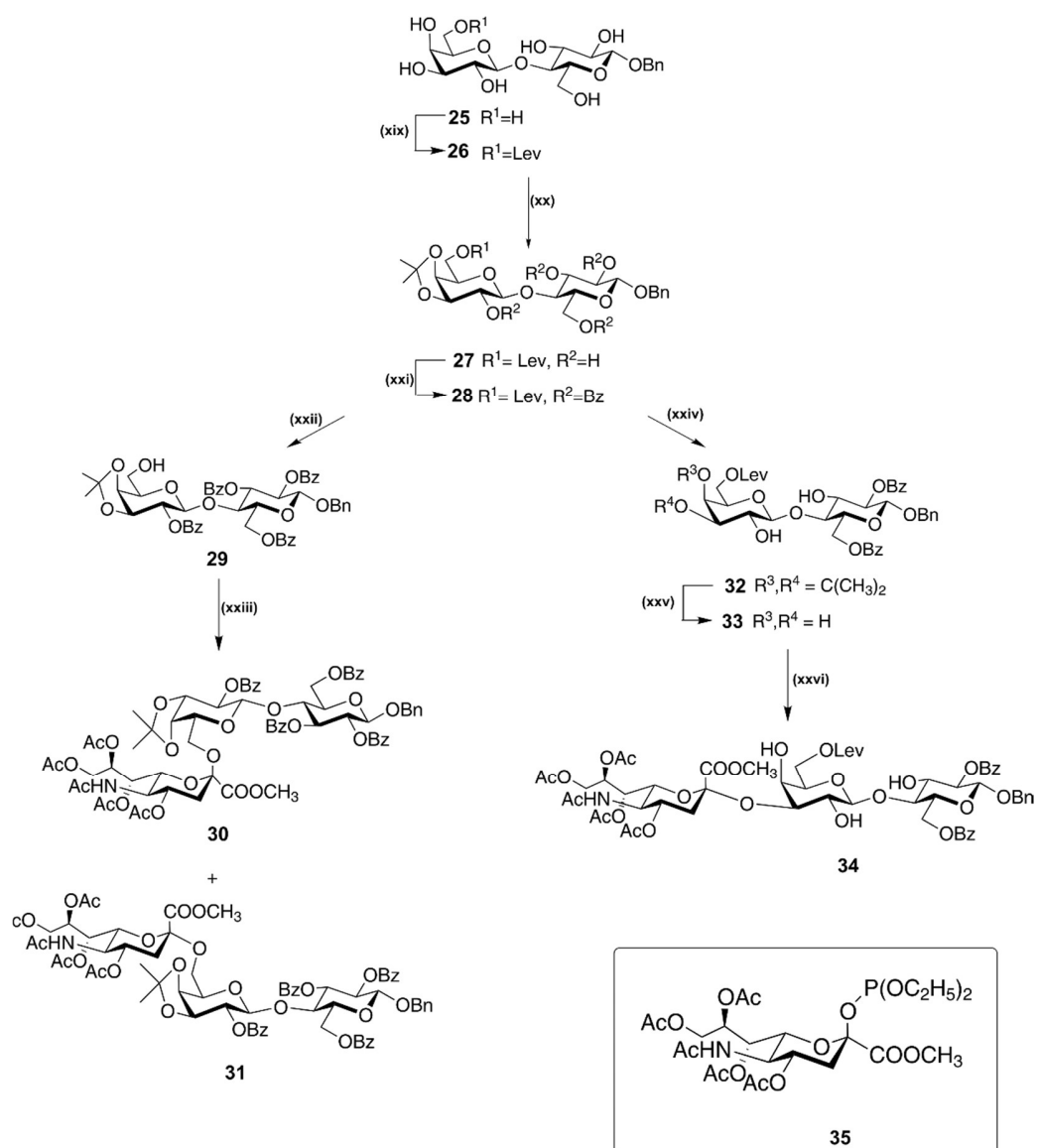


Figura 6. Formación de bloques de construcción de lactosa para la síntesis de 3- y 6-O-sialil-lactosa y sus análogos (Rencurosi et al., 2002).

## 2.7 SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE OLIGOSACÁRIDOS

A diferencia de los métodos químicos, la síntesis enzimática no requiere de estrategias complejas de protección y desprotección selectiva de grupos y ofrecen un control absoluto en la configuración de centros anoméricos recién formados por la estereoespecificidad de las

enzimas (Crout y Vic, 1998; Watt *et al.*, 1997). Las enzimas empleadas son principalmente fucosiltransferasas y glicosidasas.

Sobre la base de similitud de secuencia, glicosilhidrolasas y glicosiltransferasas se han clasificado en aproximadamente 100 y 85 familias, respectivamente.

## 2.7.1 SÍNTESIS DE FUCOS CON FUCOSILTRANSFERASAS (FT)

### 2.7.1.1 Generalidades

Como se ha mencionado, las FT son un tipo de glicosiltransferasas encargadas de sintetizar FUCOS en los seres vivos. La síntesis de FUCOS se lleva a cabo mediante la transferencia del grupo fucosilo, de un sustrato donador (comúnmente fucosil-nucleótidos) a un sustrato aceptor (otros carbohidratos). Se suele decir que el sustrato donador se encuentra activado, debido a la presencia de un nucleótido-difosfato, el cual actúa como un mejor grupo saliente durante la transglicosilación (Figura 7). A las glicosiltransferasas que utilizan donadores de este tipo se les designa como de tipo Leloir (David, 2003) (Hancock *et al.*, 2006).



Figura 7. Reacción básica de las glicosiltransferasas. En el caso de las enzimas tipo Leloir, el grupo saliente (GS) es un nucleótido-difostato (Hancock *et al.*, 2006).

### 2.7.1.2 Uso en síntesis de FUCOS

Las FT ofrecen ventajas, como los altos rendimientos de síntesis además de transferir los grupos fucosilo con estricta regio y estereoselectividad, sin embargo, su aplicación en síntesis preparativa, la cual tiene como objetivo producir en mayor escala el compuesto de interés, está restringida debido a la poca disponibilidad de este tipo de enzimas y de sus sustratos donadores, además de que estos últimos son difíciles de sintetizar y por lo tanto costosos (Palcic, 2011; Watt *et al.*, 1997). Algunas complicaciones adicionales en el uso de las FT son la inhibición por producto de las reacciones de transfucosilación, y la marcada preferencia de cada enzima por un donador específico, lo cual limita las opciones de compuestos que podrían emplearse como sustratos, por ejemplo, las galactosiltransferasas utilizan como sustrato donador UDP-Gal y no GDP-Gal ni CDP-Gal, mientras que las sialiltransferasas utilizan exclusivamente CMP-Sia (David, 2003).

### 2.7.1.3 Reportes previos

Algunas estrategias para la síntesis de FUCOS empleando FT se mencionan a continuación. Arteaga-Cabello (2013) utilizó la cepa de *E. coli* JM107 clonando en ella la FT de *H. pylori* y la L-fucosa cinasa/GDP-L-fucosa pirofosforilasa de *Bacteroides fragilis*, para sintetizar una mezcla de 2'FL y LDFT a partir de fucosa y lactosa, con rendimientos de entre el 55 y 66 %.

Koizumi *et al.* (2000), establecieron un sistema para producción de GDP-Fuc y de un FUCO tipo Lewis-x. El sistema consistió en 5 bacterias metabólicamente acopladas (4 de *E. coli* modificadas genéticamente y una de *Corynebacterium ammoniagenes*). Una de las cepas de *E. coli* empleadas sobreexpresó la  $\alpha$ -1,3-fucosiltransferasa de *H. pylori*. Esta permitió la

síntesis del FUCO a partir de GDP-Fuc producida por las cepas previas y GlcNAc con concentraciones de hasta 21 g/L.

Mattila *et al.* (2000), produjeron GDP-Fuc por vía de *novo* a partir de GDP-Man intracelular, mediante la expresión de los genes *gmd* y *wcaG* de *E. coli* en *Saccharomyces cerevisiae*. Se eligió esta levadura porque tiene una poza citosólica rica en GDP-Man, de usarse un procarionte habría sido necesario adicionarla como sustrato al medio lo que sería más costoso.

Albermann *et al.* (2001), catalizaron la síntesis de GDP- $\beta$ -L-Fuc, además clonaron y sobreexpresaron los genes *gmd* y *wcaG* de *E. coli*, logrando mediante extractos celulares alimentar un sistema de producción de 2'FL utilizando la FT de *H. pylori* (FucT2) semipurificada, con rendimientos del 65 %.

Lee *et al.* (2012) construyeron una *E. coli* lactosa negativa (JM107-109) con capacidad de producir GDP-L-Fuc e insertaron en esta bacteria el gen de la FT de *H. pylori* (FucT2). Los rendimientos de transfucosilación fueron del 20 %.

Baumgärtner *et al.* (2013), construyeron una cepa de *E. coli* transgénica mediante cassettes de expresión integrados cromosómicamente, en vez de la expresión basada en plásmidos. La cepa transgénica fue capaz de sintetizar 2'FL en una concentración de  $20.28 \pm 0.83$  g/L.

Además de las FT, otras glicosiltransferasas estudiadas han sido las  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasas, las  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasas,  $\alpha$ -galactosiltransferasas,  $\beta$ -glucuroniltransferasas,  $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasas, y  $\beta$ -manosiltransferasas (David y Hancock, 2002).

## 2.7.2 SÍNTESIS DE FUCOS CON FUCOSIDASAS

### 2.7.2.1 Generalidades

Las fucosidasas son exoglicosilhidrolasas que catalizan la hidrólisis del residuo fucosilo comúnmente enlazado al extremo no reductor de los FUCOS y fucoglicoconjugados, con alto grado de estereoespecificidad. La Nomenclatura de Enzimas de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology, está basada en el tipo de reacción que cataliza la enzima y en la especificidad de su sustrato, y con base en esta nomenclatura, las fucosidasas se clasifican como EC 3.2.1.63 para las  $\alpha$ -L-1,2-fucosidasas las cuales hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,2 entre fucosa y galactosa, EC 3.2.1.111 para las  $\alpha$ -L-1,3-fucosidasas que hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,3 entre fucosa y GlcNAc y EC 3.2.1.51 para  $\alpha$ -L-fucosidasas menos específicas y capaces de hidrolizar una mayor variedad de enlaces como  $\alpha$ -1,2 entre fucosa y galactosa y  $\alpha$ -1,3/4/6 entre fucosa y GlcNAc (Henrissat, 1991; Intra *et al.*, 2007; Shaikh *et al.*, 2013). La base de datos CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) del grupo de glicogenómica del laboratorio AFMB (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques- French National Centre for Scientific Research-Aix-Marseille University) agrupa a las  $\alpha$ -L-fucosidasas en dos familias, de acuerdo a la similitud en la secuencia de aminoácidos de las enzimas (Henrissat, 1991). La familia GH29 agrupa a las fucosidasas que hidrolizan el enlace fucosilo con retención de la configuración anomérica en los productos de la reacción, empleando un mecanismo de doble desplazamiento (Figura 8). La reacción se produce con la asistencia de dos aminoácidos, uno que actúa como ácido/base general y otro como nucleófilo. En el primer paso de este mecanismo, el centro anomérico del sustrato donador es atacado por el aminoácido nucleófilo para desplazar al aglicón y formar un intermediario covalente fucosil-enzima. Al mismo tiempo, el otro residuo de aminoácido funciona como un ácido general y protona el oxígeno glicosídico a medida que el enlace se escinde. En el

segundo paso, el intermediario fucosil-enzima es atacado nucleofílicamente por el grupo hidroxilo de un aceptor (agua o algún carbohidrato), y el otro residuo de aminoácido actúa ahora como base general y desprotona la molécula de aceptor cuando este realiza el ataque. En esta última etapa, si el grupo hidroxilo que participa en el ataque nucleofílico proviene del agua, el resultado es la hidrólisis del compuesto, pero si el OH proviene de un carbohidrato se logra la transfucosilación (Hancock *et al.*, 2006; Zeuner *et al.*, 2014; Withers y Williams, 2017).

De los dos aminoácidos catalíticos antes mencionados, el que actúa como nucleófilo se encuentra bien conservado con respecto a su posición en la secuencia de aminoácidos, en toda esta familia de fucosidasas y corresponde al aspartato (D224). Por otra parte, la posición en la secuencia del aminoácido que actúa como ácido/base general, no se encuentra bien conservada, por lo que con base en relaciones filogenéticas, la posición de este aminoácido se ha tomado como criterio para dividir a la familia GH29 en dos subfamilias, la subfamilia GH29A cuyo ácido/base general es el ácido glutámico (E288) y son enzimas con una especificidad relajada y la subfamilia GH29B, cuyo ácido/base general es el ácido glutámico (E249) y son enzimas con especificidad hacia los enlaces  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4 (Shaikh *et al.*, 2013). Una propiedad importante de las fucosidasas de la familia GH29 es que además de realizar la hidrólisis del enlace fucosilo, son capaces de transferir fucosa del sustrato donador a sustratos como metilo, 4-nitrofenol (pNP), oligosacáridos o a alilos derivados de éstos últimos (Lezyk *et al.*, 2016).

La familia GH95, incluye  $\alpha$ -1,2-fucosidasas además de algunas galactosidasas. Estas enzimas se caracterizan por presentar un mecanismo de inversión de la configuración anomérica de los productos de la reacción, el cual es un mecanismo de desplazamiento sencillo que involucra estados de transición tipo ion oxocarbenio, con la asistencia de dos residuos de

aminoácidos en el sitio activo, un ácido general y una base general (Figura 9). En este mecanismo, el aminoácido que actúa como base general, desprotona el grupo hidroxilo de una molécula de sustrato aceptor (agua o un carbohidrato), al tiempo que esta molécula ataca nucleofílicamente el centro anomérico del sustrato donador, ocasionando la salida del aglicón. El aglicón es liberado al medio, tras ser protonado por el residuo de aminoácido que actúa como ácido general (McCarter y Withers, 1994).

En las enzimas de la familia GH95 una asparagina activada por ácido aspártico actúa como base general mientras que el carboxilo del ácido glutámico actúa como ácido general. La  $\alpha$ -L-1,2-fucosidasa de *B. bifidum* (BbAfcA) es la más estudiada dentro de esta familia y en ella se ha identificado el ácido glutámico (E566) y la asparagina (N423) como el ácido general y la base general, respectivamente (Nagae *et al.*, 2007)

A diferencia de las fucosidasas de la familia GH29, no se ha mostrado que las fucosidasas de la familia GH95 sean capaces de sintetizar oligosacáridos (Intra *et al.*, 2007; Lezyk *et al.*, 2016).

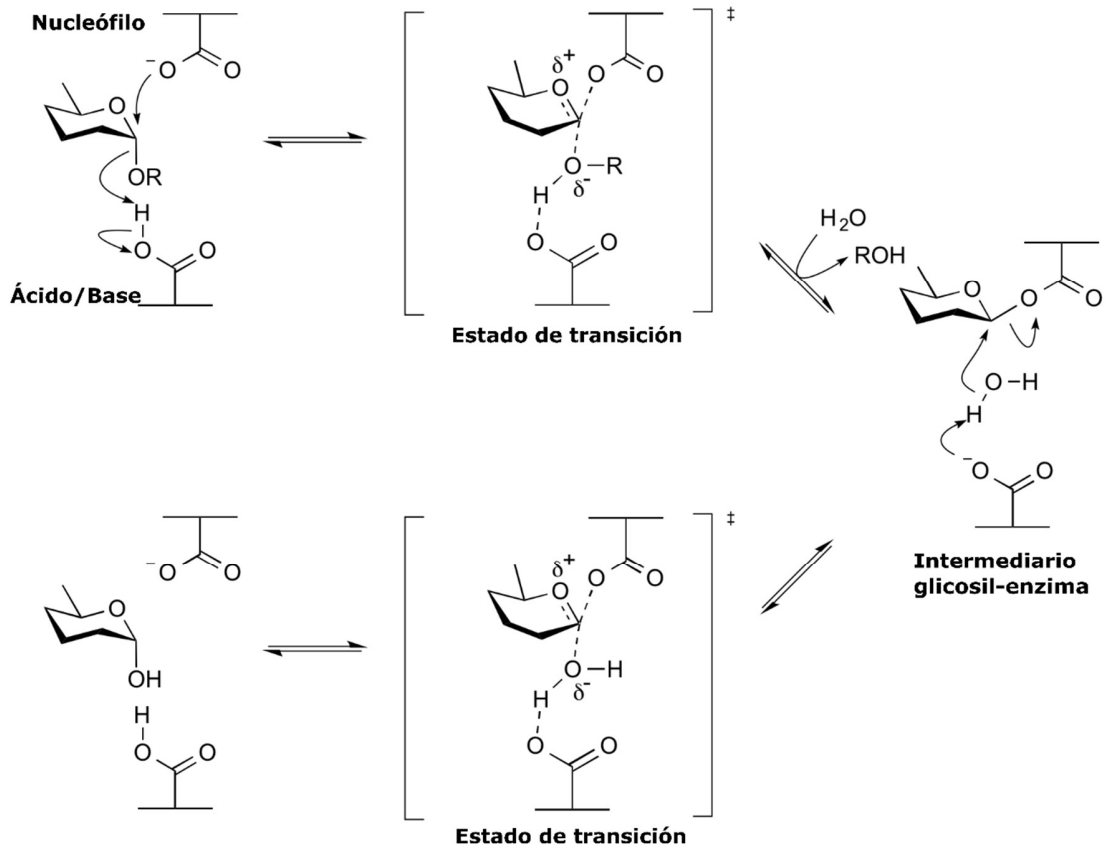


Figura 8. Mecanismo catalítico de las glicosidasas (fucosidasas) de retención.

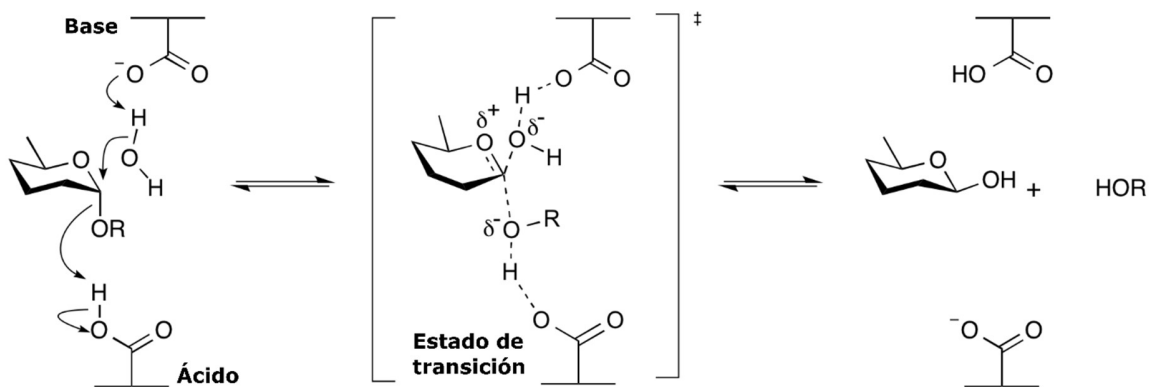


Figura 9. Mecanismo catalítico de las glicosidasas (fucosidasas) de inversión.



### 2.7.2.2 Uso en síntesis de FUCOS

El uso de glicosidasas para la síntesis de fucooligosacáridos es atractivo porque son enzimas muy disponibles, robustas y generalmente tolerantes a diferentes solventes orgánicos, además pueden emplear diversos sustratos donadores que no son caros, por ejemplo, glicósidos activados (nitrofenil-glicósidos), disacáridos e incluso monosacáridos libres (Crout y Vic, 1998; Palcic, 1999; Weijers *et al.*, 2008).

Sin embargo, presentan dos limitantes clave, la primera es la dificultad de conducir la reacción en una dirección termodinámicamente favorable para la transglicosilación y no para la hidrólisis (Watt *et al.*, 1997); la segunda es que el producto de transglicosilación es a su vez un sustrato hidrolizable por la enzima, por lo que los rendimientos de la transglicosilación son generalmente bajos (Watt *et al.*, 1997). En este sentido, para aumentar estos rendimientos se ha recurrido a diferentes estrategias basadas en la manipulación de la concentración de sustratos, la proporción molar entre sustrato donador y aceptor, temperatura, pH, fuente de la enzima y actividad de agua ( $a_w$ ) y al desarrollo de enzimas mutantes conocidas como glicosintasas que son incapaces de hidrolizar el oligosacárido sintetizado (Weijers *et al.*, 2008; Zeuner *et al.*, 2014).

Al igual que las FT, las fucosidasas son estereoespecíficas pues únicamente hidrolizan (y sintetizan) enlaces  $\alpha$  o bien  $\beta$ . En cuanto a la regioespecificidad, a diferencia de las FT, las fucosidasas muestran una selectividad menos pronunciada hacia la estructura de aceptor, esta depende del sustrato y enzima empleados. Si bien puede favorecerse la glicosilación sobre algún hidroxilo del aceptor en particular, la regioselectividad no es tan marcada en todos los casos, pues es posible obtener mezclas de varios regioisómeros. Por ejemplo, la fucosidasa canina recombinante, es capaz de transferir fucosa del sustrato sintético 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido (pNP-Fuc) a metil-galactosa, obteniéndose una mezcla de isómeros con

enlaces fucosilo  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,6 en una proporción 45:42:12, respectivamente. Debido a lo anterior, este tipo de síntesis se restringe a oligosacáridos pequeños dado que a mayor tamaño se aumenta complejidad en la purificación por la generación de isómeros (Palcic, 1999; Watt *et al.*, 1997; Berteau *et al.*, 2004; Weijers *et al.*, 2008).

### 2.7.2.3 Distribución en la naturaleza

Las fucosidasas se encuentran distribuidas en una amplia variedad de organismos (Intra *et al.*, 2007). En muchos moluscos, las fucosidasas contribuyen a la digestión de carbohidratos estructurales fucosilados presentes en las algas de las cuales se alimentan. En arácnidos, como la garrapata *Amblyomma cajennense*, una fucosidasa presente en su intestino medio, podría estar relacionada con mecanismos de defensa contra parásitos (Moreti *et al.*, 2013). En una gran variedad de animales, desde mamíferos hasta invertebrados como erizos de mar y ascidias, el reconocimiento y adhesión de gametos está mediado por proteínas de unión a carbohidratos presentes en la superficie del esperma, entre ellas fucosidasas, con una alta afinidad hacia glicoconjugados complejos presentes en la superficie del óvulo (Alhadef *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 2002). Los hongos del género *Aspergillus* poseen fucosidasas que les permiten, junto con otras enzimas, degradar y metabolizar el xiloglucano, un polisacárido fucosilado estructural, presente en vegetales (Culleton *et al.*, 2013).

La expresión de fucosidasas en algunas bacterias ácido lácticas del intestino humano, les permite metabolizar FUCOS, lo cual está vinculado con el carácter prebiótico de estos oligosacáridos. Por ejemplo *Lactobacillus casei* BL23, posee tres fucosidasas que le permiten liberar la fucosa a partir  $\text{Fuc}(\alpha 1,3)\text{GlcNAc}$ , obteniendo así  $\text{GlcNAc}$ , la cual es metabolizable por esta bacteria (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2012). Schwab y Ganzle (2011) estudiaron la capacidad de seis bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*

*plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Streptococcus. thermophilus*, y *Lactobacillus mesenteroides* subespecie *cremoris*) de hidrolizar OLH y por otra parte metabolizar los monosacáridos constituyentes de los OLH. De las especies estudiadas únicamente *L. acidophilus* y *L. plantarum* fueron capaces de metabolizar OLH de cadena corta (3 a 4 residuos de monosacáridos): 2'FL, 3FL, LNT y 6'-sialil-lactosa durante su incubación a 37 °C por una hora. El resto de las bacterias estudiadas mostró poca o nula actividad sobre estos oligosacáridos. En cuanto al consumo de monosacáridos de OLH, la fucosa generalmente no fue metabolizada y sólo se observó una conversión limitada en *L. acidophilus* y *L. plantarum*.

Por otra parte, estudios genómicos han revelado que *L. casei*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* son capaces de codificar fucosidasas putativas (Morita *et al.*, 2009; Rodriguez-Diaz *et al.*, 2012).

Con base en la información que se encuentra en la base de datos BRENDA (Braunschweig Enzyme Database) se construyó el dendograma de las fucosidasas (Figura 10) y como se puede observar más del 50 % de las fucosidasas estudiadas son de origen animal y 30 % de origen microbiano.

De esta diversidad de fucosidasas, aquellas que se han estudiado principalmente por su capacidad de sintetizar compuestos fucosilados pertenecen a bacterias (*T. maritima*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *Alcaligenes sp.*, *Thermus sp.*, etc.), mamíferos (*Homo sapiens*, *Sus scrofa domesticus*, *Canis lupus familiaris*, *Bos taurus*), moluscos (*Pecten maximus*, *Ampullaria sp.*) y hongos (*Penicillium multicolor*, *Aspergillus niger* y dos especies del género *Fusarium*).

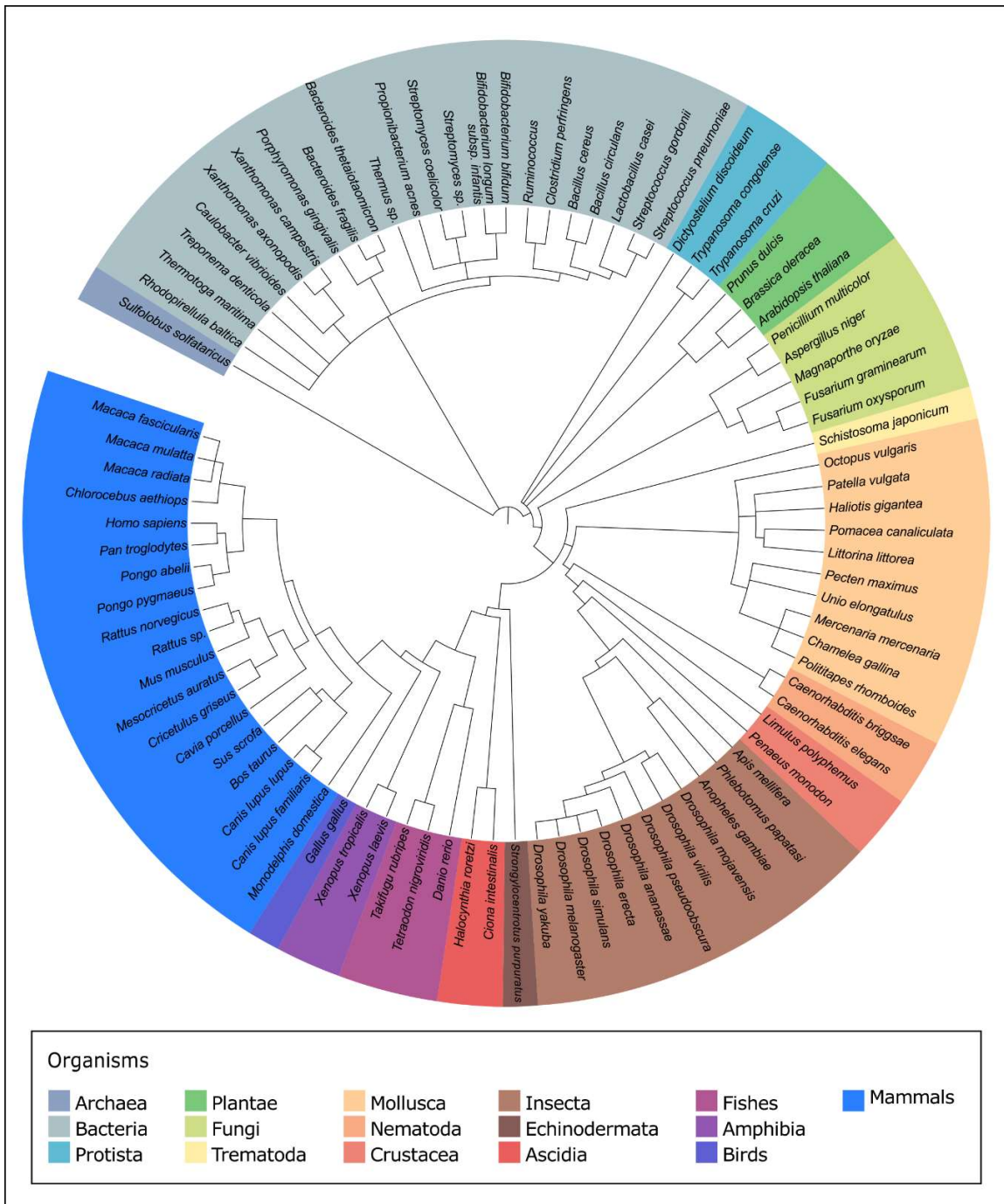


Figura 10. Distribución de fucosidasas en la naturaleza.

#### 2.7.2.4 Reportes previos

En el grupo de investigación de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa se han estudiado diferentes estrategias experimentales para la síntesis de FUCOS por vía enzimática utilizando glicosidasas.

Escamilla-Lozano (2011) estudió la capacidad de diferentes glicosidasas de sintetizar FUCOS mediante reacciones de transgalactosilación. Se encontró que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de riñón de bovino es capaz sintetizar FUCOS mediante la transferencia de fucosa de pNP-Fuc hacia lactosa. También estudió la síntesis del disacárido galactosil-fucosa utilizando  $\alpha$ -galactosidasa de *Aspergillus niger* (producto comercial Beano®), empleando melibiosa como donador y fucosa como aceptor; la síntesis de 4 disacáridos (uno de ellos fusilado) utilizando  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, empleando maltosa como donador y fucosa como aceptor; y la síntesis de tres  $\beta$ -galactosil-fucósidos utilizando  $\beta$ -galactosidasa hipertermofílica (GLY 001-02, CloneZyme™), empleando galactosa como donador y fucosa como aceptor. La presencia de fucosa en estos oligosacáridos es de gran interés dado que este monosacárido es reconocido por las adhesinas de las bacterias patógenas, inhibiendo su adhesión al epitelio intestinal.

Sosa-Ancona (2012) sintetizó un disacárido fucosilado por reacción de transgalactosilación con  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* utilizando lactosa como sustrato donador y fucosa como sustrato aceptor. El disacárido producido posee una molécula de galactosa y una de fucosa, su concentración máxima en la reacción fue de 6 mg /L y se alcanzó a las 9 horas de reacción. (Sosa-Ancona, 2012).

Osanjo *et al.* (2007) utilizaron la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* clonada en *Escherichia coli* para transferir fucosa a partir de pNP-Fuc hacia diferentes aceptores. Al utilizar pNP-Gal como sustrato aceptor, la fucosa se transfirió a la galactosa con la formación de enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,6 con

rendimientos del 14 y del 7 % respectivamente y adicionalmente se observó la presencia del producto de autocondensación pNP-Fuc-Fuc con un rendimiento del 8 %, en este caso la proporción molar donador/aceptor (D/A) fue de 0.5. Al utilizar una proporción D/A de 0.2 los rendimientos de los productos con enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,6 aumentaron a 23 y 8 % respectivamente e interesantemente la formación del producto de autocondensación de pNP-Fuc se redujo a trazas.

Lezyk *et al.* (2016), utilizaron la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* expresada en *E. coli* como modelo de comparación para evaluar el potencial de transfucosilación de siete fucosidasas obtenidas a partir del metagenoma de suelo. Al utilizar pNP-Fuc como donador y lactosa como aceptor, se obtuvo 2'FL en 6.4 %. Escamilla-Lozano (2016) utilizó la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* expresada en *E. coli* BL21 para transferir fucosa de pNP-Fuc hacia lactosa. El producto de la síntesis se reportó como FL con un rendimiento del 49 %.

Zeuner *et al.* (2018), emplearon la fucosidasa de *T. maritima* MSB8 clonada en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, para transferir fucosa de 2'FL hacia LNT. Se sintetizaron isómeros de LNFP-I, con un rendimiento total del 10 %. De acuerdo con los autores el isómero más abundante posee un enlace fucosídico  $\alpha$ -1,2.

### 2.7.3 GLICOSIDASAS MODIFICADAS

Las glicosilhidrolasas han emergido como una herramienta útil en la síntesis de glicósidos a través de reacciones de transglicosilación con exitosas aplicaciones en la reparación de diversas estructuras de glicanos. La utilidad de glicosilhidrolasas en síntesis se ha beneficiado por diversas estrategias de ingeniería. Ente ellas se encuentran las glicosintasas.

Aunque las glicosidasas han probado ser extremadamente valiosas en síntesis de carbohidratos, existen algunas limitantes, por ejemplo, el reto de dirigir la reacción en una dirección termodinámicamente desfavorable, y la degradación enzimática del producto de la reacción (Hancock *et al.*, 2006).

Las glicosintasas son glicosidasas mutantes, introducidas a finales de la década de 1990, las cuales catalizan la síntesis de nuevos enlaces glicosídicos, pero no hidrolizan los enlaces recién formados, conduciendo de este modo la reacción en dirección sintética y no en la catalítica. Un ejemplo es la glicosintasa desarrollada a partir de la  $\beta$ -glucuronidasa de *T. maritima*, empleada para la síntesis de conjugados con enlaces  $\beta$  de los ácidos glucurónico y galacturónico, los cuales son encontrados en paredes celulares de plantas y células bacterianas y entre los glicosaminoglicanos de mamíferos, incluyendo heparina, sulfato de heparán, sulfato de condroitina y ácido hialurónico (Hancock *et al.*, 2006)

### **2.8 $\alpha$ -L-FUCOSIDASA DE *T. maritima***

Los miembros del phylum Thermotogae comprenden un grupo de bacterias extremadamente termofílicas (óptimos de crecimiento de 65 a 90 °C), redondas, no esporuladas, con una envoltura exterior llamada toga. Dentro de las características de las especies del género *Thermotoga* se incluye un extraordinario arreglo de enzimas involucradas en diferentes rutas de utilización de carbohidratos. *T. maritima* MSB8 es capaz de metabolizar muchos carbohidratos simples y complejos incluyendo glucosa, sacarosa, almidón, celulosa y xilano (Connors *et al.*, 2006).

La  $\alpha$ -L-fucosidasa es una de las enzimas identificadas de *T. maritima*, que corresponde al gen TM036 de su código genético (Tarling *et al.*, 2003).

La  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (Uniprot Q9WYE2), pertenece a la familia 29 de las glicosilhidrolasas (GH29). Posee 449 aminoácidos y tiene un peso molecular de 52205 Da. Su rango de pH con mayor actividad es de entre 4.5 y 5.0, su punto isoeléctrico se estima en 6.16 (BRENDA, 2018; Tarling *et al.*, 2003).

Posee una estructura cuaternaria hexamérica (Figura 11) y exhibe un doblez de dos dominios, uno catalítico tipo  $(\beta/\alpha)_8$  y un dominio C-terminal  $\beta$ -sándwich. Los aminoácidos del sitio activo son el nucleófilo Asp<sup>224</sup> y el ácido/base Glu<sup>266</sup> (Sulzenbacher *et al.*, 2004).

En la tabla 6, se muestra la secuencia de la enzima, en naranja están marcados los sitios de unión, en azul los dos residuos del sitio activo.

La enzima presenta estabilidad a solventes como el dimetilformaldehído y el dioxano sin pérdida de actividad hasta el 10 %, y frente a dimetilsulfóxido hasta el 20 % (Ajisaka, 1998).

Dentro de los inhibidores de las fucosidasas se encuentran la desoxifuconojirimicina ( $K_i$   $1 \times 10^{-8}$  M), desoximanojirimicina y sus derivados, que han mostrado ser potentes inhibidores competitivos de la  $\alpha$ -L-fucosidasa del hígado humano pues su estructura química es similar a los sustratos de la enzima (Ho *et al.*, 2006; Tu *et al.*, 2013; Venditti *et al.*, 2010; Winchester *et al.*, 1990).

Comparada con otras fucosidasa microbianas, la fucosidasa de *T. maritima* mantiene una homología del 39 % con la fucosidasa Alfa de *L. casei* BL23, con la fucosidasa de *L. rhamnosus* del 29 % y con la de *L. paracasei*, del 35 % (BRENDA, 2018; NCBI-BLAST, 2018). Hasta la fecha esta enzima es el pariente bacteriano más cercano a las  $\alpha$ -L-fucosidasas de mamíferos (Sulzenbacher *et al.*, 2004; Tarling *et al.*, 2003).



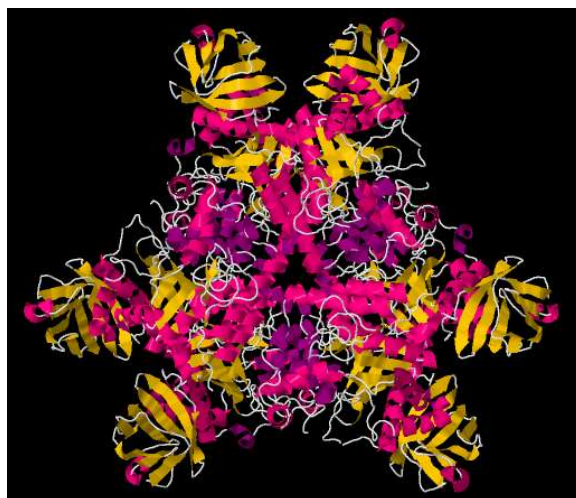


Figura 11. Estructura del hexámero de la fucosidasa de *T. maritima* (RCSB-PDB, 2018).

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*

0	MISMKPRYKP DWESLREHTV PKWFDKAKFG IFIHWGIYSV PGWATPTGEL GKVPMDAWFF
60	QNPYAEWYEN SLRIKESPTW EYHVKTYGEN FEYEKFDLDF TAEKWDPQEW ADLFKKAGAK
120	YVIPTTKHHD GFCLWGTYT DFNSVCRGPK RDLVGLAKA VREAGLRFV YYSGLDWRV
180	TTEPIRYPED LSYIRPNTYE YADYAYKQVM ELVDLYLPDV LWNDMGWPEK GKEDLKYLFA
240	YYYNKHPEGS VNDRWGVPHW DFKTAHYHVN YPGDLPQYKW EFTRGIGLSF GYNRNEGPEH
300	MLSVEQLVYT LVDVVSCKGN LLLNVGPKGD GTIPDLQKER LLGLGEWLRK YGDAIYGTSV
360	WERCCAATED GTEIRFTRKC NRIFVIFLGI PTGEKIVIED LNLSAGTVRH FLTGERLSFK
420	NVGKNLEITV PKKLEETDSI TLVLEAVEE

(BRENDA, 2018)

## 2.9 PURIFICACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS

La necesidad de realizar pruebas para evaluar la actividad biológica del oligosacárido sintetizado, demanda su purificación a partir de los productos de la reacción de síntesis. Para este fin se han reportado diferentes alternativas para purificar oligosacáridos en mezcla con otros carbohidratos. González-Muñoz *et al.* (2013) separaron selectivamente fracciones de hemicelulosas de *Pinus pinaster* mediante diafiltración. Por su parte Kamada *et al.* (2002) purificaron y concentraron azúcares de la raíz de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) mediante ultrafiltración y nanofiltración. Sundekilde *et al.* (2012) separaron oligosacáridos sintetizados en un biorreactor mediante una membrana rotatoria.

Otra alternativa es la extracción con fluidos supercríticos. Montañés *et al.* (2009) fraccionaron una mezcla compleja de oligosacáridos no digeribles mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, basado en el grado de polimerización de sus constituyentes. Se recuperaron tri y tetra sacáridos con un 75 % de pureza y una recuperación del 94 %.

Se ha empleado también la adsorción en carbón activado. Nobre *et al.* (2012), utilizaron una columna de carbón activado y elución con mezclas de etanol / agua para purificar fructooligosacáridos (FOS) presentes en un caldo de fermentación. A partir de mezclas con un 50.6 % de FOS se lograron purificar en un 92.6 % con un 74.5 % de recuperación.

Sen *et al.* (2011), utilizaron etanol en una concentración de 90 % para precipitar oligosacáridos.

Se ha recurrido a la fermentación con levaduras para eliminar los azúcares no deseados en el medio. Zhou *et al.* (2011), purificaron oligosacáridos mediante fermentación con levaduras inmovilizadas.

Algunos investigadores han hecho uso de distintas técnicas cromatográficas para separar oligosacáridos de interés. Cara *et al.* (2012), fraccionaron mediante cromatografía

preparativa de filtración en gel gluco y xilooligosacáridos provenientes de la autohidrólisis del ramaje del árbol de olivo, con grados de polimerización de 7 a 25 unidades. Fu *et al.* (2010), separaron mediante cromatografía líquida de interacción hidrofóbica (HILIC) preparativa 18 oligosacáridos con grados de polimerización entre 2 y 7. Chaturvedi y Sharma (1988), separaron tres oligosacáridos con grados de polimerización del 3 al 5, a partir de leche de cabra utilizando una columna Bio-Gel P4 y una columna C-18 HPLC de fase reversa. Mikkelsen *et al.* (2013) Hidrolizaron una glucomanana de la planta konjac (*Amorphophallus konjac*) con una mananasa de *Trichoderma reesei*. Emplearon cromatografía de exclusión de tamaño para aislar los oligosacáridos producidos, obteniéndolos con una pureza de 86 a 95 % y un rendimiento de 23 % con respecto al sustrato.

### **3 HIPÓTESIS**

Los oligosacáridos sintetizados a partir de la transfucosilación de la lactosa por la  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. maritima* tendrán una estructura y actividad biológica similar a las de los FUCOS presentes en la leche humana.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Producir FUCOS empleando  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. maritima* y evaluar su actividad biológica inmunomoduladora.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar las condiciones de la reacción que favorezcan la síntesis de FUCOS mediante reacciones de transfucosilación
- Purificar e identificar los FUCOS sintetizados.
- Evaluar la actividad biológica inmunomoduladora de los FUCOS sintetizados.

## 5 PLAN DE TRABAJO

El presente trabajo de investigación estará seccionado en tres partes:

1. Síntesis de oligosacáridos fucosilados.
2. Purificación de los FUCOS sintetizados.
3. Evaluación de la actividad biológica de los FUCOS.

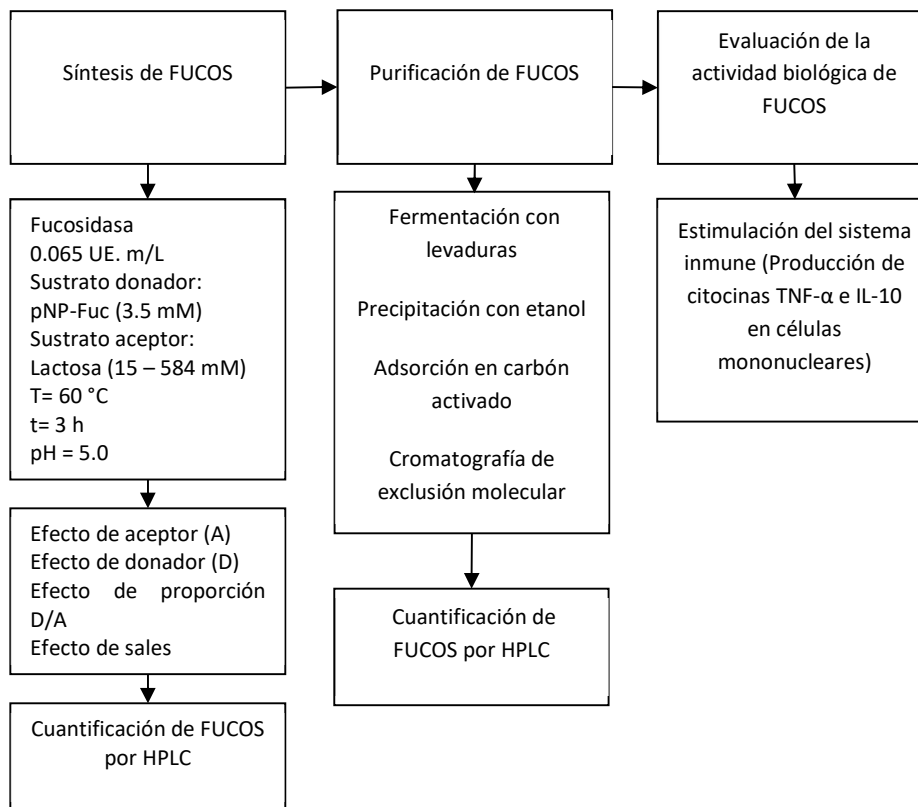


Figura 12. Plan de trabajo

## **6 METODOLOGÍA**

### **6.1. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA FUCOSIDASA**

La pureza de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* fue verificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo con lo descrito por Laemmli (1970) con un gel de poliacrilamida al 10 %. Las proteínas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie R-250. El peso molecular fue estimado con estándares de peso molecular de bajo rango (Bio-Rad, California, E.U.).

### **6.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD FUCOSIDASA**

La actividad fucosidasa fue determinada empleando pNP-Fuc 3.16 (Sigma-Aldrich, E.U.) y 0.065 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (Megazyme, Leinster, Irlanda) en solución amortiguadora de citratos-fosfatos 0.1 M, pH 5 a 60 °C. El pNP liberado fue monitoreado mediante espectrofotometría visible a 410 nm (Shimadzu UV-1600, Kioto, Japón) tomando mediciones cada minuto durante 40 minutos. Una unidad de fucosidasa fue definida como la cantidad de enzima que hidrolizó un  $\mu$ mol de pNP-Fuc por minuto a pH 5 y 60 °C.

### **6.3 ESTABILIDAD DEL SUSTRATO DONADOR A LAS CONDICIONES DE REACCIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)**

Se preparó una solución conteniendo pNP-Fuc (3.5 mM) y lactosa (146 mM) en solución amortiguadora de acetatos 0.1 mM pH 5. Se incubó durante 3 h en un baño de agua a 60 °C, en agitación con barra magnética. El contenido de pNP liberado se cuantificó espectrofotométricamente (410 nm).

## **6.4 SÍNTESIS DE LOS OLIGOSACÁRIDOS POR TRANSFUCOSILACIÓN**

La reacción de síntesis consistió en pNP-Fuc (3.5 mM) como sustrato donador y lactosa (146 mM, Sigma-Aldrich, MO, E.U.) como sustrato aceptor, en una solución amortiguadora de acetatos (0.1 M, pH 5) con 0.065 UE/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La mezcla de reacción fue incubada a 60 °C por 3 h, y alícuotas de la misma fueron tomadas a intervalos regulares para su análisis. Los oligosacáridos sintetizados fueron cuantificados por HPLC como se describe en la sección 6.6. Para cuantificar el pNP liberado, la muestra fue alcalinizada a pH 9.6 con NaOH 3 M, y la absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 410 nm.

### **6.4.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS CARBOHIDRATOS MEDIANTE HPLC**

La cuantificación de los carbohidratos se llevó a cabo mediante HPLC (Lab Alliance, State College, PA, USA) con una columna HC75 H+ 300 x 7.80 mm 8  $\mu$ m (Hamilton, E.U.) a una temperatura de 75 °C y se utilizó como fase móvil agua destilada, desionizada y filtrada, a un flujo de 0.3 mL/min. Se utilizó un detector de dispersión de luz modelo 300S (Kromatek, R.U.) a un flujo de nitrógeno de 62.5 psi, una temperatura en el nebulizador de 10 °C y una temperatura de evaporación de 45 °C.

En el caso particular de la purificación por exclusión molecular en la columna de Bio-Gel P2, los carbohidratos fueron cuantificados por HPLC en la columna Rezex RNO-Oligosaccharide Na<sup>+</sup> 60 x 10 mm, tamaño de partícula 12  $\mu$ m (Phenomenex, E.U.), a las mismas condiciones mencionadas.

#### **6.4.2 CUANTIFICACIÓN DE PNP MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA**

Para cuantificar el pNP liberado en las reacciones, las muestras fueron diluidas 1:100 con un ajuste del pH a 9.5, posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro modelo UV-1600 (Shimadzu, Kioto, Japón) a 410 nm, y se interpoló la absorbancia en una curva patrón de pNP.

#### **6.4.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS FUCOS SINTETIZADOS**

Los FUCOS sintetizados fueron recuperados mediante colectas en HPLC en la columna Rezex RNO-Oligosaccharide Na<sup>+</sup> (Phenomenex, CA, E.U.) a partir de una reacción de síntesis empleando lactosa 146 mM a tres horas de incubación. Las colectas fueron concentradas a 50 °C, y la pureza de los oligosacáridos fue verificada mediante HPLC (Ver sección 6.4.1).

Los oligosacáridos recuperados fueron concentrados a 1 mg/mL y analizados utilizando un sistema de desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo acoplado (MALDI-TOF/TOF) Autoflex-Speed (Brucker, MA, E.U.) con un láser Smart beam II de 1,000 Hz. Se usó una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (5 mg/100 mL de una solución acuosa de acetonitrilo al 50 %), y NaCl 0.01 M fue adicionado como catión dopante para incrementar la sensibilidad de la señal. La muestra fue colocada en una placa objetivo de acero inoxidable, seguida del NaCl dopante y la matriz. La muestra fue secada al vacío previo al análisis de masas. La ionización MALDI-TOF MS vía disociación inducida por colisión (CID) fue llevada a cabo para confirmar el peso molecular de los oligosacáridos. El espectro de masas en tándem (MS/MS) fue obtenido a una energía de colisión de 1 keV con gas argón. Como método complementario para identificar las unidades de monosacáridos presentes en la estructura de los oligosacáridos, se llevó a cabo una hidrólisis ácida de los oligosacáridos



recuperados adicionando 30  $\mu$ L de HCl 2 M incubada a 90 °C por 3 h. El hidrolizado fue analizado por HPLC para identificar los monosacáridos liberados (Ver sección 6.4.1).

#### **6.4.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO ACEPTOR (LACTOSA) EN LA SÍNTESIS DE FUCOS**

Se prepararon reacciones con concentraciones iniciales de lactosa de 15, 58, 146, 292 y 584 mM. En todos los casos se utilizó una concentración inicial de pNP-Fuc 3.5 mM, el medio de dilución fue una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5, la temperatura de incubación fue de 60 °C durante 3 h. Para cada concentración de lactosa se tomaron alícuotas de la reacción para cuantificar el oligosacárido sintetizado mediante HPLC (Ver sección 6.4.1) y el pNP liberado, mediante espectrofotometría (Ver sección 6.4.1)

#### **6.4.5 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO DONADOR (pNP-Fuc) EN LA SÍNTESIS DE FUCOS**

Se prepararon reacciones con concentraciones iniciales de pNP de 3.5 y 10.5 mM y a una misma concentración de lactosa 29 mM. El medio de dilución fue una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5, la temperatura de incubación fue de 60 °C. Para cada concentración de pNP-Fuc se tomaron alícuotas de la reacción para cuantificar el oligosacárido sintetizado mediante HPLC (Ver sección 6.4.1) y el pNP liberado mediante espectrofotometría visible (Ver sección 6.4.1). Este experimento fue repetido a una concentración de lactosa 58 mM.

#### **6.4.6 EFECTO DE LA PROPORCIÓN MOLAR DONADOR/ACEPTOR (D/A) EN LA SÍNTESIS DE FUCOS**

Para estudiar la influencia de la proporción (D/A), los datos de experimentos previos fueron considerados, y se realizaron reacciones adicionales conteniendo pNP-Fuc 24 mM como donador, con lactosa en concentraciones 29, 58 y 584 mM como aceptor; y reacciones conteniendo pNP-Fuc 0.9 mM con lactosa en concentraciones de 146, 292, 584 y 876 mM.

#### **6.4.7 EFECTO DE LA PRESENCIA DE SALES SOBRE LAS REACCIONES DE SÍNTESIS DE FUCOS**

##### **6.4.7.1 Determinación de actividad de agua ( $a_w$ ) de soluciones de $\text{CaCl}_2$ y $\text{NaCl}$**

Basado en lo reportado por Stokes y Robinson (1949), se prepararon soluciones de  $\text{CaCl}_2$  con valores esperados de  $a_w$  de 0.8956 a 0.9956. Para ello, se prepararon soluciones de  $\text{CaCl}_2$  0.5, 0.9, 1.1 y 2.2 mM en solución amortiguadora de acetatos (0.1 M, pH 5) y su  $a_w$  fue determinada en un equipo Aqualab 4TE (Decagon, Washington, E.U.) a 25 °C. Posteriormente, soluciones de  $\text{NaCl}$  fueron preparadas con valores de  $a_w$  equivalentes, empleando concentraciones de  $\text{NaCl}$  0.5, 0.8, 1.1 y 2.2 mM en solución amortiguadora de acetatos (0.1 M, pH 5) y su  $a_w$  fue verificada.

##### **6.4.7.2 Efecto de la concentración de $\text{CaCl}_2$ y $\text{NaCl}$ en la actividad fucosidasa (hidrolítica)**

Volúmenes de 450  $\mu\text{L}$  de una solución de pNP-Fuc 3.5 mM y 50  $\mu\text{L}$  de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* fueron empleados, ambos preparados en soluciones con diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaCl}$  descritas en la sección anterior. A continuación, se siguió el procedimiento descrito en la sección 6.2 para determinar la actividad fucosidasa (hidrolítica) de cada una de

estas reacciones. La concentración de la sal a la cual se encontró la mayor actividad enzimática, fue empleada en ensayos de transfucosilación.

### **6.4.7.3 Efecto del CaCl<sub>2</sub> en la actividad hidrolítica y de transfucosilación durante las reacciones de síntesis de FUCOS**

Volúmenes de 450 µL de pNP-Fuc 3.5 mM y lactosa en dos diferentes concentraciones (58 y 146 mM) fueron usados, más 50 µL de α-L-fucosidasa de *T. maritima*. Estas reacciones fueron producidas en una solución amortiguadora de acetatos (0.1 M, pH 5) tanto en ausencia como en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1.1 M. La mezcla de reacción fue incubada a 60 °C por 3 h, y alícuotas fueron tomadas a intervalos regulares. Los FUCOS sintetizados fueron cuantificados por HPLC (Ver sección 6.4.1)

## **6.5 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LOS FUCOS**

### **6.5.1 PURIFICACIÓN POR FERMENTACIÓN CON LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*)**

#### 6.5.1.1 Hidrólisis de lactosa

El primer paso de esta metodología consistió en hidrolizar la lactosa presente en la reacción de síntesis, con β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, para así obtener galactosa y glucosa, sustratos metabolizables por *Saccharomyces cerevisiae*.

A 5 mL de la reacción de síntesis se le adicionaron 100 µL de una suspensión 40 mg/mL de β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, MO, E.U.) preparada en buffer de acetatos 0.1 M pH 5 y se incubó durante 24 h a 60 °C. La disminución en la concentración de lactosa se verificó mediante su cuantificación por HPLC (Ver sección 6.4.1).

#### 6.5.1.2 Preparación de inóculo y fermentación

Se preparó un medio de cultivo disolviendo en agua destilada 1 % de glucosa, 0.2 % de extracto de levadura, 0.2 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.05 % de  $\text{MgSO}_4$ . Se inocularon 50 mL de este medio con dos asadas de un cultivo de *S. cerevisiae* almacenado en agar papa dextrosa a 4 °C. El medio inoculado se incubó durante 24 horas a 30 °C y posteriormente se centrifugó a 7000 rpm por 15 min. La biomasa fue lavada dos veces con buffer de acetatos (0.1 M pH 5), con una centrifugación sucesiva a las condiciones antes mencionadas.

Con el botón celular (0.74 g de biomasa húmeda), se inocularon 5 mL de la reacción previamente tratada con  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*. Se incubó durante 168 horas con recambios de levadura cada 24 horas. Después de este tiempo, la reacción fue centrifugada, filtrada y analizada por HPLC (Ver sección 6.4.1).

#### 6.5.2 PURIFICACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON ETANOL

Se realizó precipitación con etanol basada en la metodología de Sen *et al.* (2011). Se tomaron 0.5 mL de la reacción tratada previamente con lactasa y se mezclaron con 4.5 mL de etanol absoluto. Se incubó en agitación orbital (60 rpm) por 16 horas a 25 °C. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min, para separar el sobrenadante y el precipitado. En el caso del sobrenadante, se evaporó el etanol en baño maría a 60 °C hasta un volumen de 0.5 mL. Por su parte, para el precipitado se evaporó el etanol residual y se resuspendió en 0.5 mL de agua desionizada. Ambas fases se analizaron por HPLC.

#### 6.5.3 PURIFICACIÓN CON CARBÓN ACTIVADO

Se tomó 1 mL de la reacción de síntesis previamente tratada con  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Posteriormente se mezcló con 0.3 g de carbón activado y se agitó durante

30 minutos. Se filtró en papel Whatman No. 1 y se lavó con 200 mL de agua desionizada para arrastrar monosacáridos. Posteriormente el carbón (reteniendo al oligosacárido) se mezcló con 60 mL de una solución etanol/ agua 1:1 y se agitó suavemente con una barra magnética durante 30 minutos para desprender al oligosacárido. La mezcla se filtró en papel Whatman No. 1. El permeado se concentró al volumen original de 1 mL por evaporación a 60 °C en baño maría y se analizó por HPLC (Ver sección 6.4.1).

#### **6.5.4 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR**

El método de purificación por cromatografía de exclusión molecular se basó en la metodología de Sosa-Ancona (2012), con algunas modificaciones. Se utilizó como fase estacionaria gel de poliacrilamida Bio-Gel P-2 (Bio-Rad, CA, E.U.) empacado en una columna de vidrio (altura de 90 cm y diámetro de 1.5 cm).

La fase móvil consistió en agua desionizada y filtrada a un flujo de 16.8 mL/h. La separación se realizó a temperatura ambiente.

Se cargaron en la columna 5 mL de la reacción de una reacción de síntesis (lactosa 584 mM, pNP-F 3.5 mM, 3 h, 60 °C, en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5). Se utilizó un colector de fracciones (Modelo 2110, Bio-Rad, CA, E.U.) y se obtuvieron fracciones de 2.8 mL. Los carbohidratos presentes en las colectas se cuantificaron mediante HPLC (Ver sección 6.4.1). Las colectas en las que se encontró el oligosacárido puro, fueron concentradas por evaporación en baño maría a 60 °C a un volumen de 500 µL. El contenido de oligosacárido se cuantificó, y su pureza fue verificada mediante HPLC (Ver sección 6.4.1).

## **6.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA INMUNOMODULADORA DEL OLIGOSACÁRIDO SINTETIZADO**

De acuerdo con los protocolos adoptados a nivel mundial, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron obtenidas mediante un gradiente de densidad discontinuo como se indica a continuación:

Se obtuvieron muestras de sangre periférica, de tres voluntarios sanos, del Banco de Sangre del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Se diluyó la sangre 1:1 con solución salina fisiológica (SS), se colocaron 30 mL de sangre diluida sobre 10 mL de Ficoll (Lymphoprep; 1.077 g/ml; Nycomed, Oslo, Noruega) y se centrifugó durante 40 min a 2500 rpm (sin freno).

Se lavó el paquete celular obtenido dos veces con SS para la eliminar plaquetas. Las células obtenidas fueron resuspendidas en 6 mL de SS, se tomaron 10  $\mu$ L de esta suspensión y se mezclaron con 10  $\mu$ L de solución de azul de tripano para realizar el conteo de células en una cámara de Neubauer.

Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en SS a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL.

Las células mononucleares fueron incubadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) en una placa de polipropileno de 24 pozos, cada pozo conteniendo  $1 \times 10^6$  células, y diferentes estímulos de acuerdo a lo indicado en la tabla 7.

*Tabla 7. Estímulos y controles ensayados en células mononucleares de sangre periférica.*

Estímulo	Descripción	Tiempo de Incubación (h)
FU 10	Incubación de células con FUCOS 10 µg/mL	24
FU 50	Incubación de células con FUCOS 50 µg/mL	24
FU 100	Incubación de células con FUCOS 100 µg/mL	24
FU+LPS	Preincubación de células con FUCOS 100 µg/mL por 24 h + incubación con LPS 0.1 µg/mL 24 h adicionales. La finalidad de este estímulo es mostrar el efecto protector de FUCOS frente a una posterior estimulación con LPS (Control LPS24)	48
LPS+FU	Preincubación de células con LPS 0.1 µg/mL por 24 h + incubación con FUCOS 100 µg/mL 24 h adicionales. La finalidad de este estímulo es mostrar el efecto terapéutico de FUCOS adicionados tras una estimulación previa con LPS (Control LPS48)	48
<i>Controles</i>		
S/E	Sin estímulo, incubación de células con agua desionizada estéril.	24
FU+PMB	Incubación de células con una mezcla de FUCOS 100 µg/mL + Polimixina B 500 µg/mL. Dicha mezcla fue incubada durante una hora a 37 °C antes de estimular las células. La finalidad de este control es identificar la presencia de LPS en los FUCOS empleados, pues la PMB lo neutraliza. Si no hay LPS en las muestras, la producción de citocina para este control debe ser	24

igual al estímulo FU100, de otro modo es necesario normalizar los valores como medida correctiva.

LPS+PMB	Incubación de células con una mezcla de LPS 1 µg/mL + Polimixina B 500 µg/mL. Dicha mezcla fue incubada durante una hora a 37 °C antes de estimular las células. La finalidad de este control es asegurarse de que la PMB sea eficiente abatiendo la respuesta inducida por LPS al 100 %. Si la PMB trabaja de manera óptima, el control LPS+PMB debe ser negativo.	24
PMB	Polimixina-B 500 µg/mL. La finalidad de este control es asegurarse de que la PMB empleada no tenga presencia de agentes activadores de las células. Este control debe ser negativo.	24
LPS24	Lipopolisacárido 0.1 µg/mL. Control positivo, estimula la producción de citocinas.	24
LPS48	Lipopolisacárido 0.1 µg/mL (Control positivo para el estímulo LPS+FU)	48
LAC	Lactosa 2 µg/mL (Para normalizar la posible respuesta asociada a la lactosa residual en los FUCOS)	24

---

Se recolectaron los sobrenadantes y se analizó la concentración de las citocinas producidas, TNF- $\alpha$  e IL-10 por el método de ELISA (BD Pharmingen, CA, E.U.).



## **6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados son reportados como la media con la desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando el software SPSS versión 19.0 para Windows (IBM, New York, E.U.) para realizar un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LA FUCOSIDASA

Como puede observarse en la figura 13, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (Megazyme®) empleada en este trabajo muestra una alta pureza, con un peso molecular de 50.7 kDa. Este resultado es similar a lo reportado por Lezyk *et al.* (2016) y Zeuner *et al.* (2018) quienes mencionaron que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* posee un peso molecular de 50 a 52 kDa.

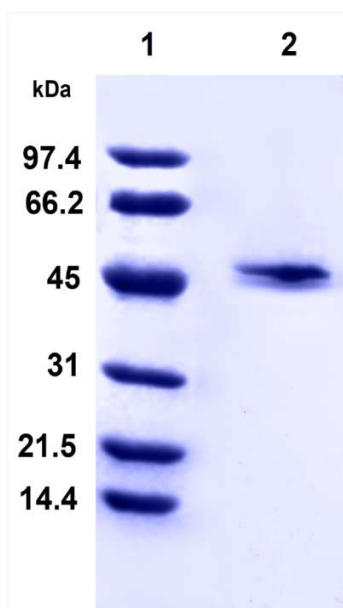


Figura 13. Gel de electroforesis de la  $\alpha$ -L-fucosidasa recombinante de *T. maritima*. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2,  $\alpha$ -L-fucosidasa.

### 7.2 ESTABILIDAD DEL SUSTRATO DONADOR A LAS CONDICIONES DE REACCIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)

Es importante asegurarse de que al tiempo (3 h) y temperatura (60 °C) de la reacción, el pNP-Fuc no se auto-hidrolice, para que pueda participar íntegramente en la reacción enzimática. Para ello se incubó pNP-Fuc 3 mM, con la adición de lactosa 146 mM y durante 3 h (para igualar la composición de una de las reacciones de síntesis de oligosacárido) y en ausencia

de la enzima para descartar el efecto de la actividad enzimática sobre la hidrólisis del pNP-Fuc. En la figura 14 se muestra que la liberación de pNP al cabo de 3 h a 60 °C fue de 0.04 mM, lo cual equivale al 1.4 % del total del pNP-Fuc, por tanto, se considera que las condiciones de incubación no tienen un impacto considerable sobre este sustrato y se pueden utilizar para los siguientes experimentos.

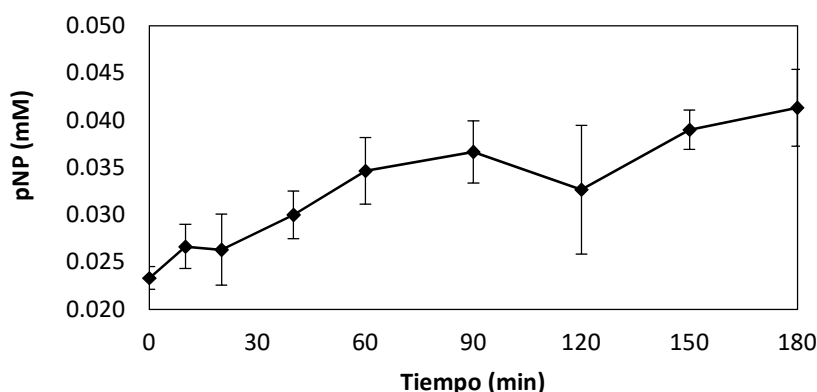


Figura 14. pNP liberado en función del tiempo de incubación a 60 °C en presencia de lactosa 146 mM.

### 7.3 SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS

La figura 15 muestra una cinética de una reacción de transfucosilación típica, en este caso los datos corresponden a una concentración de lactosa de 292 mM, pNP-Fuc 3.5 mM en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 5, a 3 h por 60 min. Reacciones similares con otras concentraciones de lactosa utilizadas tuvieron un comportamiento similar. Como puede observarse, los oligosacáridos fueron sintetizados hasta una concentración máxima, que fue alcanzada a los 180 min. El sustrato donador, pNP-Fuc, fue hidrolizado durante este tiempo mientras parte de la fucosa fue transferida a la lactosa. La fucosa que no fue transferida se acumuló en el medio como fucosa libre. Lezyk *et al.* (2016) estudiaron las reacciones de

transfucosilación con  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, en una reacción a pH 7.0 utilizando pNP-Fuc 25 mM y lactosa 100 mM por 70 minutos a 30 °C, y un comportamiento similar fue observado.

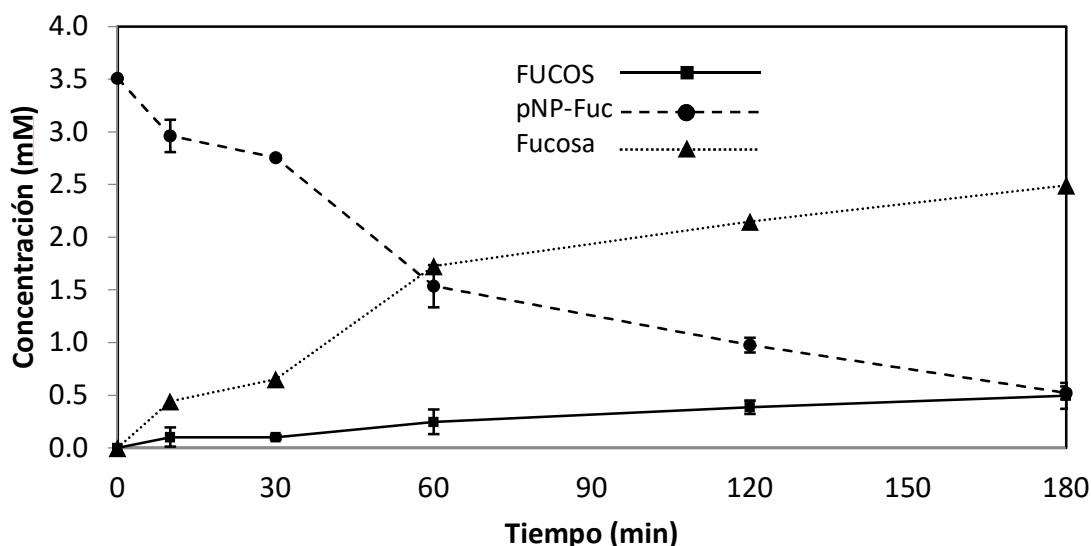


Figura 15. Cinética de transfucosilación catalizada por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*. La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 292 mM como aceptor en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M a pH 5 por 3 h a 60 °C.

#### 7.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS OLIGOSACÁRIDOS SINTETIZADOS

Los oligosacáridos sintetizados fueron aislados de la mezcla de reacción por HPLC y sometidos a un análisis por MALDI-TOF MS. En el espectro MS (figura 16A), la señal más fuerte ( $m/z$  511.008) corresponde a la masa de la fucosil-lactosa más sodio, y como se puede ver en el espectro MS/MS (figura 16B) su fragmentación libera dos hexosas y una unidad de fucosa ( $[2\text{Hex} + \text{Fuc} + \text{Na}]^+$ ). La identidad de estas unidades fue confirmada por HPLC. Primero, en la figura 17A se muestra el cromatograma de los oligosacáridos purificados. Los oligosacáridos que fueron previamente purificados se sometieron a una hidrólisis ácida para

liberar los monosacáridos que forman parte de su estructura. Las unidades de monosacárido liberadas de su estructura fueron identificadas como glucosa, galactosa y fucosa por medio de HPLC en la columna HC75 H+ (figura 17B). Los datos del espectro MS/MS junto con la hidrólisis ácida/HPLC revelaron que el oligosacárido sintetizado corresponde a fucosil-lactosa. Por otra parte, oligosacáridos de mayor peso molecular fueron también sintetizados como se muestra en la figura 16A, por ejemplo, la señal a  $m/z$  701.318 podría corresponder a  $[Difucosil-lactosa + 3Na - 3H]^+$ , pero análisis adicionales se necesitan para confirmar su identidad.

El uso de espectrometría de masas para analizar FUCOS ha sido empleado por otros autores. Chin *et al.* (2016) emplearon MALDI-TOF MS para identificar 2'-fucosil-lactosa parcialmente purificada, producida por una cepa de *E. coli* modificada genéticamente, y encontraron una fucosa y dos hexosas más sodio en la estructura del trisacárido producido.

Otros autores han empleado la fucosidasa de *T. maritima* para la síntesis de FUCOS y han reportado diferentes isómeros. Lezyk *et al.* (2016) emplearon la fucosidasa de *T. maritima* para transferir fucosa de pNP-Fuc a lactosa. Según estos autores, los principales compuestos de síntesis fueron 2'-fucosil-lactosa y el producto de autocondensación Fuc-Fuc-pNP, identificados por cromatografía de intercambio aniónico de alto desempeño (HPAEC-PAD) y resonancia magnética nuclear (RMN). En ambos casos, se formaron enlaces  $\alpha$ -1,2. En el presente trabajo, la misma enzima y sustratos fueron empleados, lo que sugiere la formación de un enlace  $\alpha$ -1,2, por lo cual la identidad del compuesto podría ser 2'-fucosil-lactosa. Por otro lado, a las condiciones de reacción utilizadas en el presente trabajo, no se encontró ningún producto de autocondensación del pNP-Fuc. Osanjo *et al.* (2007) estudiaron la capacidad de transfucosilación de fucosidasa de *T. maritima*, empleando pNP-Fuc como donador y pNP-Gal como aceptor. El producto principal de esta transferencia fue Fuc-Gal-

pNP con un enlace  $\alpha$ -1,2, seguido por el isómero  $\alpha$ -1,6 de este compuesto; mientras que al utilizar pNP-Fuc como único sustrato, solamente fueron formados enlaces  $\alpha$ -1,3. Se ha reportado que FUCOS de la leche humana, como 2'-fucosil-lactosa así como su isómero  $\alpha$ -1,3 (3-fucosil-lactosa), ejercen actividades como inmunomoduladores, prebiótico, y anti-infeccioso; por ejemplo, inhiben la unión de *C. jejuni*, *E. coli* enteropatógena, y *P. aeruginosa*, entre otros a las células humanas (Sotgiu *et al.*, 2006; Bode, 2012; Weichert *et al.* 2013).

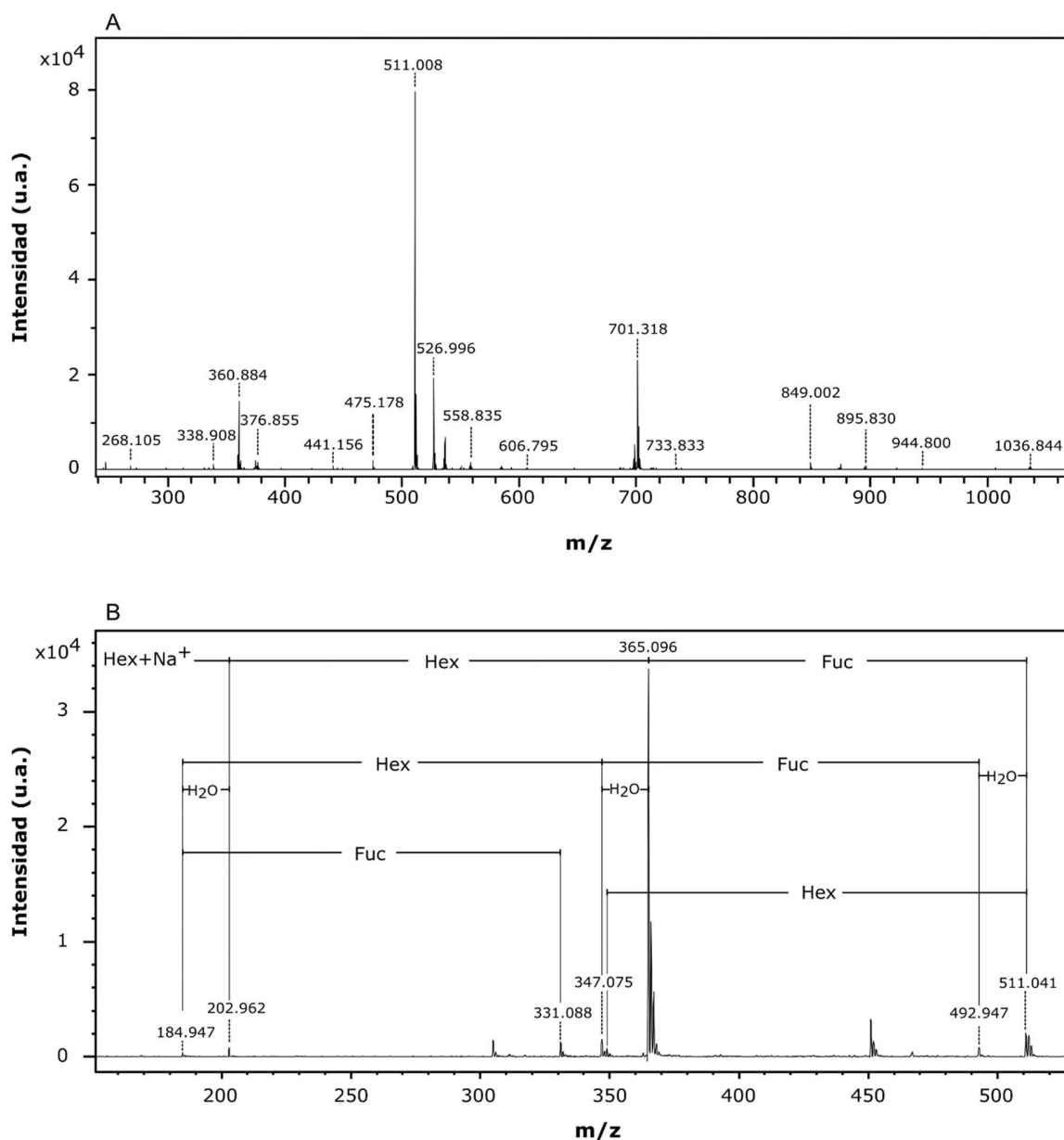


Figura 16. Análisis MALDI-TOF MS de oligosacáridos purificados: (A) Espectro MS de oligosacáridos purificados, (B) Espectro MS/MS del oligosacárido principal como ion precursor ( $m/z$  511.008).

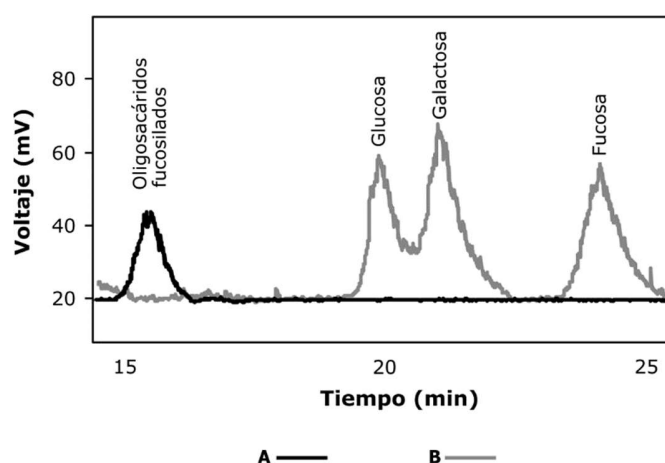


Figura 17. Cromatogramas en la columna HC75 H+ de (A) los FUCOS purificados, y (B) los monosacáridos obtenidos por hidrólisis de los oligosacáridos purificados.

### 7.5 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO ACEPTOR (LACTOSA) EN LA SÍNTESIS DE FUCOS

Como se observa en la figura 18, la síntesis de FUCOS aumentó cuando la concentración inicial del sustrato aceptor fue incrementada. La mayor concentración de FUCOS fue obtenida utilizando lactosa 584 mM ( $\alpha = 0.05$ ) con un rendimiento de 25.1 %. Este rendimiento es comparable con lo reportado por Ajisaka *et al.* (1998) quienes emplearon la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Penicillium multicolor* para producir Fuc( $\alpha$ 1,3)GlcNAc con un rendimiento del 49 %. Asimismo, Osanjo *et al.* (2007) reportaron que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* sintetizó Fuc( $\alpha$ 1,2/6)Gal-pNP con un rendimiento del 31 %. Recientemente, Liu *et al.* (2016) reportaron que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Emericella oligotrophica* fue capaz de catalizar la transferencia de fucosa a partir de pNP-Fuc hacia el grupo hidroxilo 7 de la 4-metil-umbeliferona con un rendimiento del 15 %. Además, Petschacher y Nidetzky (2016) reportaron que típicamente, las fucosidasas nativas pueden alcanzar rendimientos de transfucosilación del 30 al 40 %. Por otra parte, se encontró que al incrementar la



concentración de lactosa de 584 mM a 876 mM, el incremento en la síntesis de FUCOS ( $0.987 \text{ mM} \pm 0.04$ ) no fue significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

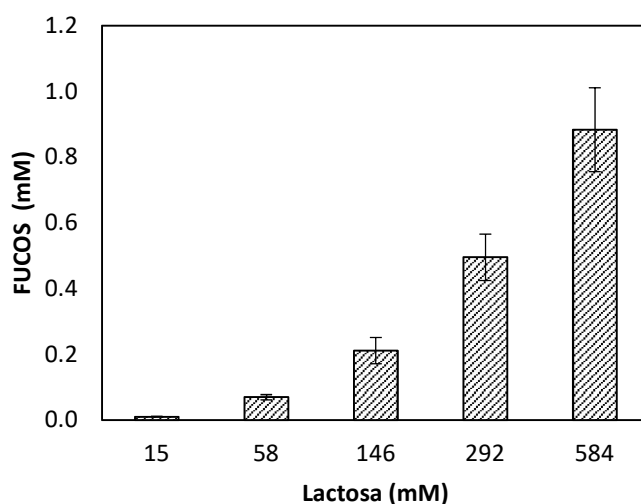


Figura 18. Efecto de la concentración de lactosa como sustrato donador en la síntesis de FUCOS empleando pNP-Fuc 3.5 mM.

La velocidad de síntesis de los FUCOS se muestra en la tabla 8. Conforme la concentración de lactosa (el sustrato aceptor) es incrementada, la velocidad de síntesis se incrementa e incluso cambia de orden de magnitud. La velocidad de síntesis mayor fue encontrada a una concentración de lactosa de 584 mM ( $\alpha = 0.05$ ). La relación entre una alta concentración de lactosa y una alta velocidad de síntesis de oligosacáridos puede deberse a que la lactosa que participa en la reacción remueve rápidamente a la fucosa del centro activo del complejo enzima sustrato, dejando a la  $\alpha$ -L-fucosidasa disponible para aceptar una nueva molécula de pNP-Fuc. Lo anterior fue reportado por Warmerdam *et al.* (2013), quienes utilizaron  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido como sustrato donador y lactosa como aceptor.

Por otra parte, la concentración inicial de sustrato aceptor no influyó en la velocidad de hidrólisis del pNP-Fuc (tabla 8) ( $\alpha = 0.05$ ), y sus valores se mantienen dentro del mismo orden de magnitud, lo cual puede indicar que la enzima actúa sobre el sustrato a la misma velocidad no importando la concentración de sustrato aceptor. Mangas-Sánchez y Adlercreutz (2015) estudiaron las velocidades de hidrólisis y transglicosilación de cinco glucosidasas. Encontraron que al incrementar la concentración de sustrato (celobiosa), la velocidad de hidrólisis para la glucosidasa de *Aspergillus niger* disminuyó, mientras que, para la glucosidasa de almendras, la velocidad de hidrólisis aumentó al incrementar la concentración de sustrato (celobiosa). Warmerdam *et al.* (2013) estudiaron la influencia de diferentes carbohidratos en la hidrólisis del sustrato sintético oNP-G, por diferentes galactosidasas. Ellos reportaron que la velocidad de hidrólisis para el oNP-G se incrementó con el uso de carbohidratos pequeños como rafinosa, trehalosa y sacarosa, mientras que la presencia de solutos inertes en la reacción, como dextrano y sarcosina no tuvieron influencia en la actividad enzimática. Esto muestra que el sustrato aceptor afecta la velocidad de hidrólisis durante una reacción de transglicosilación, y esto depende de la especie y el tipo de glicosidasa.

Tabla 8. Efecto de la lactosa como sustrato aceptor en las velocidades ( $v_o$ ) de síntesis de los FUCOS y en la hidrólisis de pNP-Fuc\*.

Concentración de lactosa (mM)	Velocidad de síntesis (mM/min)	Velocidad de hidrólisis (mM/min)
15	$0.8 \pm 0.3 \times 10^{-4}$	$0.035 \pm 0.007$
58	$9.0 \pm 1.0 \times 10^{-4}$	$0.035 \pm 0.014$
146	$14.5 \pm 6.5 \times 10^{-4}$	$0.032 \pm 0.017$
292	$38.0 \pm 2.0 \times 10^{-4}$	$0.031 \pm 0.003$
584	$67.5 \pm 9.5 \times 10^{-4}$	$0.033 \pm 0.016$

\*Concentración de pNP-Fuc 3.5 mM

Al comparar las velocidades, se pudo observar que un incremento en la concentración de lactosa modificó el equilibrio síntesis/hidrólisis favoreciendo la transfucosilación, esto es debido a que al haber mayor cantidad de lactosa aumentan las probabilidades de la transferencia de la transferencia de fucosa sobre este sustrato aceptor. Se consideró también el efecto del cambio en la  $a_w$ , (ocasionado por el incremento en la lactosa), debido a que se ha reportado que influye sobre la tranfucosilación (Zeuner *et al.*, 2014). Como se observa en la tabla 9, el descenso en la  $a_w$  fue de 0.99 a 0.98, el cual es muy poco como para ejercer un efecto importante sobre la transfucosilación de acuerdo a lo reportado por otros autores. Michalak *et al.* (2014) reportaron que al incrementar la concentración de lactosa de 1.3 % a 4 %, el rendimiento de tranfucosilación aumentó en más del 47 %, sin embargo, el cambio en  $a_w$  no disminuyó de 1. En conclusión, la transfucosilación estuvo más ligada a la concentración de lactosa que al descenso en la  $a_w$  ocasionado por este sustrato.

Tabla 9. Efecto de la concentración de sustrato aceptor en la actividad acuosa ( $a_w$ )

Lactosa (mM)	pNP-Fuc (mM)	$a_w$
15	3.5	0.9947
58	3.5	0.9940
146	3.5	0.9934
292	3.5	0.9916
584	3.5	0.9874

## 7.6 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO DONADOR (PNP-FUC) EN LA SÍNTESIS DE FUCOS

Se llevaron a cabo reacciones de síntesis a un tiempo de 3 h a una misma concentración inicial de lactosa y variando la concentración inicial de pNP-Fuc. Como se observa en la figura 19A (concentración de lactosa 29 mM), el incremento en la concentración de pNP-Fuc de 3.5 a 10.5 mM, no tuvo un efecto sobre la cantidad del oligosacárido sintetizado, y este mismo comportamiento se observa al utilizar una concentración mayor de lactosa (58 mM), como puede apreciarse en la figura 19B.

Gosling *et al.* (2011) estudiaron la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* utilizando lactosa como sustrato donador y sacarosa como sustrato aceptor. Ellos observaron una influencia del sustrato donador en la formación de oligosacáridos por transgalactosilación principalmente cuando las concentraciones de aceptor fueron bajas, pero cuando las concentraciones de

aceptor fueron altas, el donador tuvo un menor efecto en la transgalactosilación. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los autores mencionados, sugiriendo un efecto combinado del donador y aceptador en la transfucosilación, por lo tanto, a las concentraciones de lactosa empleadas (29 y 58 mM) el incremento en la concentración de pNP-Fuc de 3.5 a 10 mM no incrementó la velocidad de síntesis. Es posible que, a menores concentraciones de lactosa, el sustrato donador pudiera tener un efecto sobre la velocidad de síntesis. Por otra parte, se comprueba nuevamente que a mayor concentración de lactosa se obtiene una mayor síntesis de FUCOS.

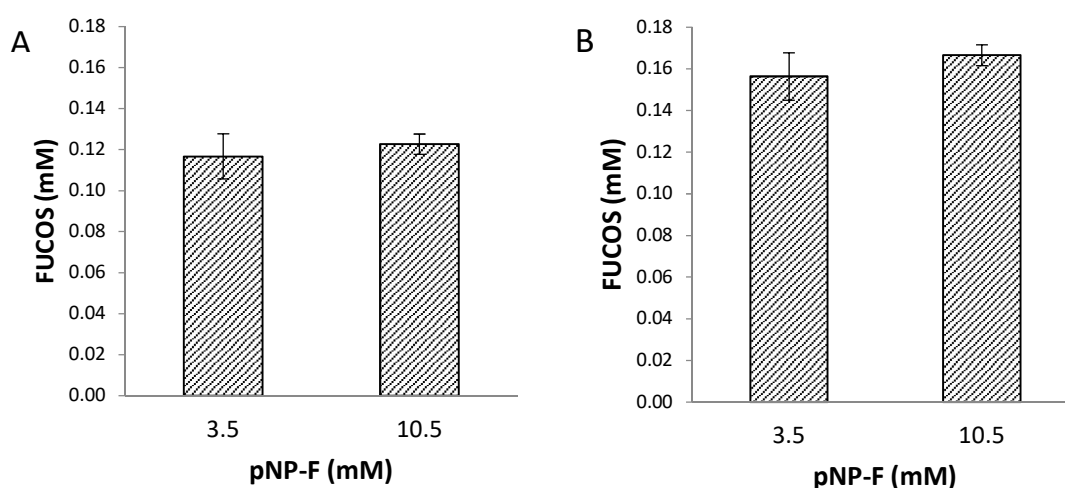


Figura 19. Efecto de la concentración de pNP-Fuc como sustrato donador en la síntesis de FUCOS usando diferente concentración inicial de lactosa: A) lactosa 29 mM, B) lactosa 58 mM.

## 7.7 EFECTO DE LA PROPORCIÓN MOLAR DONADOR/ACEPTOR (D/A) EN LA SÍNTESIS DE FUCOS

El efecto de la proporción donador/aceptor (D/A) en la síntesis de FUCOS se muestra en la tabla 10, y como puede observarse, conforme esta proporción disminuye, la síntesis es incrementada a cualquiera de las concentraciones de sustrato donador estudiadas. A una proporción D/A de 0.001 se obtuvo el máximo rendimiento (32.5 %), el cual es hasta la fecha el rendimiento de transfucosilación más alto reportado para la  $\alpha$ -L-fucosidasa nativa de *T. maritima*. Este resultado puede compararse con el de Lezyk *et al.* (2016), quienes emplearon la misma fucosidasa y reportaron rendimientos de transfucosilación de 1 y 6.4 % al utilizar proporciones D/A de 0.8 y 0.25 respectivamente. De manera similar, Suwasono y Rastall (1998), reportaron el rendimiento más alto a la menor proporción D/A, cuando utilizaron  $\alpha$ -1,2-manosidasa de *Aspergillus phoenicis*, empleando manosa como donador y maltosa como aceptor; además Zeuner *et al.* (2014) reportaron que bajas proporciones D/A permiten incrementar el rendimiento de la síntesis aún si la cantidad de agua en el medio es alta (55.5 M). En resumen, puede decirse que cuando las glicosidasas son empleadas para transglicosilación, la transferencia es favorecida si la proporción D/A es pequeña.

Tabla 10. Efecto de la proporción D/A en la síntesis de FUCOS

pNP-Fuc <sup>a</sup> (mM)	Lactosa <sup>b</sup> (mM)	Proporción D/A	FUCOS (mM)	Rendimiento (%)
24	29	0.828	0.018 ± 0.002	0.08 ± 0.01
24	58	0.414	0.025 ± 0.004	0.10 ± 0.01
24	584	0.041	0.751 ± 0.034	3.13 ± 0.14
3.5	15	0.233	0.011 ± 0.001	0.31 ± 0.01
3.5	58	0.06	0.07 ± 0.004	1.99 ± 0.11
3.5	146	0.024	0.212 ± 0.020	6.04 ± 0.57
3.5	292	0.012	0.496 ± 0.036	14.13 ± 1.01
3.5	584	0.006	0.883 ± 0.640	25.16 ± 1.83
0.9	146	0.006	0.008 ± 0.002	0.85 ± 0.17
0.9	292	0.003	0.081 ± 0.001	9.26 ± 0.11
0.9	584	0.002	0.190 ± 0.012	21.54 ± 1.33
0.9	876	0.001	0.286 ± 0.010	32.47 ± 1.06

<sup>a</sup> Sustrato donador, <sup>b</sup> Sustrato aceptor

### 7.8 EFECTO DE LA PRESENCIA DE SALES SOBRE LAS REACCIONES DE SÍNTESIS DE FUCOS

Al reducir la actividad de agua ( $a_w$ ), debido a la presencia de sales, hay una menor proporción de moléculas de agua disponibles para participar como nucleófilo en la reacción de hidrólisis, por lo que el equilibrio termodinámico de la reacción favorece la síntesis de FUCOS por transfucosilación (Vetere *et al.*, 1997), además se ha reportado que algunos cationes juegan

un papel importante en la estructura de muchas enzimas incrementando su actividad catalítica (Bronnenmeier *et al.*, 1995). Por ello se emplearon diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> y NaCl para modificar la a<sub>w</sub> de los sistemas de reacción y evaluar su impacto sobre la actividad hidrolítica y de transfucosilación de la α-L-fucosidasa de *T. maritima*.

### 7.8.1 DETERMINACIÓN DE a<sub>w</sub> DE LAS SOLUCIONES DE CaCl<sub>2</sub> Y NaCl

Las concentraciones de las sales empleadas y su impacto sobre la a<sub>w</sub> se presentan en la tabla 11; como se puede observar, la a<sub>w</sub> fluctuó entre 0.8956 y 0.9956. Se evaluó el efecto de la adición de sales sobre la a<sub>w</sub> porque se ha visto que esta propiedad influye sobre la funcionalidad de las enzimas, por ejemplo, algunas glicosidasas han mostrado su mayor capacidad de transglicosilación a valores de a<sub>w</sub> entre 0.44 y 0.99 (Bridiau *et al.*, 2010; Cruz-Guerrero *et al.*, 2006; Hansson y Adlercreutz, 2001; Vera *et al.*, 2017; Zeuner *et al.*, 2014).

Tabla 11. Actividad de agua (a<sub>w</sub>) de las soluciones de CaCl<sub>2</sub> y NaCl

CaCl <sub>2</sub> (M)	NaCl (M)	a <sub>w</sub>
0.0	0.0	0.9956 ± 0.0002
0.5	0.5	0.9808 ± 0.0005
0.9	0.8	0.9672 ± 0.0004
1.1	1.1	0.9581 ± 0.0004
2.2	2.2	0.8956 ± 0.0006

Las sales se utilizaron de manera independiente una de la otra y se prepararon en una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 5 y se mantuvieron a 25 °C.



### 7.8.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE $\text{CaCl}_2$ Y $\text{NaCl}$ EN LA ACTIVIDAD FUCOSIDASA (HIDROLÍTICA)

La actividad hidrolítica (AH) de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* fue cuantificada a diferentes valores de  $a_w$ , conseguidos mediante la presencia de diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{NaCl}$  (indicados en la tabla 11). Como puede observarse en la figura 20, al disminuir la  $a_w$ , hubo un aumento en la AH. En presencia de  $\text{CaCl}_2$ , la mayor AH fue alcanzada a una  $a_w$  de 0.9581 ( $\text{CaCl}_2$  1.1 M) lo cual implicó un incremento en actividad del 138 % comparada con el control; en el caso de  $\text{NaCl}$ , al disminuir la  $a_w$  a 0.9672 ( $\text{NaCl}$  0.8 M) la AH aumentó un 67 %. También se observó que cuando la  $a_w$  alcanzó valores de 0.9581 en el caso de  $\text{NaCl}$  y de 0.8956 en el caso de  $\text{CaCl}_2$ , la AH comenzó a disminuir, esto puede deberse al fenómeno de precipitación salina, que ocurre en soluciones acuosas de alta fuerza iónica, lo cual minimiza la repulsión electrostática de proteínas cargadas, causando su precipitación (Möller *et al.* 2012). Además, se pudo observar que a valores de  $a_w$  de 0.8956, 0.9581 y 0.9672, la AH fue mayor en presencia de  $\text{CaCl}_2$  comparado con  $\text{NaCl}$  ( $\alpha=0.05$ ), por lo cual, en estos casos la actividad fucosidasa mostró dependencia del tipo de sal empleada. Dados estos resultados, puede decirse que la actividad hidrolítica más alta de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* fue obtenida en presencia de  $\text{CaCl}_2$  1.1 M ( $a_w$  of 0.9581).

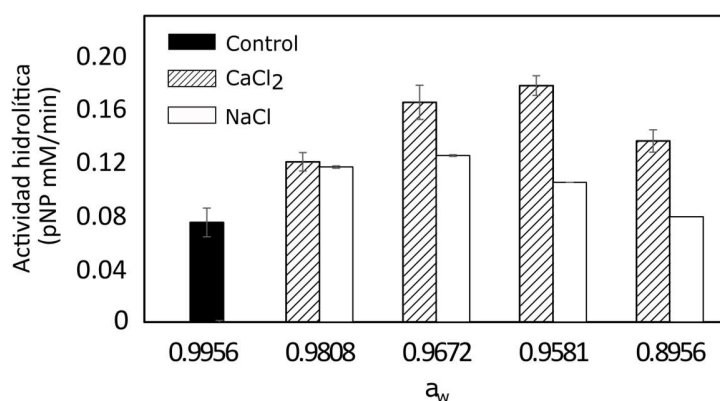


Figura 20. Actividad hidrolítica a diferentes valores de actividad de agua. Reacciones catalizadas por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, empleando pNP-Fuc 3.5 mM como sustrato donador en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, pH 5, a 60 °C.

Diversos grupos de investigación han observado que la adición de sales inorgánicas en diferentes concentraciones favorece la estabilidad de la estructura tridimensional de la enzima y su actividad, y esto puede deberse a dos causas: (i) debido al efecto de la sal sobre la  $a_w$  y (ii) debido a la interacción específica del catión con la estructura de la proteína (Valivety *et al.*, 1992, Vieille y Zeikus, 2001).

Valivety *et al.* (1992), reportaron que la lipasa del hongo *Rhizomucor miehei* presentó su máxima actividad a una  $a_w$  de 0.55, en un medio con hexanol y  $Mg(NO_3)_2$ . Por otra parte, Matsue y Miyawaki (2000) reportaron que la alcohol-deshidrogenasa de levadura, mostró la máxima actividad enzimática a una  $a_w$  de 0.99, en presencia de urea.

Se ha reportado que algunas enzimas de *T. maritima* muestran mayor actividad en presencia de NaCl. Por ejemplo, Winterhalter y Liebl (1995) reportaron que la xilanasa B de *T. maritima* MSB8 tuvo mayor actividad en presencia de NaCl 0.5 M. Bronnenmeier *et al.* (1995) reportaron que dos celulasas de *T. maritima* DSM 3109, aumentaron su

termoestabilidad en presencia de NaCl 1 M, de modo que pudieron conservar más del 90 % de su actividad durante 6 horas de incubación a 80 °C.

Además del Na<sup>+</sup>, el ión Ca<sup>2+</sup> también ha sido reportado como un estabilizante de la estructura de fucosidasas de diferentes orígenes. Nagae *et al.* (2007) reportaron que el Ca<sup>2+</sup> estabiliza la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -L-1,2-fucosidasa de *B. bifidum*, ya que este catión sirve de puente entre la región N-terminal, los dominios “enlazador helicoidal” y “barril helicoidal” y tres importantes grupos carbonilos (Gly-56, Ser-385 y Leu-392), el átomo de oxígeno de un carboxilato de Glu-76, y una molécula de agua son los ligandos coordinados para este ión. Con respecto a la influencia de iones sobre la actividad de las enzimas, Aminoff y Furukawa (1970) reportaron que la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Clostridium perfringens* aumenta su actividad en más de 60 % debido a la presencia de CaCl<sub>2</sub> 2 M. Liu *et al.* (2016) reportaron que las fucosidasas Eo0918 y Eo3812 de *Emticicia oligotrophica* aumentaron su actividad en un 50 y 56 % respectivamente en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Tarling *et al.* (2003) estudiaron la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, y encontraron que la presencia de CaCl<sub>2</sub> en una concentración 10 mM no tuvo efecto sobre la actividad fucosidasa. Este resultado no coincide con lo reportado en esta investigación, posiblemente debido a que la concentración de CaCl<sub>2</sub> empleada por dichos autores, no fue suficiente para apreciar un incremento en la actividad de la enzima. Otros cationes como magnesio, cobalto, manganeso, níquel, y zinc también fueron estudiados previamente por Tarling *et al.* (2003) sin mostrar efectos sobre la actividad enzimática de *T. maritima*. Además, en la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* estudiada, el ión Ca<sup>2+</sup> podría jugar algún papel importante en la conformación del sitio activo pudiendo contribuir así al incremento observado en la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa, sin embargo, estudios adicionales serían necesarios para confirmarlo.

### **7.8.3 EFECTO DEL CaCl<sub>2</sub> EN LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA Y DE TRANSFUCOSILACIÓN DURANTE LAS REACCIONES DE SÍNTESIS DE FUCOS**

Como se observó en los experimentos previos, la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* ejerce su mayor actividad en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1.1 M, y esa fue la razón por la cual el CaCl<sub>2</sub> fue elegido como un factor a ser estudiado en reacciones de síntesis de FUCOS por transfucosilación. Además, el CaCl<sub>2</sub> en concentración 1.1 M fue capaz de disminuir la  $a_w$  del sistema de reacción a 0.9581, lo cual implica una disminución en la cantidad de agua disponible, disminuyendo así las probabilidades de un ataque nucleofílico de la molécula de agua sobre el intermediario fucosil-enzima (hidrólisis) y favoreciendo, en consecuencia, el ataque por parte de la molécula de lactosa (Zeuner *et al.*, 2014). La figura 21A muestra el efecto del CaCl<sub>2</sub> a dos concentraciones de lactosa (58 y 146 mM) en la síntesis de FUCOS mientras que en la figura 21B se muestra la hidrólisis del pNP-Fuc durante las reacciones de síntesis. Mediante la comparación de las reacciones sin y con CaCl<sub>2</sub>, puede observarse que en las reacciones de transfucosilación, la presencia de CaCl<sub>2</sub> favoreció la síntesis de FUCOS, mientras que la hidrólisis del pNP-Fuc no fue afectada por la presencia de esta sal.

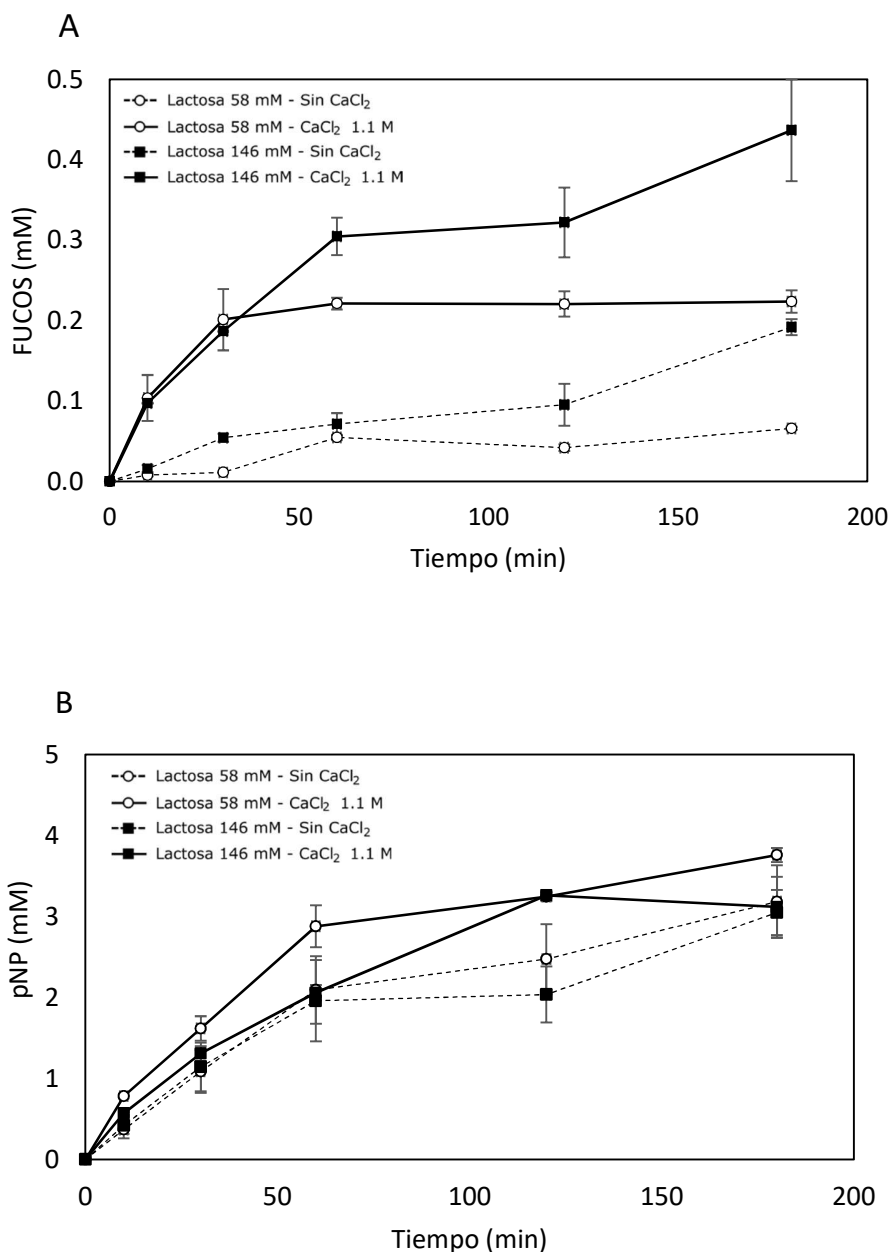


Figura 21. Cinéticas de transfucosilación (A) e hidrólisis (B), en ausencia o presencia de  $\text{CaCl}_2$  1.1 M, a concentraciones de lactosa 58 y 146 mM. Reacciones catalizadas por la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, usando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y diferentes concentraciones de lactosa, en solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 5, a 60 °C por 3 h. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

De manera conjunta con estos resultados, como se puede observar en la tabla 12, la velocidad de hidrólisis ( $V_{hid}$ ) disminuyó al aumentar la concentración de lactosa de 0 a 58 mM, tanto en ausencia como en presencia de  $CaCl_2$ ; mientras que la velocidad de transfucosilación ( $V_{trans}$ ) se incrementó al aumentar la concentración del sustrato aceptor, lo cual fue previamente observado y discutido sección 7.5.

De acuerdo con Rodríguez-Díaz *et al.* (2013) cuanto mayor es la proporción  $V_{trans}/V_{hid}$ , mayormente favorecida es la síntesis de FUCOS, y como se observa en la tabla 12, cuando esta proporción fue incrementada, los rendimientos de la síntesis también aumentaron, lo cual es más evidente a las mayores concentraciones de  $CaCl_2$  y lactosa empleados. Por ejemplo, cuando el  $CaCl_2$  fue adicionado a las reacciones, los rendimientos de la síntesis fueron triplicados y duplicados, a concentraciones de lactosa 58 y 146 mM respectivamente, comparadas con reacciones ausentes de esta sal. Por los resultados anteriores, puede decirse que la combinación del efecto activador del  $CaCl_2$ , la disminución en la  $a_w$  y la concentración del sustrato aceptor (lactosa) tuvieron un efecto sinérgico favoreciendo la síntesis de FUCOS. Un posible efecto estabilizador del  $CaCl_2$  en la enzima podría contribuir a este sinergismo, como ha sido observado en otras glicosidasas (Nagae *et al.* 2007).

La influencia de la  $a_w$  sobre la transglicosilación se ha reportada en diversos trabajos en los cuales se han empleado glicosidasas para la síntesis de oligosacáridos. Cruz-Guerrero *et al.* (2006) sintetizaron galactooligosacáridos de diferente peso molecular mediante una  $\beta$ -glicosidasa hipertermofílica (GLY-001-02, Diversa) empleando lactosa como sustrato. Los mayores rendimientos en la síntesis de estos compuestos se encontraron al reducir la  $a_w$  a valores de entre 0.44 y 0.66 mediante la adición de acetona como cosolvente. Por su parte Bridiau *et al.* (2010) sintetizaron *N*-acetil lactosamina mediante la  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans*, empleando 2-nitrofenil galactosa como sustrato donador y *N*-

acetilglucosamina como aceptor, encontrando los mejores resultados al disminuir la  $a_w$  del medio a 0.92 mediante la adición de acetonitrilo como cosolvente. Vera *et al.* (2017) sintetizaron hexil- $\beta$ -D-galactósido empleando la galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, en este caso usaron hexanol como sustrato aceptor y lactosa como sustrato donador, los mayores rendimientos de la transgalactosilación (60 %) se encontraron a una  $a_w$  de 0.94 mediante la adición de acetona como cosolvente.

Tabla 12. Velocidades de hidrólisis ( $V_{hid}$ ) y transfucosilación ( $V_{trans}$ ) a diferentes condiciones de la reacción

CaCl <sub>2</sub> (M)	pNP-Fuc (mM)	Lactosa (mM)	$a_w$	$V_{hid}$ (mM/min)	$V_{trans}$ (mM/min)	$V_{trans}/V_{hid}^a$	Rendimiento <sup>a</sup> (%)
0	3.5	0	$0.9956 \pm 0.0002$	$0.0750 \pm 0.0038$	-	-	-
0	3.5	58	$0.9941 \pm 0.0001$	$0.0349 \pm 0.0068$	$0.0009 \pm 0.0001$	0.026	$1.99 \pm 0.11$
0	3.5	146	$0.9934 \pm 0.0002$	$0.0324 \pm 0.0083$	$0.0015 \pm 0.0003$	0.045	$5.48 \pm 0.28$
1.1	3.5	0	$0.9581 \pm 0.0004$	$0.1780 \pm 0.0026$	-	-	-
1.1	3.5	58	$0.9571 \pm 0.0002$	$0.0463 \pm 0.0045$	$0.0061 \pm 0.0014$	0.132	$6.04 \pm 0.57$
1.1	3.5	146	$0.9556 \pm 0.0003$	$0.0334 \pm 0.0012$	$0.0060 \pm 0.0004$	0.145	$12.48 \pm 1.81$

<sup>a</sup> Rendimientos calculados con base en el donador a 3 h de reacción



## 7.9 PURIFICACIÓN DEL OLIGOSACÁRIDO

Con base en las distintas metodologías empleadas para la purificación de carbohidratos, se emplearon algunas de ellas para separar al oligosacárido sintetizado de los otros azúcares de la mezcla de reacción. Estas son purificación por fermentación con levaduras, precipitación con etanol, adsorción en carbón activado y cromatografía de exclusión molecular.

### 7.9.1 PURIFICACIÓN POR FERMENTACIÓN CON LEVADURA (*S. cerevisiae*)

Una de las técnicas empleadas en este trabajo para purificar al oligosacárido sintetizado fue mediante la hidrólisis de la lactosa residual en glucosa y galactosa, y su posterior fermentación con *S. cerevisiae*.

Después de la reacción de síntesis de FUCOS por transfucosilación (figura 22A), estos fueron sometidos a una reacción catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa para hidrolizar la lactosa residual en glucosa y galactosa, monosacáridos metabolizables por *S. cerevisiae* (figura 22B). En esta etapa, el contenido de lactosa en el medio descendió de 143.53 hasta 0.57 mM. Una vez inoculada con la levadura y tras 48 horas de incubación (figura 22C), las concentraciones de glucosa y galactosa en el medio disminuyeron, de manera que a las 72 h (figura 22D) la glucosa fue totalmente consumida. Además de lo anterior, en el cromatograma se detectó la aparición de un compuesto no identificado (CNI) el cual interfirió con la señal del oligosacárido sintetizado y no hizo posible la cuantificación de este último.

La concentración de carbohidratos en cada etapa de la purificación se muestra en la tabla 13.

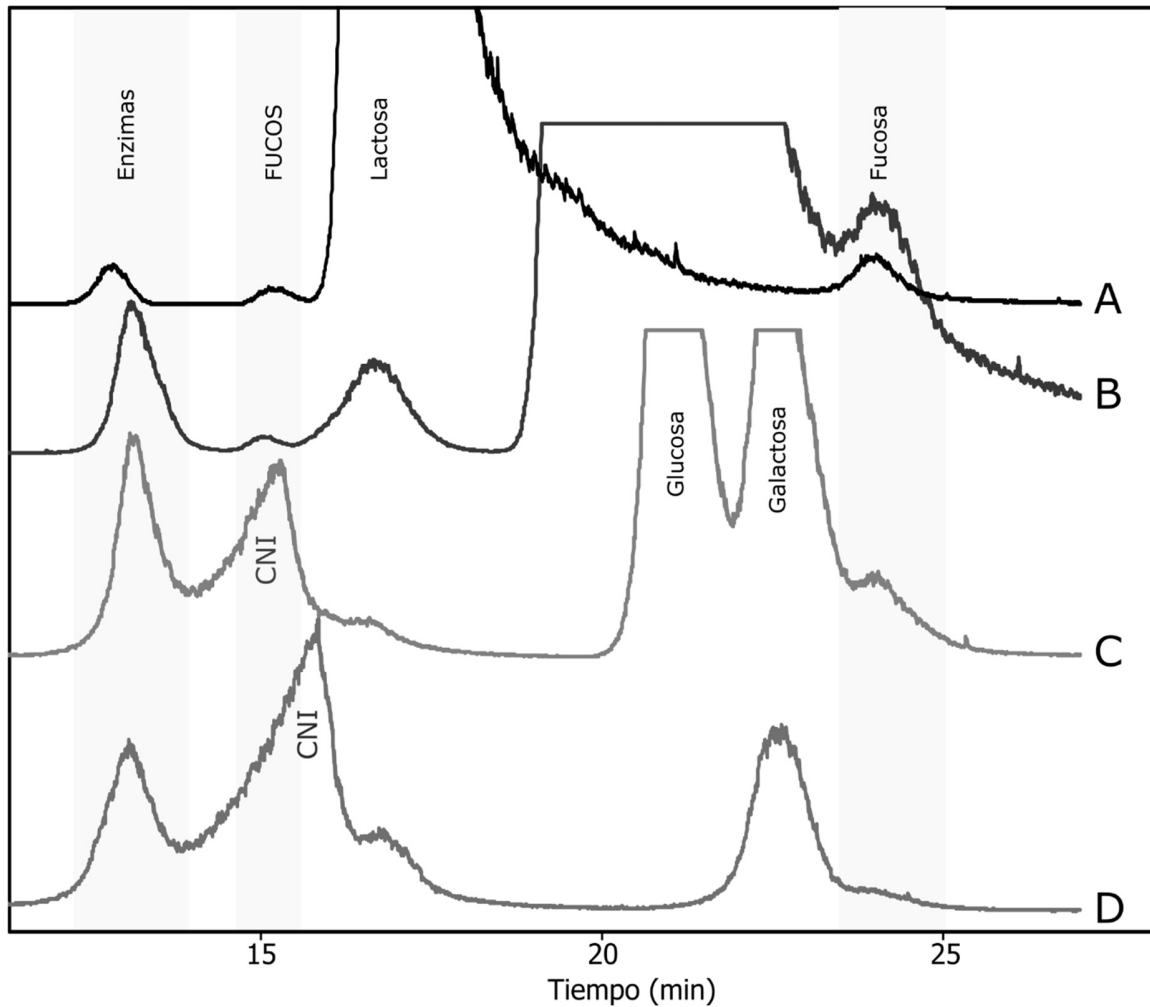


Figura 22. Cromatogramas de las etapas de purificación de FUCOS por fermentación con levaduras. En (A) se observa una reacción típica de transfucosilación (pNP-Fuc 3.5 mM, lactosa 146 mM, 0.065 U/mL de  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, pH 5, 60 °C, 3 h); (B) después de una incubación con  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (pH 5, 60 °C, 48 h); (C) y (D) después de 48 y 72 h respectivamente, de una incubación con *Saccharomyces cerevisiae* (28 °C). CNI: compuesto no identificado observado tras la incubación con levaduras.

*Tabla 13. Concentración de carbohidratos antes y después de la purificación*

Concentración de carbohidratos (mM)			
Carbohidrato	Reacción de síntesis	Después de tratamiento con lactasa	Después de fermentación
FUCOS	0.33	0.57	NC
Lactosa	145.53	4.61	NC
Glucosa	0.00	FR	0
Galactosa	0.00	FR	1.83
Fucosa	3.78	NC	NC

*FR= Fuera de rango, la concentración del carbohidrato era demasiado grande para ser cuantificada.*

*NC= No cuantificado, la señal del oligosacárido era ocultada total o parcialmente por otros picos en el cromatograma*

Debido a la posibilidad de que se tratara de alguna proteína, se procedió a precipitar con acetona en una proporción de 1:2 (una parte de acetona por dos de muestra), se agitó y se mantuvo en reposo durante 4 horas a 4 °C. Posteriormente se centrifugó, se evaporó la acetona y se analizó la muestra por HPLC. Se observó que el pico del subproducto metabólico no disminuyó. Por lo anterior se decidió probar con otras alternativas de purificación.

### 7.9.2 PURIFICACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON ETANOL

Se realizó precipitación con etanol basada en la metodología de Sen *et al.* (2011). En la tabla 14 se presentan las concentraciones de carbohidratos antes de la purificación y la composición del precipitado y sobrenadante al final del proceso.

Basados en la solubilidad diferencial de carbohidratos en soluciones de etanol, estos autores lograron precipitar selectivamente los oligosacáridos presentes en una mezcla de GOS, lactosa y glucosa. Reportaron que, a menor concentración total de sacáridos en una mezcla, la precipitación con etanol favorece una mayor concentración de estos en el sobrenadante. Lo cual concuerda con los resultados experimentales obtenidos, ya que la concentración empleada en este experimento, de aproximadamente 5 mg/mL es aún más baja que la empleada por estos autores (28 mg/mL), de manera que los carbohidratos se presentaron preferentemente en el sobrenadante. Por otra parte, ellos mencionaron que, a menor concentración total de sacáridos, el mayor enriquecimiento de oligosacáridos se presenta en el precipitado, contrario a lo encontrado experimentalmente, pues no se encontraron cantidades apreciables del oligosacárido en dicha fase, únicamente en el sobrenadante junto con cantidades considerables de monosacáridos y lactosa.

*Tabla 14. Concentración de carbohidratos en las fases de la precipitación con etanol*

Concentración de carbohidratos (mg/mL)			
Carbohidrato	Antes de la precipitación	Precipitación con etanol	
		Precipitado	Sobrenadante
FUCOS	1.52	0.20	0.94
Lactosa	17.97	0.64	12.80
Glucosa	FR	5.16	FR
Galactosa	FR	4.83	FR
Fucosa	NC	0.61	NC

*FR= Fuera de rango, la concentración del carbohidrato era demasiado grande para ser cuantificada.*

*NC= No cuantificado, la señal del oligosacárido era ocultada total o parcialmente por otros picos en el cromatograma*

### 7.9.3 PURIFICACIÓN CON CARBÓN ACTIVADO

Nobre *et al.* (2012) emplearon carbón activado en una columna para separar selectivamente fructooligosacáridos con grados de polimerización de 1 a 4, provenientes de un caldo de fermentación. La mayor proporción de la superficie del carbón es no polar e hidrofóbica, por lo que los carbohidratos entre más hidrofóbicos (de mayor longitud), más se retuvieron en el carbón, y en un posterior lavado con agua, los carbohidratos menos retenidos fueron retirados de la fase estacionaria, finalmente una solución alcohólica de hasta el 50 %, permitió desorber los oligosacáridos retenidos.

En el presente trabajo se empleó un principio similar, pues la mezcla de carbohidratos estudiada se mezcló con carbón y fue sometida a un lavado con agua y posteriormente con solución alcohólica. La muestra referida como “antes de la purificación” para estos experimentos corresponde a una reacción de síntesis (lactosa 146 mM y pNP-F 3-51 mM, 60 °C, 3 h) previamente tratada con  $\beta$ -galactosidasa.

Después de la purificación con carbón activado, la concentración de los monosacáridos disminuyó considerablemente como puede apreciarse en la tabla 15. El oligosacárido logró recuperarse en un 71.74 %, similar a lo reportado por encontrado por Nobre *et al.* (2012), quienes reportan un porcentaje de recuperación del 74.5 %.

*Tabla 15. Concentración de carbohidratos antes y después de la purificación con carbón activado*

Concentración de carbohidratos (mM)		
Carbohidrato	Antes de purificar	Purificado
FUCOS	0.92	0.66
Lactosa	11.92	6.97
Glucosa	FR	2.02
Galactosa	FR	1.18
Fucosa	NC	0.00

*FR= Fuera de rango, la concentración del carbohidrato era demasiado grande para ser cuantificada.*

*NC= No cuantificado, la señal del oligosacárido era ocultada total o parcialmente por otros picos en el cromatograma*

Por otra parte, al final de la purificación, el oligosacárido representó el 6.1 % en peso, del total de carbohidratos presentes, mientras Nobre *et al.* (2012), obtuvieron el 92.9 % de enriquecimiento del oligosacárido al final de su proceso. Esto significa que pese a obtener una recuperación aceptable del producto, no se está obteniendo con una pureza adecuada.

#### 7.9.4 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

El método de purificación por cromatografía de exclusión molecular se basó en la metodología de Sosa-Ancona (2012), con algunas modificaciones.

La muestra sometida a este método de purificación fueron 5 mL de una reacción de síntesis (lactosa 584 mM, pNP-F 3.5 mM, sin hidrólisis previa de lactosa). Una vez iniciada la elución de la muestra en la columna de Bio-Gel P2, se realizaron colectas de 2.8 mL entre las 5 y 6.5 h, y mediante HPLC en la columna Rezex RNO-Oligosaccharide Na<sup>+</sup> (Phenomenex, CA, E.U.) se cuantificó el contenido de FUCOS y de lactosa presentes en cada colecta (Figura 23).

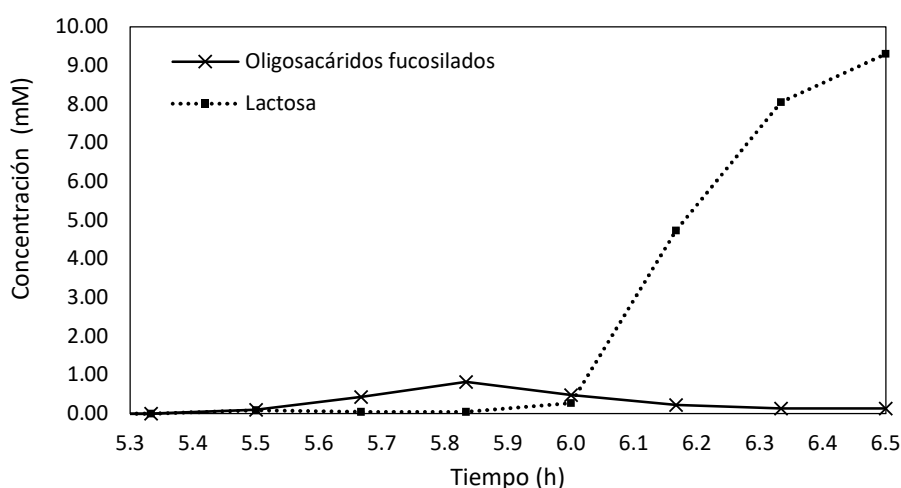


Figura 23. Composición de colectas obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular a partir de una reacción de síntesis de FUCOS por transfucosilación (lactosa 584 mM, pNP-F 3.5 mM, sin hidrólisis previa de lactosa).

Las colectas obtenidas entre 5.5 y 5.8 h fueron mezcladas y concentradas a 5 mL para verificar su pureza y cuantificar su contenido mediante HPLC en la columna HC75 H<sup>+</sup> (Phenomenex, CA, E.U.).



Como puede verse en la tabla 16, el producto obtenido por este método de purificación presentó la mayor pureza, pues del total de carbohidratos disueltos, el 97 % corresponde a FUCOS y el 3 % a lactosa. El oligosacárido fue recuperado en un 51.5 %. Las colectas obtenidas entre 6.0 y 6.3 h contienen el restante 48.5 % de los oligosacáridos presentes en la reacción inicial, sin embargo, poseen cantidades considerables de lactosa, por lo que fueron reservadas para posteriores purificaciones.

*Tabla 16. Carbohidratos presentes antes y después de la cromatografía de exclusión molecular*

Carbohidrato	Cantidad de carbohidratos (mM)	
	Antes de purificar	Purificado
FUCOS	0.72	0.37
Lactosa	FR	0.01
Fucosa	NC	0.00

*FR= Fuera de rango, la concentración del carbohidrato era demasiado grande para ser cuantificada.*

*NC= No cuantificado, la señal del oligosacárido era ocultada total o parcialmente por otros picos en el cromatograma*

La cromatografía por exclusión molecular fue el método más adecuado para obtener un producto altamente purificado y emplearlo en pruebas de actividad biológica.

### **7.10 ACTIVIDAD BIOLÓGICA INMUNOMODULADORA DEL OLIGOSACÁRIDO SINTETIZADO**

Los ensayos de estimulación del sistema inmune fueron realizados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, siguiendo protocolos de seguridad y ética aceptados internacionalmente para la obtención y manipulación de muestras de sangre. A partir de muestras de sangre periférica de tres pacientes sanos (PAC1, PAC2 y PAC3), se aislaron células mononucleares y fueron incubadas con diferentes concentraciones de los FUCOS para estimular la producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  y la antiinflamatoria IL-10. Los estímulos ensayados, así como sus controles se detallan en la tabla 7. Una vez estimuladas las células, se recolectaron los sobrenadantes y se cuantificaron mediante el método de ELISA con kits de análisis para cada citocina.

Los resultados para la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 se muestran en la figura 24. Como puede observarse, los FUCOS en sinergismo con el LPS (FU24+LPS24), tuvieron un efecto positivo sobre la producción de IL-10, y dicho incremento fue del 50 % en comparación con la cantidad de citocina producida por el control de LPS (LPS24).

Este sinergismo se manifestó únicamente cuando los FUCOS actuaron sobre las células previas a ser estimuladas con LPS, pues al invertir el orden de los estímulos (LPS24+FU24), no hubo un efecto sobre la producción de citocinas. Posiblemente los FUCOS sensibilizan receptores de la membrana celular para LPS, que al ser activados por este último incrementan la producción de la citocina IL-10. Sotgiu *et al.* (2006) estudiaron el efecto de dos oligosacáridos fucosilados (2'FL y LNFP-I) sobre la producción de diferentes citocinas en células mononucleares de sangre periférica. Encontraron que al estimular células preactivadas con LPS, el posterior estímulo con 2'FL en concentraciones de 30  $\mu\text{g/mL}$  favoreció un incremento del 10 % en la producción de IL-10. Las diferencias entre los resultados presentados por Sotgiu *et al.* (2006) y el de este trabajo, podría deberse a que estos

investigadores utilizaron el compuesto puro, mientras que los FUCOS empleados en este trabajo corresponden a una mezcla entre fucosil-lactosa y un tetrasacárido fucosilado, como se describe en la sección 7.4.

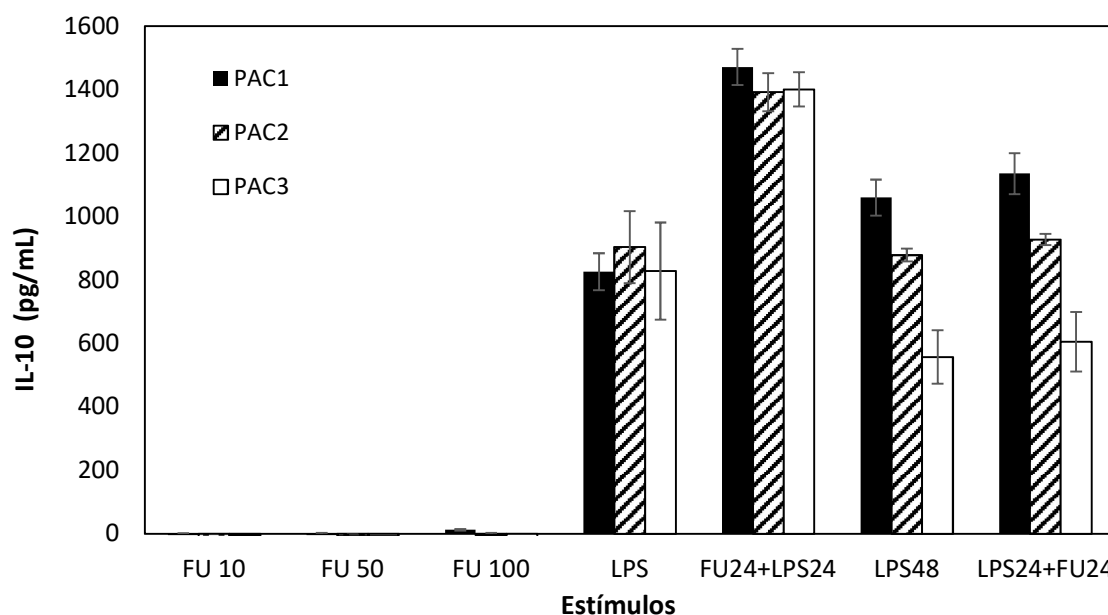


Figura 24. Efecto de los FUCOS sobre las células mononucleares de sangre periférica para la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10.

Los resultados para la producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$  se muestran en la figura 25. Como puede observarse, la preestimulación con FUCOS seguida por LPS (FU24+LPS24) tuvieron efectos variados entre un paciente y otro, ya que en el caso del PAC1, logró abatirse en un 50 % la producción de TNF- $\alpha$  con respecto al control de LPS (LPS24), en el caso e PAC2 no hubo un efecto y en el caso de PAC3 la producción de esta citocina se incrementó en un 60 %. Esto quiere decir que el efecto de los FUCOS sobre la producción de TNF- $\alpha$  podría obedecer a características propias de cada individuo no abarcadas en el marco de estos experimentos. Por otra parte, la estimulación de las células

con FUCOS después de una preestimulación con LPS (LPS24+FU24), triplican la producción de TNF- $\alpha$ . Sotgiu *et al.* (2006) encontraron que al estimular células mononucleares preestimuladas con LPS, el posterior estímulo con 2<sup>7</sup>FL en concentraciones de 30  $\mu$ g/mL logró abatir en un 39 % la producción en TNF- $\alpha$ . Las diferencias entre los resultados presentados por Sotgiu *et al.* (2006) y el de este trabajo han sido anteriormente mencionadas.

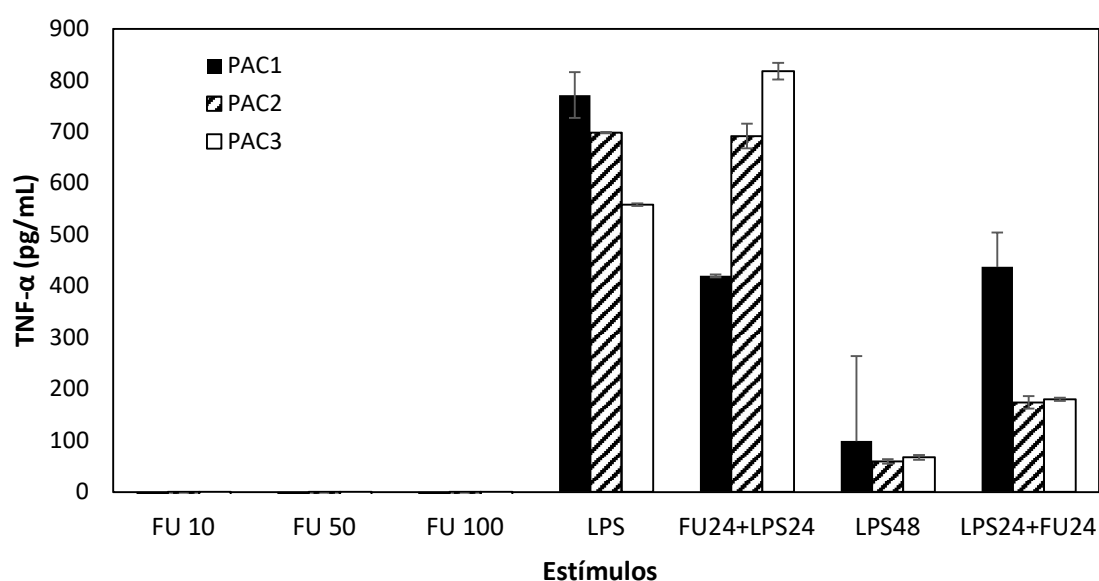


Figura 25. Efecto de los FUCOS sobre las células mononucleares de sangre periférica para la producción de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ .

## 8 CONCLUSIONES

- El principal oligosacárido sintetizado pudo ser identificado como fucosil-lactosa, mediante los análisis de MALDI-TOF MS y HPLC.
- La concentración inicial del sustrato aceptor (lactosa) favorece tanto a la concentración como a la velocidad de síntesis de los FUCOS: el máximo rendimiento (25.1 %) se obtuvo con una concentración inicial de lactosa 584 mM (pNP-Fuc 3.5 mM, 60 °C, 3 h, pH 5).
- La concentración inicial de sustrato donador (pNP-Fuc) no tuvo una influencia sobre la síntesis de FUCOS al emplear concentraciones de lactosa 29 y 58 mM.
- Proporciones D/A bajas favorecieron la síntesis: el máximo rendimiento de transfucosilación (32.5 %) fue obtenido a una proporción D/A de 0.001 (pH 5, 60 °C, 3 h).
- La adición de un  $\text{CaCl}_2$  1.1 M triplicó y duplicó la síntesis de FUCOS a concentraciones de lactosa 58 y 146 mM respectivamente (pNP-Fuc 3.5 mM, pH 5, 60 °C, 3 h).
- En la purificación por fermentación, no fue posible cuantificar el oligosacárido debido a la aparición de un producto del metabolismo de la levadura y posible formación de galactósidos.
- La precipitación con etanol no fue selectiva, posiblemente por las concentraciones de carbohidratos menores a las empleadas en la literatura. Recuperación 62 %.
- La purificación por carbón activado resultó satisfactoria en cuanto al rendimiento de recuperación (71.74 %). Es necesario eliminar los azúcares remanentes en dicho producto.

- La cromatografía de exclusión molecular permitió recuperar los FUCOS en un 51.5 % con una pureza del 97 %.
- La estimulación de células mononucleares de sangre periférica humanas con FUCOS, previo a una estimulación con LPS, incrementa la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en un 50 %.
- El efecto de FUCOS sobre la producción de TNF- $\alpha$  podría depender de características propias de cada individuo.

## 9 REFERENCIAS

- Ahmad, T. B., Liu, L., Kotiw, M. y Benkendorff, K. (2018) Review of anti-inflammatory, immunomodulatory and wound healing properties of molluscs. *Journal of Ethnopharmacology*, 210,156-178.
- Ajisaka, K., Fujimoto, H. y Miyasato, M. (1998) An  $\alpha$ -L-fucosidase from *Penicillium multicolor* as a candidate enzyme for the synthesis of  $\alpha$  (1-3)-linked fucosyl oligosaccharides by transglycosylation. *Carbohydrate Research*, 309(1), 125-129.
- Albermann, C., Piepersberg, W. y Wehmeier, U. F. (2001) Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydrate Research*, 334(2), 97-103.
- Alhadeff, J. A., Khunsook, S., Choowongkamon, K., Baney, T., Heredia, V., Tweedie, A. y Bean, B. (1999) Characterization of human semen  $\alpha$ -L-fucosidases. *Molecular Human Reproduction*, 5(9), 809-815.
- Aminoff, D. y Furukawa, K. (1970) Enzymes that destroy blood group specificity. I. Purification and properties of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Clostridium perfringens*. *Journal of Biological Chemistry*, 245(7), 1659-1669.
- Andersson, B., Porras, O., Hanson, L. A., Lagergard, T. y Svanborg-Eden, C. (1986) Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *Journal of Infectious Diseases*, 153(2), 232-237.
- Arango Duque, G. y Descoteaux, A. (2014) Macrophage Cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5(491), 1-12.
- Arteaga-Cabello, F. J. (2013) Síntesis de 2-fucosil lactosa y lactodifucotetraosa por *E. coli* modificada por ingeniería genética. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- Baumgärtner, F., Seitz, L., Sprenger, G. A. y Albermann, C. (2013) Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microbial Cell Factories*, 12(40).
- Baxter, R. M. y Gibbons, N. E. (1956) Effects of sodium and potassium chloride on certain enzymes of *Micrococcus halodenitrificans* and *Pseudomonas salinaria*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2(6), 599-606.
- Benešová, E., Lipovova, P., Dvorakova, H. y Kralova, B. (2013)  $\alpha$ -L-fucosidase from *Paenibacillus thiaminolyticus*: its hydrolytic and transglycosylation abilities. *Glycobiology*, 23(9), 1052-1065.
- Berteau, O., Bielicki, J., Kilonda, A., Machy, D., Anson, D. S. y Kenne, L. (2004)  $\alpha$ -L-Fucosidases: Exoglycosidases with unusual transglycosylation properties. *Biochemistry*, 43, 7881-7891.
- Bode, L. (2009) Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*, 67(11), S183-S191.
- Bode, L., Kunz, C., Muhly-Reinholz, M., Mayer, K., Seeger, W. y Rudloff, S. (2004) Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Thrombosis and Haemostasis*, 92(6), 1402-1410.
- Boehm, G., Stahl, B., Jelinek, J., Knol, J., Miniello, V. y Moro, G. E. (2005) Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatrica. Supplementum*, 94(449), 18-21.
- BRENDA (Braunschweig Enzyme Database), disponible en <http://www.brenda-enzymes.info>, consultado el 8 de febrero de 2018.
- Bridiau, N., Issaoui, N. y 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.
- Bronnenmeier, K., Kern, A., Liebl, W. y Staudenbauer, W. L. (1995) Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1399-1407.



- Burchell, J., Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Girling, A., Lewis, A., Millis, R. y Lamport, D. (1987) Development and characterization of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin. *Cancer Research*, 47(20), 5476-5482.
- Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E. y Girio, F. (2012) Production, purification and characterisation of oligosaccharides from olive tree pruning autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 40, 225-231.
- Castanys-Munoz, E., Martin, M. J. y Prieto, P. A. (2013) 2'-fucosyllactose: an abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. *Nutrition Reviews*, 71(12), 773-789.
- Chin, Y. W., Seo, N., Kim, J. H., y 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.
- Chaturvedi, P. y Sharma, C. B. (1988) Goat milk oligosaccharides: purification and characterization by HPLC and high-field 1H-NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 967(1), 115-121.
- Chaturvedi, P., Warren, C. D., Altaye, M., Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G., Pickering, L. K. y Newburg, D. S. (2001) Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*, 11(5), 365-372.
- Connors, S. B., Mongodin, E. F., Johnson, M. R., Montero, C. I., Nelson, K. E. y Kelly, R. M. (2006) Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(6), 872-905.
- Coppa, G. V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S. y Gabrielli, O. (2004) The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 38(Suppl 6), S80-83.
- Cota, A. M. y Midwinter, M. J. (2015) The immune system. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 16(7), 353-355.

- Crane, J. K., Azar, S. S., Stam, A. y Newburg, D. S. (1994) Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *The Journal of Nutrition*, 124(12), 2358-2364.
- Crout, D. H. y Vic, G. (1998) Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(1), 98-111.
- Cruz-Guerrero, A. E., Gomez-Ruiz, L., Viniegra-Gonzalez, G., Barzana, E. y Garcia-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.
- Culleton, H., McKie, V. y de Vries, R. P. (2013) Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: what have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnology Journal*, 8(8), 884-894.
- David, B. G. H., S. M. (2003) The uses of glycoprocessing enzymes in synthesis, in *Carbohydrates* (Osborne, H. M. I. ed.), 1 Ed., Academic Press, E.U. pp 452.
- Dominguez-Vergara, A. M., Vazquez-Moreno, L. y Montfort, G. R. (2009) Role of prebiotic oligosaccharides in prevention of gastrointestinal infections: a review. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(4), 358-368.
- Eiwegger, T., Stahl, B., Schmitt, J., Boehm, G., Gerstmayr, M., Pichler, J., Dehlink, E., Loibichler, C., Urbanek, R. y Szépfalusi, Z. (2004) Human milk--derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatric Research*, 56(4), 536-540.
- El-Hawiet, A., Kitova, E. N., Kitov, P. I., Eugenio, L., Ng, K. K. S., Mulvey, G. L., Dingle, T. C., Szpacenko, A., Armstrong, G. D. y Klassen, J. S. (2011) Binding of *Clostridium difficile* toxins to human milk oligosaccharides. *Glycobiology*, 21(9), 1217-1227.

- Escamilla-Lozano, Y. (2011) Síntesis de oligosacáridos fucosilados por vía enzimática mediante reacciones de fucosilación. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Escamilla-Lozano, Y. (2016) Estudio de fucosidasas microbianas y su aplicación en la síntesis de oligosacáridos. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Filella, X., Molina, R. y Ballesta, A. M. (2002) Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2), 63-71.
- Fu, Q., Liang, T., Zhang, X. L., Du, Y. G., Guo, Z. M. y Liang, X. M. (2010) Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column. *Carbohydrate Research*, 345(18), 2690-2697.
- Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C. y Coppa, G. V. (2011) Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*, 128(6), E1520-E1531.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. y Roberfroid, M. B. (2004) Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259-275.
- Gnoth, M. J., Kunz, C., Kinne-Saffran, E. y Rudloff, S. (2000) Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. *Journal of Nutrition*, 130(12), 3014-3020.
- González-Muñoz, M. J., Rivas, S., Santos, V. y Parajó, J. C. (2013) Fractionation of extracted hemicellulosic saccharides from *Pinus pinaster* wood by multistep membrane processing. *Journal of Membrane Science*, 428(0), 281-289.
- Good, M., Sodhi, C. P., Yamaguchi, Y., Jia, H., Lu, P., Fulton, W. B., Martin, L. Y., Prindle, T., Nino, D. F., Zhou, Q., Ma, C., Ozolek, J. A., Buck, R. H., Goehring, K. C. y Hackam, D. J. (2016) The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose attenuates the severity of experimental necrotising enterocolitis by enhancing mesenteric perfusion in the neonatal intestine. *British Journal of Nutrition*, 116(7), 1175-1187.

- Gosling, A., Stevens, G. W., Barber, A. R., Kentish, S. E. y 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.
- Guerardel, Y., Morelle, W., Plancke, Y., Lemoine, J. y Strecker, G. (1999) Structural analysis of three sulfated oligosaccharides isolated from human milk. *Carbohydrate Research*, 320(3-4), 230-238.
- Gyorgy, P., Norris, R. F. y Rose, C. S. (1954) Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 48(1), 193-201.
- Hancock, S. M., Vaughan, M. D. y Withers, S. G. (2006) Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(5), 509-519.
- Hansson, T. y Adlercreutz, P. (2001) Enhanced transglucosylation/hydrolysis ratio of mutants of *Pyrococcus furiosus*  $\beta$ -glucosidase: effects of donor concentration, water content, and temperature on activity and selectivity in hexanoll. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(6), 656-665.
- He, Y., Liu, S., Kling, D. E., Leone, S., Lawlor, N. T., Huang, Y., Feinberg, S. B., Hill, D. R. y Newburg, D. S. (2016) The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human enterocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut*, 65(1), 33-46.
- He, Y., Liu, S., Leone, S. y Newburg, D. S. (2014) Human colostrum oligosaccharides modulate major immunologic pathways of immature human intestine. *Mucosal Immunology*, 7(6), 1326-1339.
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280(2), 309-316.
- Ho, C. W., Lin, Y. N., Chang, C. F., Li, S. T., Wu, Y. T., Wu, C. Y., Chang, C. F., Liu, S. W., Li, Y. K. y Lin, C. H. (2006) Discovery of different types of inhibition between the human and

- Thermotoga maritima*  $\alpha$ -fucosidases by fuconojirimycin-based derivatives. *Biochemistry*, 45(18), 5695-5702.
- Hodzic, Z., Bolock, A. M. y Good, M. (2017) The role of mucosal immunity in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Frontiers in Pediatrics*, 5(40), 1-17.
- Intra, J., Perotti, M. E., Pavesi, G. y Horner, D. (2007) Comparative and phylogenetic analysis of  $\alpha$ -L-fucosidase genes. *Gene*, 392(1-2), 34-46.
- Ishibashi, M., Tokunaga, H., Hiratsuka, K., Yonezawa, Y., Tsurumaru, H., Arakawa, T. y Tokunaga, M. (2001) NaCl-activated nucleoside diphosphate kinase from extremely halophilic archaeon, *Halobacterium salinarum*, maintains native conformation without salt. *FEBS Letters*, 493(2-3), 134-138.
- Kamada, T., Nakajima, M., Naßni, H. y Iwamoto, S. (2002) Pilot-scale study of the purification and concentration of noN-digestible saccharides from yacon rootstock using membrane technology. *Food Science and Technology Research*, 8(2), 172-177.
- Kannagi, R. (2002) Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(5), 599-608.
- Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., Nagano, H., Ohnishi, J. y Ozaki, A. (2000) Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25(4), 213-217.
- Kulinich, A. y Liu, L. (2016) Human milk oligosaccharides: The role in the fine-tuning of innate immune responses. *Carbohydrate Research*, 432, 62-70.
- Kunz, C., Kuntz, S. y Rudloff, S. (2014) Bioactivity of Human Milk Oligosaccharides, en *Food Oligosaccharides* (Moreno, F. J., Sanz, M. L.), 1 Ed., John Wiley & Sons, Ltd., N. Y., pp 1-20.
- Kunz, C. y Rudloff, S. (2006) Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 16(11), 1341-1346.

- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. y Strobel, S. (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*, 20, 699-722.
- La Ferla, B., Prosperi, D., Lay, L., Russo, G. y Panza, L. (2002) Synthesis of building blocks of human milk oligosaccharides. Fucosylated derivatives of the lacto- and neolacto-series. *Carbohydrate Research*, 337(15), 1333-1342.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lanyi, J. K. y Stevenson, J. (1969) Effect of salts and organic solvents on the activity of *Halobacterium cutirubrum* catalase. *Journal of Bacteriology*, 98(2), 611-616.
- Lee, W.H., Pathanibul, P., Quarterman, J., Jo, J. H., Han, N. S., Miller, M. J., Jin, Y. S. y Seo, J. H. (2012) Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 11(48), 1-9 .
- Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulff, L., Gotfredsen, C. H., Mikkelsen, M. D. y 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.
- Li, J., Hsu, H.-C., Ding, Y., Li, H., Wu, Q., Yang, P., Luo, B., Rowse, A. L., Spalding, D. M., Bridges, S. L. y Mountz, J. D. (2014a) Inhibition of fucosylation reshapes inflammatory macrophages and suppresses type II collagen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 66(9), 2368-2379.
- Li, M., Monaco, M. H., Wang, M., Comstock, S. S., Kuhlenschmidt, T. B., Fahey Jr, G. C., Miller, M. J., Kuhlenschmidt, M. S. y Donovan, S. M. (2014b) Human milk oligosaccharides shorten rotavirus-induced diarrhea and modulate piglet mucosal immunity and colonic microbiota. *The ISME Journal*, 8, 1609-1620.
- Liu, S., Kulinich, A., Cai, Z. P., Ma, H. Y., Du, Y. M., Lv, Y. M., Liu, L. y Voglmeir, J. (2016) The fucosidase-pool of *Emericella oligotrophica*: Biochemical characterization and transfucosylation potential. *Glycobiology*, 26(8), 871-879.

- LoCasio, R. G., Ninonuevo, M. R., Freeman, S. L., Sela, D. A., Grimm, R., Lebrilla, C. B., Mills, D. A. y German, J. B. (2007) Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8914-8919.
- Maitin, V. y Rastall, R. A. (2006) Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides: Progress and Recent Trends, en *Functional Foods and Biotechnology* (Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R. E. ed.), 1 Ed., CRC Press, N. Y., pp 670.
- Mangas-Sánchez, J. y Adlercreutz, P. (2015) Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 51-55.
- Marionneau, S., Airaud, F., Bovin, N. V., Le Pendu, J. y RuvoeN-Clouet, N. (2005) Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment. *J Infect Dis*, 192(6), 1071-1077.
- Matsue, S. y Miyawaki, O. (2000) Influence of water activity and aqueous solvent ordering on enzyme kinetics of alcohol dehydrogenase, lysozyme, and  $\beta$ -galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5-6), 342-347.
- Matsumoto, M., Hirata, J., Hirohashi, N. y Hoshi, M. (2002) Sperm-egg binding mediated by sperm  $\alpha$ -L-fucosidase in the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Zoological Science*, 19(1), 43-48.
- Mattila, P., Rabina, J., Hortling, S., Helin, J. y Renkonen, R. (2000) Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology*, 10(10), 1041-1047.
- McCarter, J. D. y Withers, S. G. (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), 885-892.
- McVeagh, P. y Miller, J. B. (1997) Human milk oligosaccharides: only the breast. *Journal of Paediatric and Child Health*, 33(4), 281-286.

- Michalak, M., Larsen, D. M., Jers, C., Almeida, J. R. M., Willer, M., Li, H., Kirpekar, F., Kjærulff, L., Gotfredsen, C. H., Nordvang, R. T., Meyer, A. S. y Mikkelsen, J. D. (2014) Biocatalytic production of 3'-sialyllactose by use of a modified sialidase with superior trans-sialidase activity. *Process Biochemistry*, 49, 265–270.
- Mikkelsen, A., Maaheimo, H. y Hakala, T. K. (2013) Hydrolysis of konjac glucomannan by *Trichoderma reesei* mannanase and endoglucanases Cel7B and Cel5A for the production of glucomannooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 372, 60-68.
- Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H. y Yamamoto, K. (2010) Cooperation of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology*, 20(11), 1402-1409.
- Möller, J., Schroer, M. A., Erkkamp, M., Grobelny, S., Paulus, M., Tiemeyer, S., Wirkert, F. J., Tolan, M. y Winter, R. (2012) The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense protein solutions: from nonlinear pressure response to protein crystallization. *Biophysical Journal*, 102(11), 2641-2648.
- Montañés, F., Olano, A., Reglero, G., Ibáñez, E. y Fornari, T. (2009) Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides. *Separation and Purification Technology*, 66(2), 383-389.
- Moreti, R., Perrella, N. N. y Lopes, A. R. (2013) Carbohydrate digestion in ticks and a digestive  $\alpha$ -L-fucosidase. *Journal of Insect Physiology*, 59(10), 1069-1075.
- Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Murakami, M., Taylor, T. D., Igimi, S. y Hattori, M. (2009) Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. *Journal of Bacteriology*, 191(24), 7630-7631.
- Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M. L., MeinzeN-Derr, J. K., Farkas, T., Chaturvedi, P., Pickering, L. K. y Newburg, D. S. (2004) Human milk



- oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *Journal of Pediatrics*, 145(3), 297-303.
- Myron, P., Siddiquee, S. y Al Azad, S. (2014) Fucosylated chondroitin sulfate diversity in sea cucumbers: A review. *Carbohydrate Polymers*, 112, 173-178.
- Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S. y Kato, R. (2007) Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18497-18509.
- NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information -Basic Local Alignment Search Tool), disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, consultado el 8 de febrero de 2018.
- Newburg, D. S. (2009) Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *Journal of Animal Science*, 87(13), 26-34.
- Ninonuevo, M. R., Park, Y., Yin, H. F., Zhang, J. H., Ward, R. E., Clowers, B. H., German, J. B., Freeman, S. L., Killeen, K., Grimm, R. y Lebrilla, C. B. (2006) A strategy for annotating the human milk glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7471-7480.
- Nobre, C., Teixeira, J. A. y Rodrigues, L. R. (2012) Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column. *New Biotechnology*, 29(3), 395-401.
- Oh, J. G., Chun, S. H., Kim, D. H., Kim, J. H., Shin, H. S., Cho, Y. S., Kim, Y. K., Choi, H. D. y Lee, K. W. (2017) Anti-inflammatory effect of sugar-amino acid Maillard reaction products on intestinal inflammation model in vitro and in vivo. *Carbohydrate Research*, 449, 47-58.
- Orntoft, T. F., Holmes, E. H., Johnson, P., Hakomori, S. y Clausen, H. (1991) Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens: enzymatic, immunohistologic, and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le(a-b-) individuals. *Blood*, 77(6), 1389-1396.
- Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C. y Tellier, C. (2007) Directed evolution of the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an  $\alpha$ -L-transfucosidase. *Biochemistry*, 46(4), 1022-1033.

- Palcic, M. M. (1999) Biocatalytic synthesis of oligosaccharides. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(6), 616-624.
- Palcic, M. M. (2011) Glycosyltransferases as biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 226-233.
- Petschacher, B. y 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.
- Prieto, P. A. (2012) Profiles of human milk oligosaccharides and production of some human milk oligosaccharides in transgenic animals. *Advances in Nutrition*, 3(3), 456S-464S.
- Prieto, P. A., Mukerji, P., Kelder, B., Erney, R., Gonzalez, D., Yun, J. S., Smith, D. F., Moremen, K. W., Nardelli, C., Pierce, M. y *et al.* (1995) Remodeling of mouse milk glycoconjugates by transgenic expression of a human glycosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29515-29519.
- RCSB-PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics- Protein Data Bank), disponible en <http://www.rcsb.org/pdb>, consultado el 8 de febrero de 2018.
- Rencurosi, A., Poletti, L., Guerrini, M., Russo, G. y Lay, L. (2002) Human milk oligosaccharides: an enzymatic protection step simplifies the synthesis of 3'- and 6'-O-sialyllactose and their analogues. *Carbohydrate Research*, 337(6), 473-483.
- Rodríguez-Díaz, J., Rubio-del-Campo, A. y Yebra, M. J. (2012) *Lactobacillus casei* ferments the N-Acetylglucosamine moiety of fucosyl- $\alpha$ -1,3-N-acetylglucosamine and excretes L-fucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), 4613-4619.
- Ruiz-Palacios, G. M., Calva, J. J., Pickering, L. K., Lopez-Vidal, Y., Volkow, P., Pezzarossi, H. y West, M. S. (1990) Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *Journal of Pediatrics*, 116(5), 707-713.
- Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, L. E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B. y Newburg, D. S. (2003) *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc  $\alpha$  1, 2Gal  $\beta$  1, 4GlcNAc), and

- fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14112-14120.
- Schwab, C. y Ganzle, M. (2011) Lactic acid bacteria fermentation of human milk oligosaccharide components, human milk oligosaccharides and galactooligosaccharides. *FEMS Microbiology Letters*, 315(2), 141-148.
- Sen, D., Gosling, A., Stevens, G. W., Bhattacharya, P. K., Barber, A. R., Kentish, S. E., Bhattacharjee, C. y Gras, S. L. (2011) Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation. *Food Chemistry*, 128(3), 773-777.
- Shaikh, F. A., Lammerts van Bueren, A., Davies, G. J. y Withers, S. G. (2013) Identifying the catalytic acid/base in GH29  $\alpha$ -L-fucosidase subfamilies. *Biochemistry*, 52(34), 5857-5864.
- Sosa-Ancona, E. (2012) *Producción y purificación de un disacárido fuscósilado obtenido mediante reacciones de transgalactosilación*. Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Sotgiu, S., Arru, G., Fois, M. L., Sanna, A., Musumeci, M., Rosati, G. y Musumeci, S. (2006) Immunomodulation of fucosyl-lactose and lacto-*N*-fucopentaose on mononuclear cells from multiple sclerosis and healthy subjects. *International Journal of Biomedical Science*, 2(2), 114-120.
- Stokes, R. H. y Robinson, R. A. (1949) Standard Solutions for Humidity Control at 25° C. *Industrial and Engineering Chemistry*, 41, 2013.
- Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B. y 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.
- Sundekilde, U. K., Barile, D., Meyrand, M., Poulsen, N. A., Larsen, L. B., Lebrilla, C. B., German, J. B. y Bertram, H. C. (2012) Natural variability in bovine milk oligosaccharides from danish


- Jersey and Holstein-Friesian breeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(24), 6188-6196.
- Suwasono, S. y Rastall, R. A. (1998) Synthesis of oligosaccharides using immobilised 1,2- $\alpha$ -mannosidase from *Aspergillus phoenicis*: Immobilisation-dependent modulation of product spectrum. *Biotechnology Letters*, 20(1), 15-17.
- Tabas, I. y Glass, C. K. (2013) Anti-inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and opportunities. *Science*, 339(6116), 166-172.
- Tarling, C. A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Bourne, Y., Henrissat, B. y 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.
- Torres, D. P. M., Gonçalves, M. d. P. F., Teixeira, J. A. y Rodrigues, L. R. (2010) Galactooligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 438-454.
- Tu, Z. J., Lin, Y. N. y Lin, C. H. (2013) Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors. *Chemical Society Reviews*, 42(10), 4459-4475.
- Valivety, R. H., Halling, P. J. y Macrae, A. R. (1992) *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001. *FEBS Letters*, 301(3), 258-260.
- Velupillai, P. y Harn, D. A. (1994) Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from *Schistosoma*-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 18-22.
- Venditti, J. J., Swann, J. M. y Bean, B. S. (2010) Hamster sperm-associated  $\alpha$ -L-fucosidase functions during fertilization. *Biology of Reproduction*, 82(3), 572-579.

- Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L. e Illanes, A. (2017) Optimization of reaction conditions and the donor substrate in the synthesis of hexyl- $\beta$ -d-galactoside. *Process Biochemistry*, 58(Suppl C), 128-136.
- Vetere, A., Galateo, C. y Paoletti, S. (1997) All-aqueous, regiospecific transglycosylation synthesis of 3-O- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, a building block for the synthesis of branched oligosaccharides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234:358-361.
- Vieille, C. y Zeikus, G. J. (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 1-43.
- Warmerdam, A., Wang, J., Boom, R. M. y Janssen, A. E. (2013) Effects of carbohydrates on the oNPG converting activity of  $\beta$ -galactosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6458-6464.
- Watt, G. M., Lowden, P. A. y Flitsch, S. L. (1997) Enzyme-catalyzed formation of glycosidic linkages. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 652-660.
- Weichert, S., Jennewein, S., Hufner, E., Weiss, C., Borkowski, J., Putze, J. y Schrotten, H. (2013) Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutrition Research*, 33(10), 831-838.
- Weijers, C. A., Franssen, M. C. y Visser, G. M. (2008) Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26(5), 436-456.
- Wells, C. M. y Dicera, E. (1992) Thrombin Is a Na<sup>+</sup>-Activated Enzyme. *Biochemistry*, 31(47), 11721-11730.
- Winchester, B., Barker, C., Baines, S., Jacob, G. S., Namgoong, S. K. y Fleet, G. (1990) Inhibition of  $\alpha$ -L-fucosidase by derivatives of deoxyfuconojirimycin and deoxymannojirimycin. *Biochemical Journal*, 265(1), 277-282.

- Winterhalter, C. y Liebl, W. (1995) Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1810-1815.
- Withers, S. y Williams, S. Glycoside hydrolases, en *CAZypedia*, disponible en [http://www.cazypedia.org/index.php?title=Glycoside\\_hydrolases&oldid=11575](http://www.cazypedia.org/index.php?title=Glycoside_hydrolases&oldid=11575), consultado el 9 de septiembre de 2017.
- Xia, J., Alderfer, J. L. y Matta, K. L. (2000) Chemical synthesis of a core 2 branched pentasaccharide containing a carboxylate group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10(21), 2485-2487.
- Yolken, R. H., Peterson, J. A., Vonderfecht, S. L., Fouts, E. T., Midthun, K. y Newburg, D. S. (1992) Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *Journal of Clinical Investigation*, 90(5), 1984-1991.
- Yu, Z.-T., Nanthakumar, N. N. y Newburg, D. S. (2016) The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose quenches *Campylobacter jejuni*-induced inflammation in human epithelial cells HEp-2 and HT-29 and in mouse intestinal mucosa. *The Journal of Nutrition*, 146(10), 1980-1990.
- Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J. D. y 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.
- Zeuner, B., Muschiol, J., Holck, J., Lezyk, M., Gedde, M. R., Jers, C., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. (2018) Substrate specificity and transglycosylation activity of GH29  $\alpha$ -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 41, 34-45.
- Zhou, G. Y., Liu, X. W., Su, D. R., Li, L., Xiao, M. y Wang, P. G. (2011) Large scale enzymatic synthesis of oligosaccharides and a novel purification process. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(1), 311-314.

## **ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS**

# Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima*

Francisco Guzmán-Rodríguez<sup>1</sup> · Sergio Alatorre-Santamaría  
Lorena Gómez-Ruiz<sup>1</sup> · Gabriela Rodríguez-Serrano  
Mariano García-Garibay<sup>1,2</sup> · Alma Cruz-Guerrero<sup>1</sup> 

Received: 14 February 2018 / Accepted: 23 April 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

**Abstract** Fucosylated oligosaccharides, such as 2'-fucosyllactose in human milk, have important biological functions such as prebiotics and preventing infection. In this work, the effect of an acceptor substrate (lactose) and the donor substrate 4-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (pNP-Fuc) on the synthesis of a fucosylated trisaccharide was studied in a transglycosylation reaction using  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*. Conducting a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), it was demonstrated that synthesized oligosaccharide corresponded to a fucosylated trisaccharide, and high-performance liquid chromatography (HPLC) of the hydrolyzed compound confirmed it was fucosyllactose. As the concentration of the acceptor substrate increased, the concentration and synthesis rate of the fucosylated trisaccharide also increased, and the highest concentration obtained was 0.883 mM (25.2% yield) when using the higher initial lactose concentration (584 mM). Furthermore, the lower donor/acceptor ratio had the highest synthesis, so at the molar ratio of 0.001, a concentration of 0.286 mM was obtained (32.5% yield).

**Keywords** Fucosyllactose · Transglycosylation · Fucosidase · *Thermotoga maritima*

---

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

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

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma. Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, 52006 Lerma de Villada, Mexico State, Mexico



## Introduction

L-fucose is one of the few naturally occurring L-configured monosaccharides and it is found at the non-reducing end of some glycans. It has a diverse range of biological functions, including cell recognition, fertilization, microbial colonization, and receptor-ligand interactions, as well as being a part of the Lewis antigens [1, 2].

In human milk, more than 200 oligosaccharides have been identified, with the fucosylated oligosaccharides being the most abundant. These oligosaccharides are beneficial to the intestinal health of a breast-fed infant, as they stimulate the beneficial microbiota and help to prevent infection [3, 4]. For example, they protect infants against pathogens such as *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar *fyris*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* [5–7]. The most abundant fucosylated oligosaccharide in human milk is 2'-fucosyllactose [ $\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Gal-(1-4)-D-Glc] at a concentration of 2.74 g/L, which protects against *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* by preventing them from adhering to intestinal epithelial cells [8, 9]. Low levels of 2'-fucosyllactose are associated with a high incidence of diarrhea in lactating infants. For these reasons, 2'-fucosyllactose is a potential oligosaccharide that can be used for nutraceutical and pharmaceutical purposes, particularly as a nutritional additive in infant formula [6, 9, 10].

2'-Fucosyllactose, as well as other fucosylated oligosaccharides in human milk, are synthesized by fucosyltransferases in the Golgi apparatus of alveolar cells and cells in the minor ducts of the mammary gland [11, 12]. In vitro synthesis can be carried out enzymatically by a transfucosylation reaction, which requires a donor substrate and an acceptor substrate for the fucosyl group. Fucosyltransferases or  $\alpha$ -L-fucosidases can be used to carry out the reaction; however, a disadvantage of fucosyltransferases is that sugar nucleotides are needed as donors, and these can be expensive and difficult to synthesize [13].

$\alpha$ -L-Fucosidases (EC 3.2.1.51) are exoglycosyl hydrolases capable of catalyzing the hydrolysis of the non-reducing end of the L-fucosyl residue of fucosylated oligosaccharides, as well as synthetic substrates, such as pNP-Fuc, with a high degree of stereospecificity. Like other glycosidases [14, 15], these enzymes are capable of synthesizing oligosaccharides when the reaction conditions are manipulated to favor synthesis over hydrolysis [16–18].  $\alpha$ -L-Fucosidases are more advantageous than fucosyltransferases because they are abundant in nature and their substrates are more cost-effective [13, 19]. However, their synthesis yield is low, so strategies have been developed to improve transglycosylation by manipulating the substrate concentration, molar ratio, temperature, pH, enzymatic source, water activity, and protein engineering [20–25].

Previous reports have shown that  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* is capable of transglycosylation in addition to being thermostable; therefore, research around this enzyme and the reaction conditions that will lead to the synthesis of oligosaccharides represents a very interesting field of study [17, 18, 26–28].

The main purpose of this work was to study the effect of lactose as an acceptor substrate and pNP-Fuc as a donor substrate in the synthesis of a fucosylated trisaccharide by a transfucosylation reaction using  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*.

## Materials and Methods

### Materials

pNP-Fuc, 4-nitrophenol (pNP), lactose, glucose, galactose, and fucose were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA), 2'-fucosyllactose was purchased from Carbosynth (Berkshire, UK), and acetic acid and sodium acetate for buffer preparation as well as NaOH 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), labeled as 5 U/mL (2.6 U/mg) in 3.2 M ammonium sulfate and diluted 1:100 in acetate buffer (0.1 M, pH 5.0). Milli-Q® water was used throughout the experiments.

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

$\alpha$ -L-Fucosidase activity was determined by using 450  $\mu$ L of 3.16 mM pNP-Fuc and 50  $\mu$ L of diluted  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* in citrate-phosphate buffer (0.1 M, pH 5.0) at 60 °C. The pNP that was released was directly monitored for 40 min in a spectrophotometric cell (Shimadzu UV-160A, Tokyo, Japan) at 410 nm. One unit of  $\alpha$ -L-fucosidase was defined as the amount of enzyme required to release 1  $\mu$ mol of pNP per minute at pH 5.0 and 60 °C. The molar extinction coefficient ( ) of the pNP under the conditions described was 7.8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### Fucosylated Trisaccharide Synthesis

The synthesis reaction mixture consisted of 3.5 mM pNP-Fuc as the donor substrate and 146 mM lactose as the acceptor substrate in acetate buffer (0.1 M, pH 5.0) with 0.065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. The reaction mixture was incubated at 60 °C for 3 h, and aliquots were taken at regular intervals. The synthesized fucosylated trisaccharide was quantified by HPLC as described below. To quantify the released pNP, the sample was alkalized to pH 9.6 with 3 M NaOH, and the absorbance at 410 nm was measured using a spectrophotometer. The molar extinction coefficient ( ) of the pNP under the conditions described was 4.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### Identification of Synthetized Fucosylated Trisaccharide

The synthesized oligosaccharide was recovered by HPLC from a synthesis reaction (lactose 146 mM). Collections were concentrated at 70 °C, and the purity of the compound was verified by HPLC (see section “[Carbohydrate Quantification](#)”).

The purified oligosaccharide was concentrated to 1 mg/mL and analyzed using a Bruker Autoflex speed MALDI-TOF/TOF system with a 1000-Hz Smart beam II laser. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as a matrix (5 mg/100 mL in 50% ACN:H<sub>2</sub>O), and 0.01 M NaCl was added as a cation dopant to increase signal sensitivity. The sample was spotted on a stainless-steel target plate, followed by the NaCl dopant and the matrix. The spot was dried in a vacuum prior to mass spectrometric analysis. MALDI-TOF MS via collision-induced dissociation (CID) was then performed to confirm the structure of the oligosaccharide. Tandem mass (MS/MS) spectrum was gained at 1 k eV collision energy with argon gas.

To identify monosaccharide moieties present in the structure of the oligosaccharide, an acid hydrolysis of the purified fucosylated trisaccharide was performed by adding 2 M HCl and incubated at 90 °C for 3 h. The hydrolysate was analyzed by HPLC to identify released monosaccharides (see section “[Carbohydrate Quantification](#)”).

### **The Effect of Lactose Concentration as an Acceptor Substrate on Fucosylated Trisaccharide Synthesis**

Synthesis reactions were performed with initial lactose concentrations of 15, 58, 146, 292, and 584 mM, each with 3.5 mM pNP-Fuc, in acetate buffer (0.1 mM, pH 5.0) at 60 °C. Reactions were monitored for 3 h. Synthesized oligosaccharides were quantified by HPLC, and the pNP was quantified by spectrophotometry. The water activity of the reaction system was determined at room temperature (25 °C) with a water activity meter Aqua Lab 4TE (Decagon, USA).

### **The Effect of the Molar Ratios of Substrates on Fucosylated Trisaccharide Synthesis**

To study the influence of the donor/acceptor ratio on synthesis of the fucosylated trisaccharide, data from previous experiments was considered, plus additional reactions with initial lactose concentrations of 29, 58, and 584 mM each with 24 mM pNP-Fuc, and reactions with initial lactose concentrations of 146, 292, 584, and 876 mM each with 0.9 mM pNP-Fuc. Molar yield was calculated based on the donor substrate.

### **Carbohydrate Quantification**

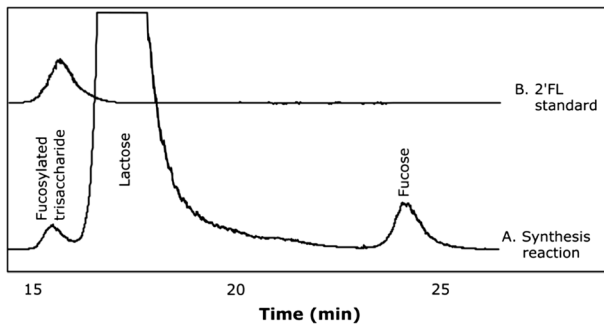
Carbohydrate quantification was performed by HPLC (Lab Alliance, State College, PA, USA) with an HC-75 (H+) column (Hamilton, Nevada, USA, 300 × 7.80 mm, 8 μm,) at 75 °C using a SOFTA 300 s light scattering detector (Chrom Tech, Minnesota, USA) with a nitrogen flow of 62.5 psi, spray chamber temperature of 10 °C, and a drift tube temperature of 45 °C. Distilled, deionized, and filtered water was used as the mobile phase with a flow rate of 0.3 mL/min. A standard 2'-fucosyllactose curve was used to quantify the fucosylated trisaccharide. Concentrations of monosaccharides (glucose, galactose, and fucose) were calculated using standard curves for each one.

## **Results and Discussion**

### **Synthesis of Fucosylated Trisaccharide**

In Fig. 1(A), a typical chromatogram of the products obtained in the transfucosylation reaction is shown, and it was observed that the retention time of the trisaccharide synthesized was similar to 2'-fucosyllactose (Fig. 1(B)). As can be noted in Fig. 1(A), in the reaction system, the enzyme performed the hydrolysis of pNP-Fuc as well as the transfucosylation reaction, resulting in the production of fucosylated trisaccharide.

Figure 2 shows the progression of a typical transfucosylation reaction. In this case, the data correspond to a lactose concentration of 292 mM. The final concentration of fucosylated trisaccharide synthesized was 0.52 mM at 180 min. The donor substrate, pNP-Fuc, was

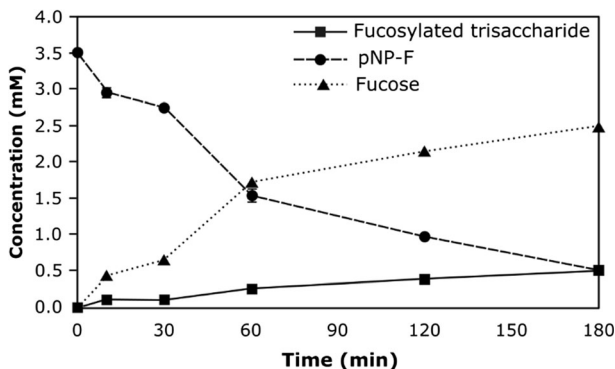


**Fig. 1** Typical chromatograms obtained by HPLC from (A) samples of the enzymatic reactions and (B) a standard of 2'-fucosyllactose (2'FL)

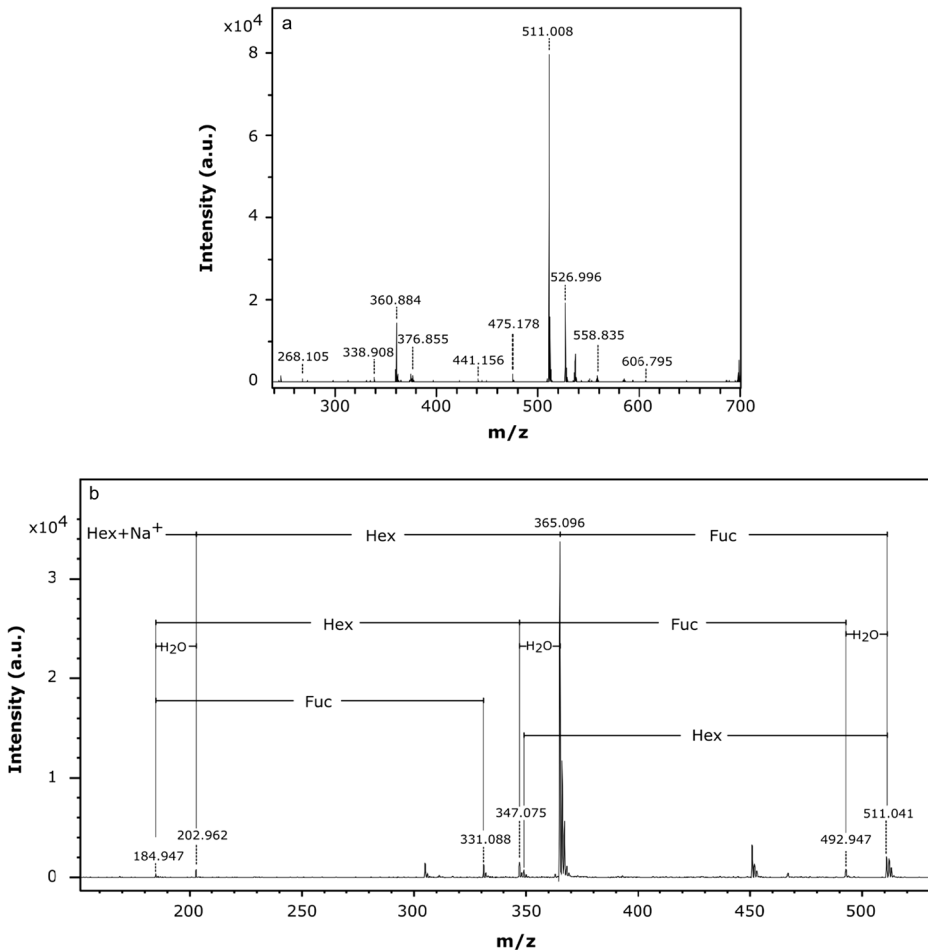
hydrolyzed during this time, while some of the fucose was transferred to lactose. Untransferred fucose was accumulated in the medium as free fucose. Lezyk et al. [29] observed a similar result when they studied fucosylation reactions with  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* in a reaction at pH 7.0 using 25 mM pNP-Fuc and 100 mM lactose for 70 min at 30 °C.

### Identification of Synthesized Fucosylated Trisaccharide

The synthesized oligosaccharide was isolated from the reaction mixture by HPLC and then subjected to MALDI-TOF MS. In the MS spectrum (Fig. 3a), the strongest signal ( $m/z$  511.008) corresponds to a mass of fucosyllactose plus sodium, and as shown in its MS/MS spectrum (Fig. 3b), its fragmentation releases two hexose and one fucose moiety ( $[Hex_2 + Fuc + Na^+]$ ). Identity of these moieties was confirmed by HPLC in Fig. 4(A) which shows a chromatogram of the purified trisaccharide. Once this compound was acid-hydrolyzed, moieties released from its structure were identified as glucose, galactose, and fucose by HPLC (Fig. 4(B)). Data from the MS/MS spectrum in conjunction with acid hydrolysis/HPLC revealed that the synthesized oligosaccharide corresponds to fucosyllactose. Chin et al. [30] employed MALDI-TOF MS to identify a partially purified 2'-fucosyllactose produced by an engineered *E. coli*, and they found a fucose and two hexoses plus sodium in the structure of the produced trisaccharide. Lezyk et al. [29] employed the fucosidase from *T. maritima* to transfer

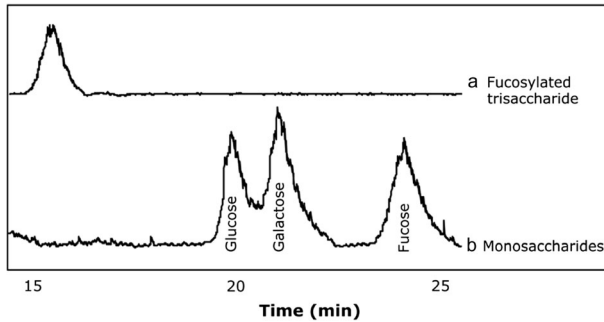


**Fig. 2** Kinetic of transfucosylation catalyzed by  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Reaction was performed at 60 °C using 3.5 mM pNP-Fuc as the donor, 292 mM lactose as the acceptor, and 0.065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase. All reacts were dissolved in 0.1 M acetate buffer at pH 5.0



**Fig. 3** MALDI-TOF MS analysis of purified fucosylated trisaccharide. (A) MS spectrum of partially purified oligosaccharides, (B) MS/MS spectrum of oligosaccharides as precursor ions ( $m/z$  511.008). DHB was used as a matrix (5 mg/100 mL in 50% ACN:H<sub>2</sub>O), and 0.01 M NaCl was added as dopant. MS/MS spectrum was gained at 1 k eV collision energy with argon gas

fucose from pNP-Fuc to lactose. According to these authors, main synthesis compounds were 2'-fucosyllactose and self-condensation product Fuc-Fuc-pNP, identified by high-performance anion exchange chromatography (HPAEC-PAD) and nuclear magnetic resonance (NMR). In both cases,  $\alpha$ -1,2 bonds were formed. In the current work, same enzyme and substrates were employed, which suggests the formation of a bond  $\alpha$ -1,2, so the identity of compound formed could be 2'-fucosyllactose. On the other hand, at reaction conditions used in the current work, no self-condensation product of the pNP-Fuc was found. Osanjo et al. [31] studied the transfucosylation capacity of fucosidase from *T. maritima*, employing pNP-Fuc as donor and pNP-Gal as acceptor. Main product of this transference was Fuc-Gal-pNP with an  $\alpha$ -1,2 bond, followed by the  $\alpha$ -1,6 isomer of this compound; while using pNP-Fuc as only acceptor,  $\alpha$ -1,3 bonds were formed. It has been reported that human milk fucosylated oligosaccharides, like 2'-fucosyllactose as well as its  $\alpha$ -1,3 isomer 3-fucosyllactose, exert activities as



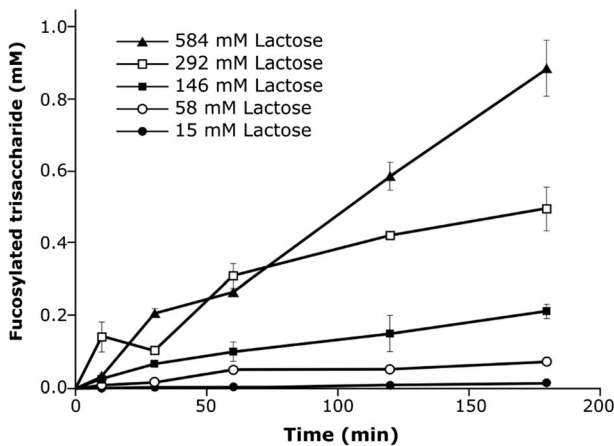
**Fig. 4** Chromatograms from purified fucosylated trisaccharide (a) and monosaccharides obtained after acid hydrolysis of purified fucosylated trisaccharide (b). Acid hydrolysis was carried with HCl 2 M, for 3 h at 90 °C. Chromatography was performed in a HC-75 (H+) column at 75 °C, employing Milli-Q® water as mobile phase with a flow rate of 0.3 mL/min

immunomodulators, prebiotic, and anti-infectious, for example, they inhibit binding of *C. jejuni*, enteropathogenic *E. coli*, and *P. aeruginosa* among others to human cells [7, 32, 33].

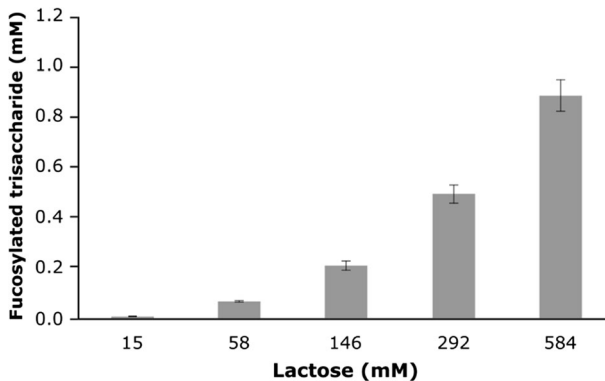
### The Effect of Lactose Concentration as an Acceptor on Fucosylated Trisaccharide Synthesis

Figure 5 shows the time course for the synthesis of fucosylated trisaccharide depending on the initial lactose concentration; increasing the concentration of lactose from 15 to 584 mM caused increase in oligosaccharide content from 0.011 to 0.883 mM. This correlation was commonly observed in studies about galactooligosaccharide synthesis using transgalactosylation activity of  $\beta$ -galactosidase [34].

And as shown in Fig. 6, the highest concentration of the fucosylated trisaccharide ( $\alpha = 0.05$ ) was obtained by using lactose at 584 mM and it was 0.883 mM (yield 25.2%). This yield is comparable with those reported previously by other authors that used fucosidases for



**Fig. 5** Kinetics of synthesis of fucosylated trisaccharide at different concentrations of lactose. Reactions were performed during 3 h at 60 °C using 3.5 mM pNP-Fuc as the donor; lactose as acceptor substrate at concentrations 15, 58, 146, 292, and 584 mM; and 0.065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase. All reacts were dissolved in 0.1 M acetate buffer at pH 5.0



**Fig. 6** Effect of lactose concentration as an acceptor substrate on fucosylated trisaccharide synthesis at 3 h of reaction. Reactions were performed at 60 °C using 3.5 mM pNP-Fuc as the donor, different lactose concentrations as the acceptor, and 0.065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase. All reacts were dissolved in 0.1 M acetate buffer at pH 5.0

synthesis of fucosylated oligosaccharides. Ajisaka et al. [27] employed  $\alpha$ -L-fucosidase from *Penicillium multicolor* for the synthesis of  $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-GlcNAc (yield 49%). Furthermore, Zeuner et al. [24] and Petschacher and Nidetzky [35] reported that typically, wild-type fucosidases can reach a 30–40% yield in transfucosylation. According to the above, it is evident that the concentration of substrate and enzyme origin determines the yields of the synthesis.

The rate of synthesis of the fucosylated trisaccharide is shown in Table 1. As the concentration of lactose (the acceptor substrate) increased, the rate of synthesis increased and changed in order of magnitude. The highest synthesis rate was obtained with a lactose concentration of 584 mM ( $\alpha = 0.05$ ). The relationship between the high lactose concentration and the high rate of synthesis of the oligosaccharide is most likely due to the lactose that participates in the reaction, and removes fucose from the active center of the enzyme-substrate complex, releasing the  $\alpha$ -L-fucosidase for faster pNP-Fuc conversion. This was reported by Warmerdam et al. [36], who used  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* and 2-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as the donor substrate and lactose as the acceptor.

Moreover, the water activity had no influence on the synthesis of the fucosylated trisaccharide since it remained in the range of 0.98–0.99 (Table 1).

**Table 1** Effect of lactose on rates ( $v_o$ ) of fucosylated trisaccharide synthesis and  $a_w$

Lactose concentration (mM)	$v_o$ synthesis (mM/min)	$a_w$
15	$0.8 \pm 0.2 \times 10^{-4}$	0.9947
58	$9.0 \pm 0.5 \times 10^{-4}$	0.9940
146	$14.5 \pm 3.3 \times 10^{-4}$	0.9934
292	$38.0 \pm 1.0 \times 10^{-4}$	0.9916
584	$67.5 \pm 4.8 \times 10^{-4}$	0.9874

Reactions were performed for 3 h at 60 °C using 3.5 mM pNP-F as the donor, different lactose concentrations as the acceptor, and 0.065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase. All reacts were dissolved in 0.1 M acetate buffer at pH 5.0

**Table 2** Effect of the donor/acceptor ratio on fucosylated trisaccharide synthesis

pNP-F (mM)	Lactose (mM)	D/A ratio	Fucosylated trisaccharide (mM)	Yield* (%)
24	29	0.828	0.018 ± 0.002	0.08 ± 0.01
24	58	0.414	0.025 ± 0.004	0.10 ± 0.01
24	584	0.041	0.751 ± 0.034	3.13 ± 0.14
3.5	15	0.233	0.011 ± 0.001	0.31 ± 0.01
3.5	58	0.06	0.07 ± 0.004	1.99 ± 0.11
3.5	146	0.024	0.212 ± 0.020	6.04 ± 0.57
3.5	292	0.012	0.496 ± 0.036	14.13 ± 1.01
3.5	584	0.006	0.883 ± 0.64	25.16 ± 1.83
0.9	146	0.006	0.008 ± 0.002	0.85 ± 0.17
0.9	292	0.003	0.081 ± 0.001	9.26 ± 0.11
0.9	584	0.002	0.190 ± 0.012	21.54 ± 1.33
0.9	876	0.001	0.286 ± 0.010	32.47 ± 1.06

Reactions were performed for 3 h at 60 °C using pNP-F as the donor, lactose as the acceptor, and 0.065 U/mL of  $\alpha$ -L-fucosidase. All reacts were dissolved in 0.1 M acetate buffer at pH 5.0

\*Molar yield was calculated based on the donor substrate

### The Effect of the Donor/Acceptor Ratio on Fucosylated Trisaccharide Synthesis

The effect of the donor/acceptor (D/A) ratio on the synthesis of the fucosylated trisaccharide is shown in Table 2, and as this ratio decreased, the synthesis rate increased for all concentrations of the donor substrate. At a D/A ratio of 0.001, a maximum yield of 32.5% was obtained, which is to date the highest yield of transfucosylation reported for the wild-type  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*.

As commented previously, Osanjo et al. [31] employed the fucosidase from *T. maritima* to transfer fucose from pNP-Fuc to pNP-Gal in D/A ratios of 1, 0.5, and 0.2 with yields of transfucosylation of 17.3, 29, and 31%. Likewise, Lezyk et al. [29] employed the fucosidase from *T. maritima* to transfer fucose from pNP-Fuc to lactose in D/A ratios of 0.8 and 0.25 with yields of synthesis of 2'-fucosyllactose of 1 and 6.4% respectively. Yields reported by these authors are lower than those reported in the current work, probably due to lower D/A ratio and different reaction conditions. Murata et al. [37] employed the fucosidase from *Alcaligenes* sp. to transfer fucose from pNP-Fuc to lactose (D/A ratio 0.05), obtaining 3-fucosyllactose (yield 34%). Similarly, Suwasono and Rastall [38] reported the highest synthesis yield at the lowest D/A ratio when using  $\alpha$ -1,2-mannosidase from *Aspergillus phoenicis* and mannose as the donor and maltose as the acceptor. An overview of D/A ratios used in transfucosylation reactions by several fucosidases has been made by Zeuner et al. [24], who reported that a low D/A ratio increases the synthesis yield, even if the amount of water in the medium is high. In summary, when glycosidases are employed for transglycosylation, the transference is improved if the D/A ratio is small.

### Conclusions

Our results show that  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was able to synthesize fucosyllactose through transfucosylation; moreover, the initial concentration of lactose as an acceptor substrate favored the synthesis of the fucosylated trisaccharide. In particular, the effect of the D/A ratio reached the maximum yield of 32.5% at a D/A ratio of 0.001. Additionally, the presence



of fucose in the synthesized trisaccharide is important because it has been reported that 2'-fucosyllactose is one of the most abundant oligosaccharides in human milk, and it inhibits the adhesion of pathogens, in the intestine. Therefore, it is possible that the synthesized fucosylated trisaccharide can also perform this biological function.

**Funding information** This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (financial support number 50370).

**Compliance with Ethical Standards**

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Li, M., Liu, X.-W., Shao, J., Shen, J., Jia, Q., Yi, W., Song, J. K., Woodward, R., Chow, C. S., & Wang, P. G. (2008). Characterization of a novel  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase of *Escherichia coli* O128:B12 and functional investigation of its common motif. *Biochemistry*, *47*(1), 378–387.
- Venditti, J. J., Swann, J. M., & Bean, B. S. (2010). Hamster sperm-associated alpha-L-fucosidase functions during fertilization. *Biology of Reproduction*, *82*(3), 572–579.
- Bode, L. (2009). Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*, *67*(11), S183–S191.
- Ninonuevo, M. R., Park, Y., Yin, H. F., Zhang, J. H., Ward, R. E., Clowers, B. H., German, J. B., Freeman, S. L., Killeen, 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.
- Crane, J. K., Azar, S. S., Stam, A., & Newburg, D. S. (1994). Oligosaccharides from human milk block binding and activity of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in T84 intestinal cells. *The Journal of Nutrition*, *124*(12), 2358–2364.
- 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*(48), 11, 1.
- Weichert, S., Jennewein, S., Hüfner, E., Weiss, C., Borkowski, J., Putze, J., & Schrotten, H. (2013). Bioengineered 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose inhibit the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and enteric pathogens to human intestinal and respiratory cell lines. *Nutrition Research*, *33*(10), 831–838.
- Thurl, S., Munzert, M., Boehm, G., Matthews, C., & Stahl, B. (2017). Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutrition Reviews*, *75*(11), 920–933.
- Newburg, D. S. (2009). Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *Journal of Animal Science*, *87*(13), 26–34.
- Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M. L., Meinen-Derr, J. K., Farkas, T., Chaturvedi, P., Pickering, L. K., & Newburg, D. S. (2004). Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *The Journal of Pediatrics*, *145*(3), 297–303.
- McVeagh, P., & Miller, J. B. (1997). Human milk oligosaccharides: only the breast. *Journal of Paediatrics and Child Health*, *33*(4), 281–286.
- 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.
- David, B. G., & Hancock, S. M. (2003). The uses of glycoprocessing enzymes in synthesis. In H. M. I. Osborne (Ed.), *Best synthetic methods, vol: The uses of glycoprocessing enzymes in synthesis* (pp. 385–426). U. S. A.: Academic Press.
- Abdul Manas, N. H., Jonet, M. A., Abdul Murad, A. M., Mahadi, N. M., & Illias, R. M. (2015). Modulation of transglycosylation and improved malto-oligosaccharide synthesis by protein engineering of maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1. *Process Biochemistry*, *50*(10), 1572–1580.
- Pérez-Sánchez, M., Cortés Cabrera, Á., García-Martín, H., Sinisterra, J. V., García, J. I., & Hemáiz, M. J. (2011). Improved synthesis of disaccharides with *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase using bio-solvents derived from glycerol. *Tetrahedron*, *67*(40), 7708–7712.
- Benešová, E., Lipovova, P., Dvorakova, H., & Kralova, B. (2013). Alpha-L-fucosidase from *Paenibacillus thiaminolyticus*: its hydrolytic and transglycosylation abilities. *Glycobiology*, *23*(9), 1052–1065.

17. Escamilla-Lozano, Y. (2011). Síntesis de oligosacáridos fucosilados por vía enzimática mediante reacciones de fucosilación. PhD thesis. In *Universidad Autónoma Metropolitana*. Mexico: Ciudad de México.
18. Rodríguez-Díaz, J., Carbajo, R. J., Pineda-Lucena, A., Monedero, V., & Yebra, M. J. (2013). Synthesis of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides by transfucosylation using alpha-L-fucosidases from *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3847–3850.
19. Crout, D. H. G., & Vic, G. (1998). Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(1), 98–111.
20. Albayrak, N., & Yang, S. T. (2002). Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1), 8–19.
21. Cardelle-Cobas, A., Villamiel, M., Olano, A., & Corzo, N. (2008). Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using pectinex ultra SP-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(6), 954–961.
22. Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V., & Yebra, M. J. (2011). Utilization of natural fucosylated oligosaccharides by three novel alpha-L-fucosidases from a probiotic *Lactobacillus casei* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(2), 703–705.
23. Tarling, C. A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Boume, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47394–47399.
24. 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.
25. 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.
26. 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 13119–13128.
27. Ajisaka, K., Fujimoto, H., & Miyasato, M. (1998). An alpha-L-fucosidase from *Penicillium multicolor* as a candidate enzyme for the synthesis of alpha (1 $\rightarrow$ 3)-linked fucosyl oligosaccharides by transglycosylation. *Carbohydrate Research*, 309(1), 125–129.
28. 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.
29. Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulf, 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), e0147438.
30. 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.
31. Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, 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.
32. Sotgiu, S., Arru, G., Fois, M. L., Sanna, A., Musumeci, M., Rosati, G., & Musumeci, S. (2006). Immunomodulation of fucosyl-lactose and lacto-N-fucopentaose on mononuclear cells from multiple sclerosis and healthy subjects. *International Journal of Biomedical Sciences*, 2(2), 114–120.
33. Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), 1147–1162.
34. Wojciechowska, A., Klewicki, R., Sojka, M., & Grzelak-Błaszczak, K. (2018). Application of transgalactosylation activity of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for the synthesis of ascorbic acid galactoside. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(1), 386–400.
35. 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*, 23561–83.
36. Warmerdam, A., Wang, J., Boom, R. M., & Janssen, A. E. (2013). Effects of carbohydrates on the oNPG converting activity of beta-galactosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6458–6464.
37. Murata, T., Morimoto, S., Zeng, X., Watanabe, S., & Usui, T. (1999). Enzymatic synthesis of  $\alpha$ -L-fucosyl-N-acetylglucosamines and 3'-O- $\alpha$ -L-fucosyllactose utilizing  $\alpha$ -L-fucosidases. *Carbohydrate Research*, 320(3), 192–199.
38. Suwasano, S., & Rastall, R. A. (1998). Synthesis of oligosaccharides using immobilised 1,2-alpha-mannosidase from *Aspergillus phoenicis*: Immobilisation-dependent modulation of product spectrum. *Biotechnology Letters*, 20(1), 15–17.



# 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

Francisco Guzmán-Rodríguez<sup>1</sup> · Sergio Alatorre-Santamaría<sup>1</sup> · Lorena Gómez-Ruiz<sup>1</sup> · Gabriela Rodríguez-Serrano<sup>1</sup> · Mariano García-Garibay<sup>1,2</sup> · Alma Cruz-Guerrero<sup>1</sup>

Received: 28 February 2018 / Accepted: 30 July 2018  
© Springer Japan KK, part of Springer Nature 2018

## Abstract

The influence of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{NaCl}$  in the hydrolytic activity and the influence of  $\text{CaCl}_2$  in the synthesis of fucosylated oligosaccharides using  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* were evaluated. The hydrolytic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* displayed a maximum increase of 67% in the presence of 0.8 M  $\text{NaCl}$  with water activity ( $a_w$ ) of 0.9672 and of 138% in the presence of 1.1 M  $\text{CaCl}_2$  ( $a_w$  0.9581). In addition, the hydrolytic activity was higher when using  $\text{CaCl}_2$  compared to  $\text{NaCl}$  at  $a_w$  of 0.8956, 0.9581 and 0.9672. On the other hand, the effect of  $\text{CaCl}_2$  in the synthesis of fucosylated oligosaccharides using 4-nitrophenyl-fucose as donor substrate and lactose as acceptor was studied. In these reactions, the presence of 1.1 M  $\text{CaCl}_2$  favored the rate of transfucosylation, and improved the yield of synthesis duplicating and triplicating it with lactose concentrations of 58 and 146 mM, respectively.  $\text{CaCl}_2$  did not significantly affect hydrolysis rate in these reactions. The combination of the activating effect of  $\text{CaCl}_2$ , the decrement in  $a_w$  and lactose concentration had a synergistic effect favoring the synthesis of fucosylated oligosaccharides.

**Keywords** Fucosidase · Fucosylated oligosaccharides · *Thermotoga maritima* · Transfucosylation · Water activity

## Abbreviations

FUCOS	Fucosyl oligosaccharides
$a_w$	Water activity
pNP-Fuc	4-nitrophenyl-fucose
pNP	4-nitrophenol
HSA	Hydrolytic specific activity
A/D	Acceptor/donor molar ratio
$V_{\text{trans}}$	Transfucosylation rate
$V_{\text{hyd}}$	Hydrolysis rate

## Introduction

The fucosylated oligosaccharides (FUCOS) present in human milk offer several health benefits, for example, the trisaccharide 2'-fucosyllactose has shown to offer protection against intestinal pathogens such as *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*, and favors the growth of beneficial microbiota such as *Bifidobacterium* (Newburg 2009; Matsuiki et al. 2016). An alternative for the in vitro synthesis of this type of oligosaccharides is through enzymatic methods. For that purpose, fucosidases, had been used for the synthesis of FUCOS through a reaction known as transfucosylation; in this case, the substrate hydrolyzed by the enzyme works as donor of the fucosyl group and a second substrate, for example a disaccharide, works as an acceptor of this group (Palcic 2011). To increase the synthesis yields through transfucosylation over hydrolysis, different strategies have been designed based on the molar ratio between donor and acceptor substrate, temperature, pH, enzyme source, protein engineering and water activity ( $a_w$ ), among others (Zeuner et al. 2014). By reducing the  $a_w$ , there is a lower proportion of water molecules available to participate as nucleophile in the hydrolysis reaction, therefore, the thermodynamic

Communicated by H. Atomi.

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

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

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma, Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, CP 52006, Lerma de Villada, Edo. de México, Mexico

balance of the reaction favors the synthesis of FUCOS by transfucosylation (Vetere et al. 1997). The reduction of  $a_w$  of the enzymatic systems to increase the synthesis yields in the reaction of transglycosylation has been commonly tackled using organic solvents (Cruz-Guerrero et al. 2006; Vera et al. 2017). Another alternative to reduce  $a_w$  is by adding inorganic salts, it has been reported that some cations play an important role in the structure of many enzymes increasing their catalytic activity (Bronnenmeier et al. 1995; Vieille and Zeikus 2001). For example, Winterhalter and Liebl (1995) reported that xylanase B from *Thermotoga maritima* MSB8 had higher activity in presence of NaCl 0.5 M; on the other hand, Aminoff and Furukawa (1970) reported that  $\alpha$ -L-fucosidase from *Clostridium perfringens* increased its activity in more than 60% due to the presence of 2 M  $\text{Ca}^{2+}$ . The aim of this work was to study the influence of  $\text{CaCl}_2$  and NaCl in the hydrolytic activity and transfucosylation activity for the synthesis of fucosylated oligosaccharides using the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*.

## Materials and methods

### Materials

Lactose, 4-nitrophenyl-fucose (pNP-Fuc) and 4-nitrophenol (pNP) were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). The acetic acid and sodium acetate to prepare the buffer solution, as well as the NaCl and  $\text{CaCl}_2$  were purchased from J. T. Baker (Estado de México, Mexico). The enzyme that was used was the recombinant hyperthermophilic  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*, which was from Megazyme (Leinster, Ireland), labeled as 5 U/mL (2.6 U/mg) in  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and diluted 1:100 in a buffer solution of acetates 0.1 M, pH 5.

### Electrophoretic analysis

Fucosidase purity was assessed by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) as described by Laemmli (1970) with 10% (w/v) polyacrylamide gels. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. Molecular mass was estimated with low-range molecular mass protein standards (Bio-Rad, California, USA).

### Determination of $a_w$ of $\text{CaCl}_2$ and NaCl solutions

Based on what Stokes and Robinson (1949) reported, solutions of  $\text{CaCl}_2$  were prepared with expected values of  $a_w$  from 0.896 to 0.995. For that, solutions of  $\text{CaCl}_2$  0.5, 0.9, 1.1 and 2.2 mM were prepared in a buffer solution of acetates (0.1 M, pH 5) and their  $a_w$  was determined in an Aqualab 4TE equipment (Decagon, Washington, USA) at

25 °C. Afterwards, solutions of NaCl were prepared with equivalent values of  $a_w$ , using concentrations of NaCl 0.5, 0.8, 1.1 and 2.2 mM in a buffer solution of acetates (0.1 M, pH 5) and their  $a_w$  was verified.

### Effect of $a_w$ in the hydrolytic activity of fucosidase

Volumes of 450  $\mu\text{L}$  of a solution 3.5 mM pNP-Fuc and 50  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* were used, both prepared in solutions with different concentrations of  $\text{CaCl}_2$  and NaCl described in previous section; the reactions were incubated during 40 min at 60 °C in a UV-1601 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Released pNP was quantified by measuring every minute the absorbance at 410 nm and interpolating this value in a standard curve of such compound. The specific activity was expressed as  $\mu\text{mol}$  of released pNP per minute per milligram of protein at pH 5 and 60 °C.

### Effect of $\text{CaCl}_2$ in the transfucosylation and hydrolytic activity during the synthesis of fucosylated oligosaccharides

Volumes of 450  $\mu\text{L}$  of 3.5 mM pNP-Fuc and lactose in two different concentrations (58 and 146 mM) were used, plus 50  $\mu\text{L}$  of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. These reactions were produced in a buffer solution of acetates (0.1 M, pH 5) both in the absence and in the presence of 1.1 M  $\text{CaCl}_2$ . The reaction mixture was incubated at 60 °C for 3 h, and aliquots were taken at regular intervals. The synthesized FUCOS was quantified by HPLC as described below and released pNP was quantified spectrophotometrically as described above. Transfucosylation and hydrolytic activity in these reactions were expressed as specific activity, in  $\mu\text{mol}$  of synthesized FUCOS or released pNP (according to the case) per minute per milligram of protein at pH 5 and 60 °C.

### Quantification of transfucosylation products

The FUCOS obtained through transfucosylation reactions were quantified using HPLC Lab Alliance Series II (Scientific Systems, Pennsylvania, USA) with an HC75 (H+) column of 300  $\times$  7.80 mm (Hamilton, Nevada, USA) placed in an oven at 75 °C and Milli-Q® water was used as mobile phase, at a flow rate of 0.3 mL/min. A light scattering detector model SofTA 300S (Chrom Tech, Minnesota, USA) was used, at a nitrogen flow rate of 62.5 psi, a temperature in the nebulizer of 10 °C and an evaporation temperature of 45 °C. A standard 2'-fucosyllactose curve was used to quantify the FUCOS.

## Statistical analysis

All the experiments were conducted by triplicate and the results are reported as a mean with standard deviation. The statistical analysis was carried out by using a SPSS software version 19.0 for Windows (IBM, New York, USA) to perform an analysis of variance (ANOVA) and a Duncan's Multiple Range Test with a level of significance of 0.05.

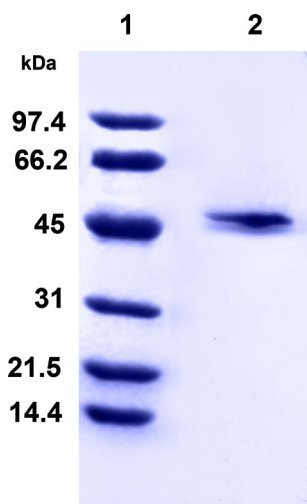
## Results and discussion

### Fucosidase purity

As can be seen in Fig. 1, the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* (Megazyme<sup>®</sup>) employed in this work is pure with a molecular mass of 50.7 kDa. This result is similar with that reported by Lezyk et al. (2016) and Zeuner et al. (2018) who mentioned that  $\alpha$ -L-fucosidases from *T. maritima* had a theoretical molecular weight between 50 and 52 kDa.

### Determination of $a_w$ of CaCl<sub>2</sub> and NaCl solutions

The concentrations of salts that were used and their impact on  $a_w$  are shown in Table 1. As it can be observed, the  $a_w$  fluctuated between 0.8956 and 0.9956. The effect of adding salts on  $a_w$  was evaluated, given that it has been observed that this property has influence on the functioning of enzymes, for example, some glycosidases have shown a higher capacity of transglycosylation at values of  $a_w$  between 0.44 and 0.99 (Cruz-Guerrero et al. 2006; Bridiau et al. 2010; Zeuner et al. 2014; Vera et al. 2017).



**Fig. 1** SDS-PAGE of recombinant  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*. Lane 1, molecular mass marker; lane 2,  $\alpha$ -L-fucosidase

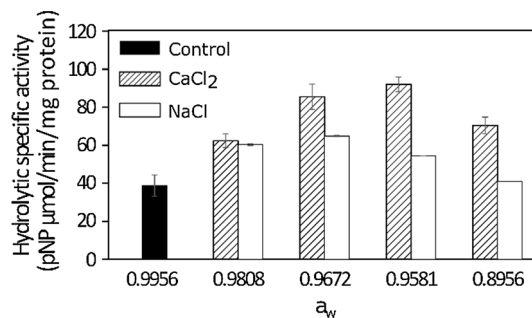
**Table 1** Water activity of CaCl<sub>2</sub> and NaCl solutions

CaCl <sub>2</sub> (M)	NaCl (M)	$a_w$
0	0	0.9956 ± 0.0002
0.5	0.5	0.9808 ± 0.0005
0.9	0.8	0.9672 ± 0.0004
1.1	1.1	0.9581 ± 0.0004
2.2	2.2	0.8956 ± 0.0006

Salts were used independently from one another in a buffer solution of acetates 0.1 M pH 5 and were maintained at 25 °C

### Effect of $a_w$ in the hydrolytic activity of fucosidase

The hydrolytic specific activity (HSA) of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* was quantified at different  $a_w$ , obtained because of the presence of CaCl<sub>2</sub> and NaCl (indicated in previous section). As it can be observed in Fig. 2, there was an increase in HSA as  $a_w$  decreased. In presence of CaCl<sub>2</sub>, the highest HSA was 92.7  $\mu$ mol/min/mg protein at a  $a_w$  of 0.9581 (1.1 M CaCl<sub>2</sub>), and this means an increment of 138% of HSA compared to control; in the case of NaCl, HSA was 65.3  $\mu$ mol/min/mg protein at a  $a_w$  of 0.9672 (NaCl 0.8 M), an increment of 67% compared to control. It was also observed that when  $a_w$  was 0.9581 in the case of NaCl and 0.8956 in the case of CaCl<sub>2</sub>, the HSA decreased, possibly due to the phenomenon of saline precipitation that occurs in aqueous solutions of high ionic strength, which minimizes electrostatic repulsion of charged proteins, causing their precipitation (Möller et al. 2012). Besides, it can be observed that at given values of  $a_w$  of 0.8956, 0.9581 and 0.9672, the fucosidase activity was higher in the presence of CaCl<sub>2</sub> compared to NaCl ( $\alpha=0.05$ ), therefore, in these cases, the fucosidase activity could show dependence to the type of salt that was used. Given the former results, it can be said that the highest specific activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *T.*



**Fig. 2** Hydrolytic-specific activity at different values of  $a_w$ , using CaCl<sub>2</sub> or NaCl, plus a control absent of these salts. Reactions were catalyzed by  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*, using 3.5 mM pNP-Fuc as donor substrate, in a buffer solution of acetates 0.1 M pH 5, at 60 °C. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates

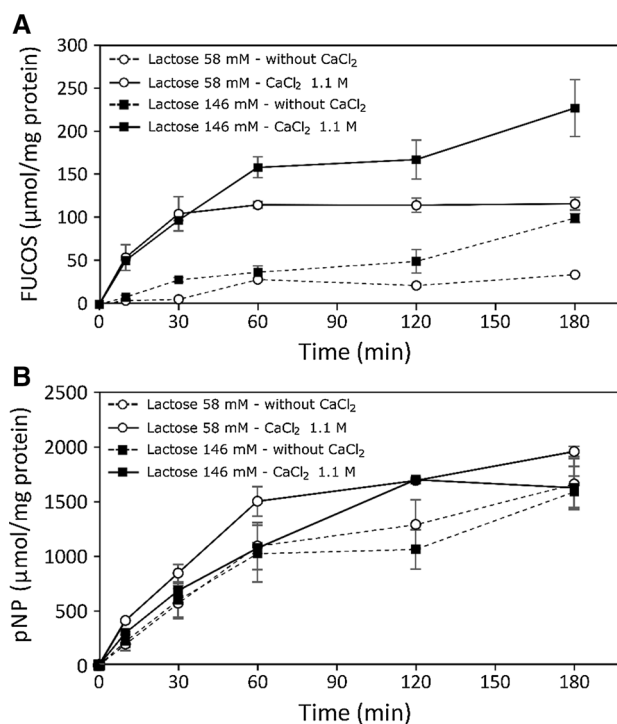
*maritima* was obtained in the presence of 1.1 M  $\text{CaCl}_2$  ( $a_w$  of 0.9581).

Several research groups have observed that adding inorganic salts in different concentrations favors the stability of the tridimensional structure of the enzyme and its activity, and this can be attributed to: the effect of salt on  $a_w$  and the specific interaction between the cation and the structure of the protein (Vieille and Zeikus 2001). It has been reported that some enzymes from *T. maritima* show higher activity in the presence of  $\text{Na}^+$ . For example, Winterhalter and Liebl (1995) reported that xylanase B from *T. maritima* MSB8 had higher activity in the presence of  $\text{NaCl}$  0.5 M. Bronnenmeier et al. (1995) reported that two cellulases from *T. maritima* DSM 3109, increased their thermostability in the presence of  $\text{NaCl}$  1 M, in a way that they could keep more than 90% of their activity during 6 h of incubation at 80 °C. Besides  $\text{Na}^+$ , the ion  $\text{Ca}^{2+}$  has also been reported as a stabilizer of fucosidases structure of different origins. Nagae et al. (2007) reported that  $\text{Ca}^{2+}$  stabilizes the tridimensional structure of 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. Regarding the effect of cations on activity of enzymes, Aminoff and Furukawa (1970) reported that  $\alpha$ -L-fucosidase from *Clostridium perfringens* increases its activity in more than 60% due to the presence of  $\text{CaCl}_2$  2 M. Liu et al. (2016) reported that fucosidases Eo0918 and Eo3812 from *Emticicia oligotrophica* increased their activity 50 and 56%, respectively, in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Tarling et al. (2003) studied the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*, and found that the presence of  $\text{CaCl}_2$  in a 10 mM concentration had no effect on the fucosidase activity. These results do not coincide with what we are reporting in this work, possibly because the concentration of  $\text{CaCl}_2$  that those authors used was not enough to appreciate an increase in the activity of the enzyme. Other cations (magnesium, cobalt, manganese, nickel, and zinc) at 10 mM concentrations, were previously studied by Tarling et al. (2003) with no effect on enzymatic activity of fucosidase from *T. maritima*. Besides, in the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* that was studied,  $\text{Ca}^{2+}$  could play an important role in the formation of the active site that could contribute to the increase that was observed in the fucosidase activity (hydrolytic), however, additional studies are necessary to confirm this hypothesis.

### Effect of $\text{CaCl}_2$ in the transufucosylation and hydrolytic activity for the synthesis of fucosylated oligosaccharides

As shown in the previous experiments,  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* exert their highest activity in presence of 1.1 M  $\text{CaCl}_2$ , and that was the reason why  $\text{CaCl}_2$  was selected (and in this specific concentration) as a factor to be studied in reactions of synthesis of fucosylated oligosaccharide by transufucosylation. Further,  $\text{CaCl}_2$  in this

concentration was able to decrease the  $a_w$  of the reaction system to 0.9581, which implies a lower quantity of water available to participate in the hydrolysis reactions, that way favoring the reactions of transufucosylation. Figure 3a shows the effect of  $\text{CaCl}_2$  and two lactose concentrations (58 and 146 mM) on the synthesis of FUCOS while Fig. 3b shows the hydrolysis of pNP-Fuc during the synthesis reaction. As it can be seen, by comparing reactions with and without  $\text{CaCl}_2$ , it is clear that reactions of transufucosylation in the presence of  $\text{CaCl}_2$  were favored. On the other hand, there are no differences in the hydrolytic activity. Together with these results, as can be observed in Table 2,  $a_w$  decreased because of the presence of  $\text{CaCl}_2$  and this probably facilitated the synthesis of FUCOS. In this table, it can also be seen that hydrolysis rate ( $V_{\text{hyd}}$ ) diminished when increasing lactose concentration from 0 to 58 mM, both in absence and in the presence of  $\text{CaCl}_2$ ; while transufucosylation rate ( $V_{\text{trans}}$ ) increased when raising lactose concentration. The relationship between the high lactose concentration and the high rate of synthesis of the oligosaccharide is most likely due to the lactose that participates in the reaction, and removes fucose from the active center of the enzyme–substrate complex,



**Fig. 3** Kinetics of transufucosylation (a) and hydrolysis (b), in the absence or the presence of 1.1 M  $\text{CaCl}_2$  at concentrations of lactose 58 and 146 mM. Reactions were catalyzed by  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*, using 3.5 mM pNP-Fuc as donor substrate and different concentrations of lactose, in a buffer solution of acetates 0.1 M pH 5, at 60 °C for 3 h. Error bars represent the standard deviation of the mean of triplicates

**Table 2** Hydrolysis ( $V_{\text{hyd}}$ ) and transglycosylation ( $V_{\text{trans}}$ ) rates at different reaction conditions

CaCl <sub>2</sub> (M)	PNP-Fuc (mM)	Lactose (mM)	A/D ratio	$a_w$	$V_{\text{hyd}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	$V_{\text{trans}}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	$V_{\text{trans}}/V_{\text{hyd}}^a$	Yield (%) <sup>b</sup>
0	3.5	0	0	0.9956 $\pm$ 0.0002	39.04 $\pm$ 1.99	–	–	–
0	3.5	58	17	0.9941 $\pm$ 0.0001	18.15 $\pm$ 3.53	0.47 $\pm$ 0.03	0.026	1.99 $\pm$ 0.11
0	3.5	146	42	0.9934 $\pm$ 0.0002	16.88 $\pm$ 4.32	0.76 $\pm$ 0.17	0.045	5.48 $\pm$ 0.28
1.1	3.5	0	0	0.9581 $\pm$ 0.0004	92.68 $\pm$ 1.36	–	–	–
1.1	3.5	58	17	0.9571 $\pm$ 0.0002	24.11 $\pm$ 2.34	3.18 $\pm$ 0.70	0.132	6.04 $\pm$ 0.57
1.1	3.5	146	42	0.9556 $\pm$ 0.0003	17.37 $\pm$ 0.64	3.12 $\pm$ 0.20	0.145	12.48 $\pm$ 1.81

<sup>a</sup> $V_{\text{trans}}/V_{\text{hyd}}$ , transglycosylation/hydrolysis ratios were calculated from the initials rates of formation of transglycosylation products over the initial rates of hydrolysis

<sup>b</sup>Yields were calculated with basis on donor substrate at 3 h of reaction

releasing the  $\alpha$ -L-fucosidase for faster pNP-Fuc conversion (Warmerdam et al. 2013). According to Rodríguez-Díaz et al. (2013) the higher  $V_{\text{trans}}/V_{\text{hyd}}$  ratio, the more favored is the synthesis of fucosylated compounds, and as seen in Table 2, when this ratio was increased, the synthesis yields of fucosylated compounds increased, which is more evident when the concentrations of lactose and CaCl<sub>2</sub> increased to the highest values. For example when CaCl<sub>2</sub> was added to reactions, yields of synthesis were triplicated and duplicated, at lactose concentrations of 58 and 146 mM, respectively, compared with reactions absent in this salt. Therefore, it can be said that the combination of the activating effect of CaCl<sub>2</sub>, the decrement in  $a_w$  and lactose concentration had a synergistic effect favoring the synthesis of FUCOS. A possible stabilizing effect of CaCl<sub>2</sub> on the enzyme could contribute to this synergism, as it has been observed in other glycosidases (Nagae et al. 2007).

The influence of  $a_w$  on the transglycosylation has been reported in several research works where glycosidases have been used for the synthesis of oligosaccharides. For example, Cruz-Guerrero et al. (2006) synthesized galactooligosaccharides of different molecular weight with a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase (GLY-001-02, Diversa Corp.) using lactose as substrate; the highest yields in the synthesis of these compounds were found when  $a_w$  was reduced to values between 0.44 and 0.66 by adding acetone as cosolvent. On the other hand, Bridiau et al. (2010) synthesized *N*-acetyllactosamine through the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*, using 2-nitrophenyl-galactose as donor substrate and *N*-acetyl glucosamine as acceptor, finding the best results when decreasing the  $a_w$  to 0.92 by adding acetonitrile as cosolvent. Vera et al. (2017) synthesized hexyl- $\beta$ -D-galactoside using the galactosidase from *Aspergillus oryzae*, in this case they used hexanol as an acceptor substrate and lactose as a donor substrate, the highest yields of transgalactosylation (60%) were found at a  $a_w$  of 0.94 by adding acetone as a cosolvent.

## Conclusions

CaCl<sub>2</sub> and NaCl influenced the hydrolytic activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*; of these two salts, the calcium had a higher activation on the enzyme, obtaining two times more hydrolytic activity at a  $a_w$  of 0.9581. On the other hand, the presence of 1.1 M CaCl<sub>2</sub> in synthesis reactions favored transglycosylation rate, while hydrolysis rate remained unchanged, thus favoring the synthesis of FUCOS, duplicating and triplicating the yields when using lactose concentrations of 58 and 146 mM, respectively, observing a synergistic effect between CaCl<sub>2</sub>,  $a_w$  and lactose concentration.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Aminoff D, Furukawa K (1970) Enzymes that destroy blood group specificity. I. Purification and properties of alpha-L-fucosidase from *Clostridium perfringens*. J Biol Chem 245:1659–1669
- 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. Biotechnol Prog 26:1278–1289
- Bronnenmeier K, Kern A, Liebl W, Staudenbauer WL (1995) Purification of *Thermotoga maritima* enzymes for the degradation of cellulosic materials. Appl Environ Microbiol 61:1399–1407
- Cruz-Guerrero AE, Gomez-Ruiz L, Viniestra-Gonzalez G, Barzana E, Garcia-Garibay M (2006) Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic beta-glycosidase in an organic medium. Biotechnol Bioeng 93:1123–1129
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685
- Lezyk M, Jers C, Kjaerulff L, Gotfredsen CH, Mikkelsen MD, Mikkelsen JD (2016) Novel  $\alpha$ -L-fucosidases from a soil metagenome

- for production of fucosylated human milk oligosaccharides. *PLoS One* 11:e0147438
- Liu S, Kulinich A, Cai ZP, Ma HY, Du YM, Lv YM, Liu L, Voglmeir J (2016) The fucosidase-pool of *Emticicia oligotrophica*: biochemical characterization and transfucosylation potential. *Glycobiology* 26:871–879
- Matsuki T, Yahagi K, Mori H et al (2016) A key genetic factor for fucosyllactose utilization affects infant gut microbiota development. *Nat Commun* 7:11939
- Möller J, Schroer MA, Erlkamp M, Grobelny S, Paulus M, Tiemeyer S, Wirkert FJ, Tolan M, Winter R (2012) The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense protein solutions: from nonlinear pressure response to protein crystallization. *Biophys J* 102:2641–2648
- Nagae M, Tsuchiya A, Katayama T, Yamamoto K, Wakatsuki S, Kato R (2007) Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *J Biol Chem* 282:18497–18509
- Newburg DS (2009) Neonatal protection by an innate immune system of human milk consisting of oligosaccharides and glycans. *J Anim Sci* 87:26–34
- Palcic MM (2011) Glycosyltransferases as biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 15:226–233
- Rodríguez-Díaz J, Carbajo R, Pineda-Lucena A, Monedero V, Yebra M (2013) Synthesis of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides by transfucosylation using  $\alpha$ -L-fucosidases from *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 79:3847–3850
- Stokes RH, Robinson RA (1949) Standard solutions for humidity control at 25 °C. *Ind Eng Chem* 41:2013
- Tarling CA, He S, Sulzenbacher G, Bignon C, Bourne Y, Henrissat B, Withers SG (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. *J Biol Chem* 278:47394–47399
- 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 Biochem* 58:128–136
- Vetere A, Galateo C, Paoletti S (1997) All-aqueous, regiospecific transglycosylation synthesis of 3-O- $\alpha$ -L-fucopyranosyl-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose, a building block for the synthesis of branched oligosaccharides. *Biochem Biophys Res Commun* 234:358–361
- Vieille C, Zeikus GJ (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:1–43
- Warmerdam A, Wang J, Boom RM, Janssen AE (2013) Effects of carbohydrates on the oNPG converting activity of  $\beta$ -galactosidases. *J Agric Food Chem* 61:6458–6464
- Winterhalter C, Liebl W (1995) Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl Environ Microbiol* 61:1810–1815
- Zeuner B, Jers C, Mikkelsen JD, Meyer AS (2014) Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *J Agric Food Chem* 62:9615–9631
- Zeuner B, Muschiol J, Holck J, Lezyk M, Gedde MR, Jers C, Mikkelsen JD, Meyer AS (2018) Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29  $\alpha$ -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnol* 41:34–45





## Employment of fucosidases for synthesis of fucosylated oligosaccharides with biological potential

Journal:	<i>Biotechnology and Applied Biochemistry</i>
Manuscript ID	BAB-18-0146.R1
Wiley - Manuscript type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Guzman-Rodriguez, Francisco; Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa, Biotechnology Alatorre-Santamaria, Sergio; Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa, Biotechnology Gómez-Ruiz, Lorena; Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa Rodriguez-Serrano, Gabriela; Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa Garcia, Mariano ; Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa Cruz, Alma ; Universidad Autonoma Metropolitana Iztapalapa,
Keywords:	fucosidase, enzymatic synthesis, fucooligosaccharides
Mandatory Keywords:	Bioactive Compound, Biocatalysis, Enzymatic Reactions
Abstract:	Fucosylated oligosaccharides play important physiological roles in human being, such as immune response, transduction of signals, early embryogenesis and development, growth regulation, apoptosis, pathogen adhesion, etc., whereby several researches have been made in order to synthesize these compounds due to the difficulty to purify them from their natural sources such as human milk, epithelial tissue, blood and others. Within the strategies for its in vitro synthesis, it is remarkable the employment of fucosidases, enzymes that normally cleave the fucosyl residue from the non-reducing end of fucosylated compounds, as these enzymes are also capable of synthesizing them by means of a transfucosylation reaction. This review summarizes the progress in employment of fucosidases for synthesis of compounds with potential for industrial and commercial applications

1 **Employment of fucosidases for synthesis of fucosylated oligosaccharides with biological**  
2 **potential**

3

4 Francisco Guzmán-Rodríguez<sup>1</sup>, Sergio Alatorre-Santamaría<sup>1</sup>, Lorena Gómez-Ruiz<sup>1</sup>, Gabriela Rodríguez-  
5 Serrano<sup>1</sup>, Mariano García-Garibay<sup>1,2</sup>, Alma Cruz-Guerrero<sup>1</sup>.

6

7 <sup>1</sup> Departamento de Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco  
8 186, Col. Vicentina, CP 09340, Iztapalapa, Ciudad de México, México.

9 <sup>2</sup> Departamento de Ciencias de la Alimentación, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad  
10 Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma. Av. Hidalgo Poniente 46, Col. La Estación, CP 52006, Lerma de  
11 Villada, Edo. de México, México

12

13 **Short running title.** Fucosidases for synthesis of fucooligosaccharides

14

15 **Corresponding author.**

16 Alma Cruz-Guerrero

17 E-mail address: [aec@xanum.uam.mx](mailto:aec@xanum.uam.mx).

18 Phone: +(52) (55) 5804-4720

19 Fax: +(52) (55) 5804-4712

20 **Abstract:** Fucosylated oligosaccharides play important physiological roles in human being, such as immune  
21 response, transduction of signals, early embryogenesis and development, growth regulation, apoptosis,  
22 pathogen adhesion, etc., whereby several researches have been made in order to synthesize these compounds  
23 due to the difficulty to purify them from their natural sources such as human milk, epithelial tissue, blood and  
24 others. Within the strategies for its *in vitro* synthesis, it is remarkable the employment of fucosidases,  
25 enzymes that normally cleave the fucosyl residue from the non-reducing end of fucosylated compounds, as  
26 these enzymes are also capable of synthesizing them by means of a transfucosylation reaction. This review  
27 summarizes the progress in employment of fucosidases for synthesis of compounds with potential for  
28 industrial and commercial applications.

29

30 **Keywords:** fucosidases, transfucosylation, enzymatic synthesis, fucooligosaccharides.

31

32 **Abbreviations:** Bn, benzyl; DMSO, dimethyl sulfoxide; Et, ethyl; F, fluoride; Fuc, fucose; FL,  
33 fucosyllactose; Fuc-Boc-L-Ser-O-Me; N-(tert-butyloxycarbonyl)-L-serine methyl ester; Fuc-Boc-L-Tre-O-Me,  
34 N-(tert-butyloxycarbonyl)-L-threonine methyl ester; Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; Glc,  
35 glucose; GlcNAc, N-acetylglucosamine; Lac, lactose; LacNAc, N-acetyllactosamine; LNFP, lacto-N-  
36 fucopentaose; LNnT, lacto-N-neotetraose; LNT, lacto-N-tetraose; Man, manose; Me, methyl; Ph, phenyl;  
37 pNP, 4-nitrophenol; Pro, propyl; SEt, tio-ethyl; XyG, xyloglucan; Xyl, xylose.

## 38 1. Importance of fucosylated oligosaccharides

39 L-Fucose, is an aldohexose with absence of a hydroxyl group on carbon 6 (deoxyaldohexose), it was  
40 identified for the first time in algae structural oligosaccharides, hence the origin of its name comes from the  
41 greek word *phykos* which means "seaweed". L-Fucose is one of the few monosaccharides found in nature in  
42 the form of L-isomer and its presence has been confirmed in the non-reducing end of various compounds such  
43 as human milk oligosaccharides, intestinal mucins, blood group antigens and others (Fig. 1). Fucosylated  
44 oligosaccharides are involved in numerous and crucial physiological processes such as immune response,  
45 signal transduction, early embryogenesis and development, growth regulation, apoptosis, adhesion of  
46 pathogens, extravasion of leukocytes, maturation and interaction of gametes, pathological processes such as  
47 arteriosclerosis and cancer, etc. [1-3].

## 48 2. Fucosidases: classification and reaction mechanisms

49 Fucosidases are exo-glycosylhydrolases that catalyze the cleavage of the fucosyl residue bound to the non-  
50 reducing end of the fucosylated oligosaccharides and fucoglycoconjugates. In accordance with the enzyme  
51 nomenclature from the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, which is based on the  
52 type of reaction that the enzyme catalyzes and the specificity for its substrate, fucosidases have been classified  
53 as EC 3.2.1.63 for 1,2- $\alpha$ -L-fucosidases that cleave  $\alpha$ -1,2 bonds between fucose and galactose, EC 3.2.1.111  
54 for 1,3- $\alpha$ -L-fucosidases which cleave  $\alpha$ -1,3 bonds between fucose and GlcNAc and EC 3.2.1.51 for less  
55 specific  $\alpha$ -L-fucosidases that are able to cleave a wide variety of bonds such as  $\alpha$ -1,2 between fucose and  
56 galactose and  $\alpha$ -1,3/4/6 between fucose and GlcNAc [1, 4, 5].

57 The database CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes) [6] from the Glycogenomics group at AFMB Lab  
58 (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques- French National Centre for Scientific Research-  
59 Aix-Marseille University) groups  $\alpha$ -L-fucosidases in three families, according to the similarity in the amino  
60 acid sequence of the enzymes [5]. Family GH29, encloses those fucosidases that hydrolyze the fucosyl bond  
61 with retention of anomeric configuration in the products of reaction, using a double displacement mechanism  
62 (Fig. 2A). In the first step of this mechanism, donor substrate binds to the active site of the enzyme through a  
63 nucleophilic amino acid that attacks the anomeric center of donor substrate, thus generating a covalent  
64 intermediate fucosyl-enzyme. The second step is a reaction catalyzed by an amino acid that acts as a general  
65 acid-base. In this reaction, the fucosyl-enzyme intermediate is attacked nucleophilically by a hydroxyl group:

66 if it comes from water, then the result is the hydrolysis of the compound, but if OH comes from another  
67 acceptor such as a carbohydrate, alcohol, etc., the transference reaction is achieved [7, 8]. Of the two catalytic  
68 amino acids mentioned above, one that acts as a nucleophile is well conserved with regard to its position in  
69 amino acid sequence, in this whole family of fucosidases, on the other hand, the position of the amino acid  
70 that acts as a general acid / base is not well conserved, so based on phylogenetic relationships, the position of  
71 this amino acid has been taken as a criterion to divide the GH29 family in two subfamilies, subfamily GH29A  
72 with a relaxed specificity, and the subfamily GH29B, with specificity towards the  $\alpha$ -1,3/4 bonds [4]. A  
73 member of GH29A family is the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*, whose nucleophile corresponds  
74 to a residue of aspartate (D224) and general acid base is a residue of glutamic acid (E266). In the case of  
75 fucosidases from GH29B family, an example is the fucosidase BT4136 from *Bacteroides thetaiotaomicron*,  
76 whose nucleophile is aspartate (D204) and general acid / base is glutamic acid (E249) [4].  
77 An important property of the fucosidases of the GH29 family is that in addition to the hydrolysis of the  
78 fucosyl bond, they are capable of transferring fucose from a donor substrate to substrates such as methyl, *p*-  
79 nitrophenol (pNP), oligosaccharides or to allyls derived from the latter [9].  
80 The GH95 family includes 1,2- $\alpha$ -L-fucosidases in addition to some galactosidases. These enzymes are  
81 characterized by presenting an inversion mechanism of the anomeric configuration of the products of reaction,  
82 which is a single-displacement mechanism that involves oxocarbenium ion-like transition states (Fig. 2B).  
83 The reaction typically occurs with the help of two amino acid residues in the active site, a general acid and a  
84 general base [10, 11].  
85 In enzymes of the GH95 family, an asparagine activated by aspartic acid acts as a general base, while the  
86 carboxyl of glutamic acid acts as a general acid. The 1,2- $\alpha$ -L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*  
87 (BbAfcA) is the most studied enzyme within this family and glutamic acid (E566) and asparagine (N423)  
88 have been identified as the general acid and the general base, respectively [12].  
89 Unlike the fucosidases of the GH29 family, it has not been shown that fucosidases of the GH95 family are  
90 able to synthesize oligosaccharides [9, 1].  
91 The third family of fucosidases is GH141, which includes the  $\alpha$ -L-fucosidase BT1002 from *B.*  
92 *thetaiotaomicron*. In this fucosidase two aspartates have been proposed as the catalytic residues, D523 as the  
93 nucleophile and D564 as the general acid / base. The crystal structure of this enzyme suggest that members of

94 this family follow a double displacement retention mechanism, similarly that GH29 family, but no evidence  
95 of transfructosylation activity of this enzyme has been reported up to date [13, 14]

### 96 **3. Distribution of fucosidases in nature**

97 Fucosidases are distributed in a wide variety of organisms: archaea, bacteria, algae, plants, fungi, molluscs,  
98 ascidians, birds, mammals, etc. [1].

99 For example, in many molluscs, the fucosidases contribute to the digestion of structural fucosylated  
100 carbohydrates present in the algae from which they feed. In arachnids, such as the *Amblyomma cajennense*  
101 tick, a fucosidase present in its midgut could be related to defense mechanisms against parasites [15]. In  
102 several animals, from mammals to invertebrates, the recognition and adhesion of gametes is mediated by  
103 carbohydrate-binding proteins present on the surface of sperm, including fucosidase, with a high affinity for  
104 complex glycoconjugates present on the surface of the egg [16, 17]. Fungi of the genus *Aspergillus* possess  
105 fucosidases that allow them, together with other enzymes, to degrade and metabolize a fucosylated  
106 xyloglucan (XyG), a structural polysaccharide present in the cell wall of many land plants (dicotyledons) [18,  
107 19]. For its part, the bacterium *Lactobacillus casei* BL23, has three fucosidases that allow it to release the  
108 fucose from  $\alpha$ -L-Fuc- (1-3) -D-GlcNAc, thus obtaining GlcNAc, an amino-sugar metabolizable by this  
109 bacterium [20]. Based on information provided by BRENDA database (Braunschweig Enzyme Database)  
110 [21], a dendrogram of fucosidases was constructed (Fig. 3) and as it can be observed more than 50% of the  
111 studied fucosidases are of animal origin and 30% of microbial origin.

112 From this diversity of fucosidases, those that have been studied mainly for their ability to synthesize  
113 fucosylated compounds belong to bacteria (*T. maritima*, *L. casei*, *Alcaligenes* sp., *Thermus* sp., etc.),  
114 mammals (*Homo sapiens*, *Sus scrofa domesticus*, *Canis lupus familiaris*), molluscs (*Pecten maximus*,  
115 *Ampullaria* sp.) and fungi (*Penicillium multicolor*, *Aspergillus niger* and two species of the genus *Fusarium*).

### 116 **4. Employment of fucosidases in synthesis of fucosylated oligosaccharides**

117 Production and study of fucooligosaccharides, require for sufficient quantities of them from natural and  
118 synthetic origins, however, isolation from natural sources is difficult because they are in relatively low  
119 concentrations and present very complex structures, so access to pure oligosaccharides for research purposes  
120 depends on a large extent on their chemical and / or enzymatic synthesis. Each synthesis strategy has  
121 advantages and disadvantages compared to the others, so in some cases they can be complementary [22, 23].

122 Chemical methods are laborious, since numerous steps of protection and deprotection of hydroxyl groups are  
123 required to achieve the desired regioselectivity. On the other hand, the enzymatic synthesis does not require  
124 complex protection strategies and selective deprotection of groups and offers absolute control in the  
125 configuration of newly formed anomeric centers due to the stereospecificity of the enzymes [24, 25]. The  
126 enzymes used are mainly glycosyltransferases and glycosidases.

127 Fucosyltransferases are the enzymes responsible for synthesizing fucooligosaccharides in living beings, by  
128 transferring a fucosyl group, from a donor substrate (commonly fucosyl-nucleotides) to an acceptor substrate  
129 (other carbohydrates), these offer high yields of synthesis and are capable of transferring the fucosyl groups  
130 with strict regio and stereoselectivity, however its application in preparative synthesis, which aims to produce  
131 the compound of interest on a large scale, is restricted due to the low availability of glycosyltransferases and  
132 their donor substrates, in addition, the latter are difficult to synthesize and therefore costly [23, 24, 26, 27].

133 A recent approach for *in vivo* synthesis of fucosylated compounds, is by means of metabolic engineering of  
134 *Escherichia coli*. This bacterium produces in low quantities GDP-Fuc, a fucosyl-nucleotide suitable for its  
135 use as a donor substrate with fucosyltransferases. Some strategies are focused to overexpress, delete or insert  
136 some genes encoding key enzymes in the *de novo* and *salvage* pathways of synthesis of GDP-Fuc in order to  
137 increase its concentration in cell [27 In a similar way, some efforts have been conducted to transform *E. coli*  
138 in a “cell factory” of fucooligosaccharides, being capable of synthesize not only the donor substrate in  
139 attractive amounts but also the acceptor substrate and a suitable fucosyltransferase for the synthesis of a  
140 specific compound. For example, Chin et al. [28] produced an *E. coli* BL21star(DE3) capable of synthesizing  
141 2'FL, from fucose, lactose and glycerol. The knocking out of operon *lacZ* (to avoid hydrolysis of lactose),  
142 insertion of fucokinase/GDP-Fuc pyrophosphorylase from *Bacteroides fragilis* (to increase the pool of GDP-  
143 Fuc, following the *salvage* pathway) and expression of a 1,2- $\alpha$ -fucosyltransferase from *Helicobacter pylori*  
144 (to catalyze synthesis of  $\alpha$ -1,2 bonds) were the main modifications in the engineered *E. coli*.

145 The use of glycosidases for the synthesis of fucooligosaccharides is an attractive alternative, because they are  
146 very available enzymes and generally tolerant to different organic solvents, in addition they can use various  
147 donor substrates that are not expensive, for example, activated glycosides like nitrophenyl glycosides or  
148 disaccharides in the so-called transglycosylation reactions (kinetically controlled), or free monosaccharides in  
149 reverse hydrolysis reactions (thermodynamically controlled) [22, 23, 25]. However, they present two key

150 limitations, the first is the difficulty of conducting the reaction in a favorable direction for synthesis and not  
151 for hydrolysis, the second is that the synthesized product is in turn a substrate hydrolysable by the enzyme, so  
152 the synthesis yields are generally low [24]. In this sense, to increase these yields, different strategies have  
153 been used based on the manipulation of the concentration of substrates, the molar ratio between donor and  
154 acceptor substrates, temperature, pH, source of the enzyme, water activity ( $a_w$ ) and the development of mutant  
155 enzymes [8, 22]. In order to improve the transfucosylation, several mutant enzymes have been developed in  
156 recent years. One strategy of these strategies is concept of fucosynthase, achieved through site-directed  
157 mutagenesis of the nucleophile residue of a retaining fucosidase, driving the enzyme able to catalyze the  
158 transference of fucose without hydrolyzing the product of the synthesis. Donor substrate used by these  
159 enzymes has an opposite anomeric configuration than the enzyme. Other kind of mutant enzymes are  
160 fucoligases which are created by mutation of the general acid–base residue, disabling the enzyme for  
161 hydrolysis. In this case donor substrate has the same anomeric configuration than the enzyme. [7, 29. Usually  
162 the donor substrate employed in reactions catalyzed by fucosynthases or fucoligases is Fuc-F. In the case of  $\alpha$ -  
163 fucosynthases, the anomeric configuration required for Fuc-F is the  $\beta$ -isomer, but this one is very unstable.  
164 This compound has been employed as a substrate for the 1,2/3/6- $\alpha$ -L-fucosynthases engineered from the  $\alpha$ -  
165 fucosidases from *B. bifidum* [30-33]. An improvement in this strategy has been the use of  $\beta$ -fucosyl azide as  
166 an alternative donor substrate successfully used for the  $\alpha$ -L-fucosynthase from *Sulfolobus solfataricus* [29,  
167 34]. Li et. Al [29] developed an 1,6- $\alpha$ -fucoligase derived from the AlfC fucosidase from *Lactobacillus casei*  
168 able to use  $\beta$ -fucosyl azide to directly fucosylate intact N-glycopeptides and N-glycoproteins, with formation  
169 of an  $\alpha$ -1,6 bond, a goal difficult to achieve even with an 1,6- $\alpha$ -fucosyltransferase due to its high substrate  
170 specificity. Products of this synthesis (core-fucosylated glycopeptides and glycoproteins) are important for  
171 structural and functional studies. Some other examples of enzymes subjected to engineering are  $\alpha$ -L-  
172 fucosidases from *T. maritima*, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* (Blon\_2336) and 1,3/4-  $\alpha$ -L-fucosidase  
173 from *B. bifidum* [35-37].

174 Non-engineered glycosidases are stereospecific as they only hydrolyze (and synthesize)  $\alpha$  or  $\beta$  bonds.  
175 Regarding regiospecificity, it depends on the substrate and enzyme used. Although glycosylation can be  
176 favored over some specific hydroxyl of the acceptor, the regioselectivity is not so marked in all glycosidases,



177 since it is possible to obtain mixtures of several regioisomers depending on the structure of the acceptor, so  
178 that, a purification of the compound of interest could be necessary [22-24].

#### 179 **4.1. Donor and Acceptor substrates**

180 As it can be seen in Table 1, 2 and 3 there is a wide variety of donor and acceptor substrates that have been  
181 used in transufucosylation reactions. The most common used acceptors are lactose, lactosamine, pNP-  
182 glycosides and alcohols, however, the first two have greater relevance since oligosaccharides similar to those  
183 of human milk have been synthesized from these [36, 38-40]. It has been reported that the presence of the  
184 aromatic amino acid in the active site of the fucosidase of *T. maritima* induces a preference for  
185 monosaccharide acceptors in particular, pNP-monosaccharides. In fact, several monosaccharides or their  
186 methyl, pNP or allyl derivates were used as acceptors in transufucosylation reactions [2, 41, 42]. Ajisaka and  
187 Shirakabe [43] and Murata et al. [38] reported that the presence of a methyl group at the reducing end of  
188 acceptor increased the transufucosylation yield.

189 On the other hand, as explained above, transufucosylation reactions demand an activated donor substrate, what  
190 mean that fucose moiety to be transferred, needs to be linked to a molecule that ensure the easy cleave of the  
191 fucosidic bond, so this must molecule act as good leaving group during the reaction, for example, mono or  
192 disaccharides, methyl group, nitrophenyl group and even some halogens like F. By far, the most reported  
193 substrate in transufucoylation reactions is pNP-Fuc (2, 38-41), first of all, because it is recognized as a  
194 substrate by many fucosidases, its characteristic of chromogenicity (releasing nitrophenol) makes it attractive  
195 in research it allows easily follow kinetics of hydrolysis by means of spectrophotometry, in addition is  
196 available in the market, in fact is one of the less expensive than many commercial fucosyl donor, since  
197 \$150.00 to around \$1,700.00 USD per gram depending on the seller. If it is true that pNP-Fuc is widely used  
198 as donor substrate in research, it has certain disadvantages such as low solubility in aqueous media and  
199 toxicity [44, 45], which restrict it for certain purposes, for example synthesis of fucooligosaccharides oriented  
200 to food products. Other donors that have been used are Fuc-O-Me and Fuc-F. Fuc-O-Me have lower affinity  
201 than pNP-Fuc and in the synthesis of fucooligosaccharides the yields are lower [46], while the use of Fuc-Fl is  
202 limited by the poor stability of this compound generated low yield in the transufucosylation reaction [42].  
203 Moreover, others donor substrates employed are some fucosylated milk oligosaccharides like 2'FL and 3'FL  
204 employed by several bacterial fucosidases, in the synthesis of lacto-N-fucopentaose isomers. These are not so

205 available in the market, and they are more expensive than synthetic substrates. Their obtention from natural  
206 sources like human milk, not just demand enough amount of this fluid, but a proper method of purification.  
207 Recently, fucosylated XyG has been employed as a novel fucose donor [9]. This substrate is highly available,  
208 since it can be obtained from agroindustrial by-products such as citric peel [47], and during transfucosylation  
209 reactions, its released side products (glucanes) are safe; however the number of fucosidases from family  
210 GH29 that can use it as a donor substrate is limited to an  $\alpha$ -L- fucosidase from *F. graminearum*, a fucosidase  
211 from soil metagenome (Mfuc5), and the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Tanerella forsythia* [9, 41].

## 212 **5. Bacterial Fucosidases**

213 Among the fucosidases found in nature (Fig. 3), those produced by bacteria represent only around 25%  
214 according to what is reported in BRENDA database (<http://www.brenda-enzymes.org>), however, they have  
215 been the most studied for their ability to transfer the fucosyl group (transfucosylation) and for the ease of  
216 producing them at laboratory level. The studies on transfucosylation using bacterial fucosidases are  
217 summarized in Table 1.

### 218 **5.1. *Alcaligenes* sp.**

219 Murata et al. [38] used the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Alcaligenes* sp. to transfer the fucosyl group from pNP-Fuc to  
220 LacNAc to produce  $\alpha$ -L-Fuc- (1-3) - $\beta$ -D-LacNAc; lactose was also used as an acceptor, obtaining 3-  
221 fucosyllactose (3FL). In addition, fucose was transferred from pNP-Fuc to three methylated acceptors:  $\beta$ -D-  
222 Gal-(1-4)- $\beta$ -D-Glc-O-Me,  $\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ -D-Glc-O-Me and  $\beta$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ -D-GlcNAc-O-Me. In all cases  
223 the synthesis was regioselective, showing preference to synthesize  $\alpha$ -1,3 bond between fucose and galactose.  
224 As it can be seen in Table 1, the structural characteristics of the acceptor substrate can influence the yields of  
225 the synthesis: when lactose was used as an acceptor, the yield of the synthesis was 34%, when LacNAc was  
226 used (with an additional *N*-acetyl group) the yield increased to 54% and when the methylated derivative of  
227 LacNAc was used the yield increased to 67%.

228 The regioselectivity of this enzyme in the synthesis was confirmed by Zeng et al. [48], since they used the  
229 fucosidase of *Alcaligenes* sp. to fucosylate a series of *p*-nitrophenyl glycosides (pNP-LacNAc, pNP-Lac,  
230 pNP-Glc and pNP-GlcNAc) employing pNP-Fuc as donor. In all cases, the fucosylation preferably occurred on  
231 carbon 3 of the galactose. However, other regioisomers were also detected, but at a minimum concentration:

232 with pNP-LacNAc as acceptor,  $\alpha$ -1,2 bonds were synthesized; with pNP-Lac as acceptor,  $\alpha$ -1,2/6 bonds were  
233 reported, and with pNP-Glc and pNP-GlcNAc as acceptors, regioisomers with  $\alpha$ -1,4 bonds were found.  
234 With respect to the relevance of the obtained oligosaccharides, the trisaccharide  $\alpha$ -L-Fuc- (1-3) - $\beta$ -D-LacNAc  
235 synthesized by Murata et al. [38] is reported as part of higher homologues of human milk oligosaccharides.  
236 On the other hand, 3FL is present in human milk, possesses structural similarity with the Lewis-x trisaccharide  
237 and inhibits adhesion of enteropathogenic *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to human cells [49, 50]. The  
238 synthesis or production of methyl-fucosides from fucosylation of methylated oligosaccharides is important,  
239 since alkyl glycosides can be used as substrates for the synthesis of oligosaccharides and are also  
240 biosurfactants of interest in the cosmetic, pharmaceutical, food and biotechnology industries [2, 46]. *p*-  
241 Nitrophenyl fucosides synthesized by Zeng et al. [48] can be used as precursors in the synthesis of  
242 glycopolymers for the investigation of their biological function or as intermediaries for the elongation of other  
243 oligosaccharides.

#### 244 **5.2. *Bifidobacterium bifidum***

245 Zeuner et al. [41] studied the capacity of the BbAfcB fucosidase from *B. bifidum* JCM 1254 cloned in *E. coli*  
246 BL21 (DE3), to transfer fucose from 3FL to lacto-*N*-tetraose (LNT) for the synthesis of lacto-*N*-fucopentaose  
247 II (LNFP-II) and to lacto-*N*-neotetraose (LNnT) for the synthesis of lacto-*N*-fucopentaose III (LNFP-III), with  
248 maximum yields of 13% and 1.4% respectively. According to the authors, this fucosidase belongs to the  
249 subfamily GH29B and is regioselective towards both, hydrolysis and the formation of  $\alpha$ -1,3/4 fucosidic  
250 bonds. In both acceptor substrates studied, fucosylation occurred exclusively on the GlcNAc unit: in LNnT  
251 formed  $\alpha$ -1,3 bonds, and in LNT formed  $\alpha$ -1,4 bonds. Regarding the importance of the oligosaccharides  
252 formed, both are present in human milk, additionally LNFP-II has a structure very similar to that of the  
253 Lewis-a antigen. In the case of LNFP-III, it contains within its structure the Lewis-x trisaccharide, and  
254 possesses immunomodulatory activity [51-53].

#### 255 **5.3. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis***

256 Saumonneau et al. [35] studied the capacity of 1,3/4- $\alpha$ -L-fucosidase (BbAfcB) of *B. longum* subsp. *infantis*,  
257 of synthesizing oligosaccharides by transfucosylation reactions. According to the authors, the wild type  
258 enzyme is capable of transferring fucose from the acceptor substrate 3FL to the donor substrate LNT (in the

259 carbon 4 of its GlcNAc moiety) to form LNFP-II with a maximum yield of 12%. The biological relevance of  
260 LNFP-II is mentioned in section 5.2.

#### 261 **5.4. *Clostridium perfringens***

262 Zeuner et al. [41] studied the ability of the CfAfc2 fucosidase from *C. perfringens* ATCC 13124 cloned in *E.*  
263 *coli* BL21 (DE3), to transfer fucose from 3FL to LNT for the synthesis of LNFP-II and to LNnT to synthesize  
264 LNFP-III, with maximum yields of 39% and 5% respectively. The yields of transfucosylation showed  
265 dependency of the molar ratio D/A, because while the mentioned yields were obtained at a D/A of 0.1, when  
266 increasing this ratio to 1, the yields decreased to 35% and 1.2%. On the other hand, this fucosidase showed a  
267 regiospecificity and preference for acceptor like those previously mentioned for the fucosidase from *B.*  
268 *bifidum*, which belongs to the same subfamily (GH29B) and with considerably higher yields. The importance  
269 of the obtained oligosaccharides is discussed in section 5.2.

#### 270 **5.5. *Corynebacterium* sp.**

271 Ajisaka & Shirakabe [43] used the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Corynebacterium* sp. to transfer the fucosyl group of  
272 pNP-Fuc to different substrates (glucose, galactose, GlcNAc and Gal-O-Me), they found that only the transfer  
273 to Gal-O-Me is achieved, obtaining  $\alpha$ -L-Fuc- (1-2) - $\beta$ -D-Gal-O-Me, and towards galactose, obtaining 2-Fuc-  
274 Gal with slightly lower transfucosylation yields, in both cases  $\alpha$ -1,2 bonds were formed. The fucosyl-  
275 galactosides synthesized are important precursors for the synthesis of higher molecular weight  
276 oligosaccharides as glycoprotein or glycolipid components [43]. In addition, 2-Fuc-Gal is part of the structure  
277 of different oligosaccharides in human milk as well as antigens of the ABO and Lewis system [51, 52].

#### 278 **5.6. *Emticicia oligotrophica***

279 Liu et al. [54], studied three oligotrophic *Emticicia oligotrophica* fucosidases cloned in *E. coli* finding that  
280 only the fucosidase Eo0918 had the ability to transfer the fucosyl group from pNP-Fuc to the hydroxyl-7 of  
281 the substrate 4-methylumbelliferone with a yield of 15%. In this case the product was synthesized solely for  
282 studying the ability of transfucosylation of the enzyme.

#### 283 **5.7. *Lactobacillus casei***

284 Rodríguez-Díaz et al. [55] characterized three fucosidases from *Lactobacillus casei* BL23 expressed in *E.*  
285 *coli*. These fucosidases were named AlfA, AlfB and AlfC. The last two were used for transfucosylation tests  
286 using pNP-Fuc as donor and GlcNAc as acceptor [3]. It was found that AlfB transfers fucose with formation

287 of  $\alpha$ -1,3 bonds, synthesizing  $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc with a yield of 23%. In addition, these authors  
288 reported the transfucosylation / hydrolysis ratio with a value of 0.63, which indicates that the equilibrium of  
289 the reaction favors hydrolysis.

290 On the other hand, AlfC fucosidase synthesizes  $\alpha$ -1,6 bonds, obtaining  $\alpha$ -L-Fuc-(1-6)- $\beta$ -D-GlcNAc, and  
291 showed the highest rate of transfucosylation found among wild-type fucosidases (56%), comparable with the  
292 rate of transfucosylation of mutants of *T. maritima* (28 - 85%) [36]. In addition, its transfucosylation /  
293 hydrolysis ratio was reported as 4.86, which means that the rate of synthesis prevails over the hydrolysis,  
294 contrary to the case of AlfB. It should be noted that these fucosidases synthesized the same type of bonds that  
295 preferentially hydrolyzed between fucose and GlcNAc, which are  $\alpha$ -1,3 for AlfB and  $\alpha$ -1,6 for AlfC.

296 The synthesized oligosaccharides are important, since  $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc can be found in human  
297 milk oligosaccharides such as LNFP-III, whose importance is mentioned in section 5.2. Regarding to the  
298 disaccharide  $\alpha$ -L-Fuc-(1-6)- $\beta$ -D-GlcNAc, it can be found in the nucleus of glycans present in N-glycosylated  
299 proteins, for example in glycan A1F present in porcine thyroglobulin [3].

### 300 **5.8. *Paenibacillus thiaminolyticus***

301 Benešová et al. [2], characterized the  $\alpha$ -L-fucosidase from bacterium *Paenibacillus thiaminolyticus* cloned in  
302 *E. coli* BL21 (DE3) and evaluated its ability to transfer fucose using pNP-Fuc as donor substrate to three  
303 different groups of acceptor substrates: in the first group, chromogenic substrates (pNP-Gal, pNP-Glc, pNP-  
304 Man and pNP-Fuc), in the second group, alcohols (methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol and octanol)  
305 and in the third group, amino acid derivatives (Fuc-Boc-L-Tre-O-Me and Fuc-Boc-L-Ser-O-Me). In the case  
306 of chromogenic substrates, the highest yield was obtained with pNP-Gal (32%). It was also reported that the  
307 transfer was not regioselective, for example with pNP-Glc,  $\alpha$ -1,2/6 bonds were formed. For alcohols, the  
308 highest yields were obtained at lower chain length with methanol being the preferred acceptor substrate. The  
309 amino acid derivatives had the lowest yields.

310 Both the *p*-nitrophenyl fucosides and the alkyl fucosides can be used as precursors for the synthesis of higher  
311 molecular weight oligosaccharides, and in addition the alkyl glycosides can be used as surfactants, as  
312 explained in section 5.1 [2, 46,48]. The glycosylated amino acids can be used as building blocks for the  
313 synthesis of glycopeptides and glycoproteins of defined structure with importance in the pharmaceutical

314 industry, since some glycopeptides are able to cross the blood-brain barrier and exert a therapeutic function  
315 [2, 56].

### 316 **5.9. *Tannerella forsythia***

317 Zeuner et al. [41] used a fucosidase from *Tannerella forsythia* ATCC 43037 cloned in *E. coli* BL21 (DE3)  
318 pLysS, to transfer fucose from 2'-fucosyllactose (2'FL) to LNT, obtaining lacto-N-fucopentaose I (LNFP-I)  
319 isomers, with a total yield of 35%, of which 93% corresponded to the  $\alpha$ -1,2 fucosidic bond. In other  
320 experiment, XyG from citric peel was used as a donor, and lactose as an acceptor for synthesis of 2'FL a yield  
321 of 0.7%. Additionally, the authors comment that in previous studies when using pNP-Fuc as a donor and  
322 lactose as acceptor, the main product of synthesis was the self-condensation product of donor substrate and  
323 not 2'FL, which indicates that this enzyme has little preference for lactose as a substrate, and it is due to  
324 structural impediments. Influence of the acceptor on the transfer has been reported in fucosidases of other  
325 species such as *B. bifidum*, *C. perfringens*, *Alcaligenes* sp. and *Corynebacterium* sp. [38, 41, 43].

326 With respect to the importance of the synthesized products, 2'FL is an isomer of fucosyllactose (FL) and the  
327 most abundant human milk oligosaccharide. It has shown a protective effect against *Campylobacter jejuni* and  
328 *H. pylori*, preventing its adherence to intestinal epithelial cells, also has prebiotic activity to favor the  
329 development of beneficial microbiota as a bifidobacteria, and in a study with mice, it was able to attenuate the  
330 severity of necrotizing enterocolitis, a common disease in premature infants. Low levels of 2'FL in the diet of  
331 infants are associated with a high incidence of diarrhea. For these reasons 2'FL is an oligosaccharide with  
332 nutraceutical potential and particularly for pharmaceutical purposes, as an additive in milk formulas [57-60].  
333 In fact, 2'FL is the first fucosylated oligosaccharide produced by fermentation with engineered *E. coli* to be  
334 added to an infant formula [61]. LNFP-I is present in human milk and has immunomodulatory properties [62].

### 335 **5.10. *Thermotoga maritima***

336 Osanjo et al. [36] used the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* cloned in *E. coli* to transfer fucose from pNP-Fuc  
337 to different acceptors. When pNP-Fuc was used as an acceptor as well as a donor substrate, pNP-Fuc-Fuc was  
338 synthesized with the formation of an  $\alpha$ -1,3 bond with a yield of 17% and, unidentified di and trisaccharide  
339 were synthesized with lower yields. When using pNP-Gal as an acceptor substrate, the fucose was transferred  
340 to the galactose moiety with the formation of  $\alpha$ -1,2 and  $\alpha$ -1,6 bonds with yields of 23% and 8% respectively,  
341 in this case the molar ratio of donor / acceptor (D/A) was 0.2. When using a D/A ratio of 0.5 the yields of the

342 products with  $\alpha$ -1,2 and  $\alpha$ -1,6 bonds decreased to 14 and 7% respectively and the presence of the self-  
343 condensation product pNP-Fuc-Fuc was observed with a yield of 8%. At a D/A ratio of 1.0,  $\alpha$ -1,2 product  
344 reduced its yield to 7%,  $\alpha$ -1,6 bond was no longer found and pNP-Fuc-Fuc increased its yield to 10.3%. The  
345 above reflects the influence of D/A ratio on total yield of transufucosylation and in the synthesis of self-  
346 condensation product of the donor. In another experiment, in which the disaccharide  $\beta$ -Gal-(1-3)- $\beta$ -Glc-Ph  
347 was used as an acceptor, the fucose was transferred to the galactose residue with the formation of an  $\alpha$ -1,2  
348 bond with an 8% yield, in addition to the formation of another unidentified trisaccharide with a lower yield, in  
349 this case the self-condensation product of pNP-Fuc already mentioned was formed again with a yield of 19%.  
350 Lezyk et al. [9], used the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* expressed in *E. coli* as a comparison model to  
351 evaluate the transufucosylation potential of seven fucosidases obtained from the soil metagenome. When using  
352 pNP-Fuc as a donor and lactose as an acceptor, 2'FL was obtained with a yield of 6.4%. An additional  
353 experiment at a higher D/A ratio was performed, 2'FL reduced its yield to 1% and self-condensation products  
354 of donor were found in a yield of 17.6%.

355 Guzmán-Rodríguez et al. [39] used the recombinant  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima* (Megazyme, Ireland) to  
356 transfer fucose from pNP-Fuc to lactose. The product of the synthesis was reported as FL with a yield of  
357 32.5%.

358 Zeuner et al. [41] used the fucosidase from *T. maritima* MSB8 cloned in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, to  
359 transfer fucose from 2'FL to LNT. Isomers of LNFP-I were synthesized, with a total yield of 10%. According  
360 to the authors the most abundant isomer possesses an  $\alpha$ -1,2 fucosidic bond.

361 The importance of oligosaccharides synthesized by fucosidase from *T. maritima*, have been addressed in  
362 section 5.9.

### 363 **5.11. *Thermus* sp.**

364 Eneyskaya et al. [46], isolated an  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermus* sp. Y5 and used it to transfer the fucosyl  
365 group from pNP-Fuc to methanol and ethanol, obtaining Fuc-O-Me and Fuc-O-Et with yields of 40% and  
366 35% respectively. Fuc-O-Me was also used to transfer the fucose to the GlcNAc and GalNAc, obtaining Fuc-  
367 GlcNAc and Fuc-GalNAc respectively, without reporting the configuration of the bonds. The alkyl-fucosides  
368 Fuc-O-Me and Fuc-O-Et can be used as donors for transufucosylation reactions, while the disaccharide Fuc-  
369 GlcNAc is part of the structure of the Lewis and ABO antigens [46, 52].

**370 5.12. *Xanthomonas campestris***

371 Zeuner et al. [41] used the NixE fucosidase from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913  
372 cloned in *E. coli* BL21 (DE3), to transfer fucose from 2'FL to LNT. Isomers of LNFP-I were synthesized,  
373 with a total yield of 18%. According to the authors the most abundant isomer possesses an  $\alpha$ -1,2 fucosidic  
374 linkage. The importance of the oligosaccharide LNFP-I is discussed in section 5.9.

**375 5.13. Other bacterial fucosidases.**

376 As mentioned in section 5.10, Lezyk et al. [9] studied several fucosidases from soil metagenome to synthesize  
377 fucooligosaccharides. The origins of these enzymes are *Thermobaculum terrenum*, *Mahella australiensis*,  
378 *Anaerolinea thermophila*, *Cylindrospermum stagnale* and two fucosidases from *Roseiflexus* sp. RS-1. In all  
379 cases pNP-Fuc was used as donor and lactose as acceptor, and main product of transfucosylation was the self-  
380 condensation product pNP-Fuc-Fuc (with  $\alpha$ -1,2 and  $\alpha$ -1,3 bonds) followed by FL isomers. Highest yield of  
381 synthesis of isomers of FL was achieved with the  $\alpha$ -L-fucosidase from *Anaerolinea thermophila* referred as  
382 Mfuc5. Also, Mfuc5 was able to transfer fucose from fucosylated XyG to fucose to produce FL.

**383 6. Fungal fucosidases**

384 Fungal fucosidases that have been studied for their property of transfucosylation, come from organisms from  
385 Ascomycota phylum, where fungi of industrial importance are also located. Studies on transfucosylation using  
386 fungal fucosidases are summarized in Table 2.

**387 6.1. *Aspergillus niger***

388 Ajisaka and Shirakabe [43], employed an  $\alpha$ -L-fucosidase from *Aspergillus niger* to regioselectively transfer  
389 the fucosyl group from pNP-Fuc to glucose and GlcNAc, obtaining  $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-Glc and  $\alpha$ -L-Fuc-(1-  
390 3)- $\beta$ -D-GlcNAc respectively. On the other hand, when Gal-O-Me was used as an acceptor,  
391 fucooligosaccharide synthesis was not achieved. According to the authors, this  $\alpha$ -L-fucosidase specifically  
392 hydrolyses  $\alpha$ -1,2 bonds, however it was able to synthesize  $\alpha$ -1,3 bonds. With respect to the relevance of the  
393 synthesized oligosaccharides,  $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-Glc, can be found in the structure of human milk  
394 oligosaccharides such as 3FL and lacto-N-difucohexaose II, while  $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc as mentioned  
395 in section 5.7, is part of the structure of human milk oligosaccharides and some Lewis antigens [51, 52].

**396 6.2. *Fusarium graminearum***



397 Zeuner et al. [41] used the recombinant fucosidase from *Fusarium graminearum* PH-1, to transfer fucose  
398 from 2'FL to LNT to obtain LNFP-I, and in other reactions transfer fucose from citrus peel XyG to lactose, to  
399 obtain 2'FL. In the first case, isomers of LNFP-I were synthesized, with a total yield of 15%, and the most  
400 abundant isomer had an  $\alpha$ -1,2 fucosidic bond. The importance of LNFP-I and 2'FL was previously discussed  
401 in section in section 5.9.

#### 402 **6.3. *Fusarium proliferatum***

403 Shvetsova et al. [40], used the  $\alpha$ -L-fucosidase isolated from *Fusarium proliferatum* LE1 to transfer the  
404 fucosyl group from the donor substrate pNP-Fuc to two groups of acceptor substrates: six nitrophenyl  
405 glycosides (pNP-Fuc, pNP- $\alpha$ Gal, pNP- $\beta$ Gal, oNP- $\alpha$ Glc, pNP- $\beta$ Glc, and pNP- $\beta$ Xyl) and three aliphatic  
406 alcohols (ethanol, methanol and 1-propanol). All nitrophenyl glycosides used as acceptor substrates were  
407 fucosylated, the substrates pNP- $\alpha$ Gal, oNP- $\alpha$ Glc and pNP- $\beta$ Xyl even presented two different  
408 transfucosylation products (unidentified products). When pNP-Fuc was used as the only substrate, the self-  
409 condensation product pNP-Fuc-Fuc was synthesized, with a yield of 1.5%. In the case of alcohols, the alkyl  
410 fucosides corresponding to each alcohol (Fuc-O-Me, Fuc-O-Et and Fuc-O-Pro) were synthesized and of the  
411 three alcohols used, the transfucosylation was more effective towards 1-propanol.

#### 412 **6.4. *Penicillium multicolor***

413 Ajisaka et al. [63], found fucosidase activity in the commercial product Lactase-P™ obtained from  
414 *Penicillium multicolor* and from this product they purified the fucosidase. This enzyme was able to transfer  
415 the fucosyl group from pNP-Fuc to glucose and GlcNAc in a regioselective manner, since in both cases they  
416 exclusively formed  $\alpha$ -1,3 bonds with yields of 27.9% and 49% respectively. It should be noted that, according  
417 to authors, this enzyme preferentially hydrolyses the  $\alpha$ -1,6 fucosidic bonds over  $\alpha$ -1,3 bonds in Fuc-GlcNAc  
418 disaccharides, but as mentioned previously, in the transfucosylation reaction only  $\alpha$ -1,3 bonds were found.  
419 The authors mentioned that compounds with  $\alpha$ -1,6 bonds probably were synthesized, but they were  
420 hydrolyzed as fast as they were formed.

421 Farkas et al. [42], used  $\alpha$ -L-fucosidase from *Penicillium multicolor* for the synthesis of different fucosylated  
422 disaccharides using pNP-Fuc and Fuc-F as donors and glucose and three GlcNAc derivatives as acceptors. In  
423 all cases,  $\alpha$ -1,3 fucosyl bonds were formed and the highest yield was 34%, which was obtained by using pNP-  
424 Fuc as a donor and  $\alpha$ -D-GlcNAc-O-All as an acceptor. As it can be seen in Table 2, the yields obtained when

425 Fuc-F was used as a donor were lower compared to those obtained with pNP-Fuc. According to the authors,  
426 the above can be explained by the higher hydrolysis rate of Fuc-F compared to pNP-Fuc, so that fucose could  
427 have been rapidly released into the medium without being able to be efficiently transferred to the acceptor  
428 substrates.

429 Oligosaccharides with  $\alpha$ -1,3 fucosyl bonds are of biological relevance, for example the disaccharide  $\alpha$ -L-Fuc-  
430 (1-3)-D-GlcNAc, as mentioned in section 5.7, is part of the structure of human milk oligosaccharides and  
431 some Lewis antigens [42, 51, 52].

## 432 **7. Animal fucosidases**

433 Although fucosidases have been found in different phyla of the animal kingdom, those that have been studied  
434 for their ability to synthesize fucosylated compounds belong only to molluscs and mammals. The enzymes of  
435 marine molluscs, have gained great interest in the study of glycosidases [64]. On the other hand, the most  
436 studied mammalian fucosidases come mainly from livestock, given the availability from slaughterhouse by-  
437 products. In fact, bovine kidney fucosidase is available in the market. The other commercial mammalian  
438 fucosidase is recombinant human fucosidase. Studies on transfucosylation using animal fucosidases are  
439 summarized in Table 3.

### 440 **7.1. *Ampullaria* sp.**

441 Ajisaka and Shirakabe [43] employed the  $\alpha$ -L-fucosidase from the snail *Ampullaria* sp. for transferring the  
442 fucose from pNP-Fuc to Gal-O-Me; obtaining  $\alpha$ -L-Fuc-(1-6)- $\beta$ -D-Gal-O-Me with a yield of 14%. They also  
443 found that this enzyme is not able to transfer fucose to glucose or GlcNAc. The synthesized compound could  
444 be used as a precursor for the synthesis of oligosaccharides present in glycolipids and glycoproteins.

### 445 **7.2. *Bos taurus***

446 Nilsson et al. [65], used bovine kidney  $\alpha$ -L-fucosidase to transfer fucose from pNP-Fuc to thio-ethyl-6-  
447 benzyl-GlcNAc to synthesize  $\alpha$ -L-Fuc-(1-4)- $\beta$ -D [thio-ethyl- 6-benzyl-GlcNAc] a useful intermediate in the  
448 synthesis of Lewis-a-type compounds. The reaction had a yield of 50% and was a highly regioselective  
449 synthesis since only  $\alpha$ -1,4 bonds were formed, and no other amino-disaccharide was apparently produced.  
450 The same product has been previously obtained with  $\alpha$ -L-fucosidase from bovine testicles using the same  
451 substrates, and conserving the same regiospecificity towards the acceptor [66].

### 452 **7.3. *Canis lupus familiaris***

453 Berteau et al. [67], studied the ability of canine  $\alpha$ -L-fucosidase cloned in *E. coli* to catalyze transfucosylation  
454 reactions. In a first experiment, the enzyme was able to transfer fucose from pNP-Fuc to different methylated  
455 acceptor substrates Gal-O-Me, Fuc-O-Me, Xyl-O-Me, Glc-O-Me and Man-O-Me in that order of preference,  
456 without presenting self-condensation of pNP-Fuc. The identity of the synthesized products, as well as their  
457 yields were not reported. Subsequently the substrates Fuc-O-Me, Glc-O-Me and Gal-O-Me were selected as  
458 acceptors for synthesis at preparative scale, again using pNP-Fuc as a donor substrate, obtaining  
459 transfucosylation products with yields of 13, 3 and 17% respectively. When Fuc-O-Me was used as the  
460 acceptor, a mixture of isomers with  $\alpha$ -1,2 and  $\alpha$ -1,3 bonds were obtained in a 45:55 ratio. When using Glc-O-  
461 Me, isomers with  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 bonds were obtained in a ratio of 45: 20: 20:15 respectively.  
462 When Xyl-O-Me was used, there was evidence of a synthetic product that was not identified or quantified due  
463 to its low concentration. In the transfucosylation of Gal-O-Me, it was possible to identify disaccharides and  
464 higher oligosaccharides. In this case, disaccharides constituted 70% of the products (mixture of isomers of  $\alpha$ -  
465 L-Fuc- $\beta$ -D-Gal-O-Me with  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 and  $\alpha$ -1,6 bonds, in proportion 45:42:13), 20% of the products were  
466 trisaccharides and 7% branched tetrasaccharides. In these tetrasaccharides, last bonds formed corresponded to  
467  $\alpha$ -1,3/6 and no longer to  $\alpha$ -1,2, what means that regioselectivity increased possibly due to steric impediments  
468 derived from size and shape of the molecule, which hindered the addition of fucose units. Other studied  
469 factors to increase the rate of transfucosylation were the addition of cosolvents (acetone, dimethyl sulfoxide  
470 or polyethylene glycol), as well as increasing the molar ratio D/A, but these factors had no effect on the  
471 efficiency of the reaction.

472 Obtention of new and varied fucooligosaccharides, in this case branched tetrasaccharides, by means of  
473 fucosidases, could lead in the future to new knowledge about the biological properties of complex  
474 polysaccharides [67].

#### 475 **7.4. *Homo sapiens***

476 The human being produces two fucosidases distributed in various tissues such as amniotic fluid, placenta,  
477 liver, kidney, etc. These two types of fucosidases differ in molecular weight, specificity, pH and optimal  
478 temperature [68]. White et al. [69] studied an  $\alpha$ -L-fucosidase purified from human liver. When using pNP-Fuc  
479 as donor and methanol as acceptor, they were able to synthesize Fuc-O-Me. This was the first evidence of the

480 synthetic capacity of the fucosidases. As mentioned in section 5.1, Fuc-O-Me can be used as a substrate for  
481 the synthesis of fucosylated oligosaccharides [2, 46].

#### 482 **7.5. *Pecten maximus***

483 Berteau et al. [67], studied the ability of the  $\alpha$ -L-fucosidase extracted from the digestive glands of the scallop  
484 (*Pecten maximus*) to catalyze transfucosylation reactions. The enzyme was able to transfer fucose from pNP-  
485 Fuc to different methylated acceptor substrates Gal-O-Me, Fuc-O-Me, Xyl-O-Me, Glc-O-Me and Man-O-Me  
486 in that order of preference, without presenting self-condensation products. The yields of the synthesis  
487 products were not reported. As mentioned in section 5.1, alkyl fucosides can be used as substrates for the  
488 synthesis of oligosaccharides and also can be used as biosurfactants [2, 46].

#### 489 **7.6. *Sus scrofa domesticus***

490 Svensson and Thiem [70], used the porcine liver  $\alpha$ -L-fucosidase to transfer fucose from pNP-Fuc to Gal-O-  
491 Me, the reaction was performed in the presence of DMSO obtaining a mixture of  $\alpha$ -1,2 and  $\alpha$ -1,6 isomers of  
492  $\alpha$ -L-Fuc- $\beta$ -D-Gal-O-Me. On the other hand, when Fuc-F was used as a donor, the same products were  
493 obtained but at lower yields.

494 Murata et al. [38], employed this  $\alpha$ -L-fucosidase to transfer fucose from pNP-Fuc to LacNAc achieving the  
495 synthesis of three isomers of  $\alpha$ -L-Fuc-D-LacNAc with fucosyl bonds  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 and  $\alpha$ -1,6 in a ratio  
496 40:37:23 respectively. The total yield of this synthesis was 13%.

497 Zeng et al. [71], used the same  $\alpha$ -L-fucosidase for the regioselective synthesis of pNP-glycosides using pNP-  
498 Fuc as a donor. When using pNP-Gal as acceptor, three isomers of pNP-Gal-Fuc were formed with  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -  
499 1,3 and  $\alpha$ -1,6 bonds in a 58:22:20 ratio respectively and a total yield of 40.6%. When changing the acceptor  
500 substrate for pNP-Lac, the same type of bonds between fucose and galactose ( $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 and  $\alpha$ -1,6) were  
501 synthesized, but in a different proportion (25:45:30 respectively) and a total yield of 6.7%. When using pNP-  
502 GlcNAc as acceptor,  $\alpha$ -1,3 and  $\alpha$ -1,4 bonds were formed. When using pNP-Glc, four isomers of pNP-Glc-Fuc  
503 were synthesized with  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 bonds.

504 Trisaccharide  $\alpha$ -L-Fuc-(1-2)-D-LacNAc is of biological importance as it is part of the structure of the H type  
505 2 antigen [24]. The disaccharide  $\alpha$ -L-Fuc-(1-2)-D-Gal is present in glycoconjugates and in human milk  
506 oligosaccharides, for example 2'FL, lactodifucotetraose and LNFP-I [32]. On the other hand,  $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-

507 D-Gal is part of a nonasaccharide complex isolated from human milk. In addition, it has been reported that  
508 glycoconjugate structures in tumor tissue may contain this disaccharide [71, 72].

## 509 **8. Conclusions and future perspectives**

510 Fucosidases have a wide potential to synthesize fucosylated compounds of commercial importance and for  
511 applied research. The preparation of different regioselectivity fucosylated compounds is useful for  
512 investigating the biological functions of these oligosaccharides [71].

513 From all fucosidases studied, bacterial fucosidases exhibit the highest yields of transfucosylation, for example *P.*  
514 *thiaminolyticus* (69%) and *Alcaligenes* sp. (67%), and it is remarkable that bacterial fucosidases have been the first ones in  
515 employing alcohols as acceptors (*P. thiaminolyticus*), in transfucosylation reactions. In the case of fungi, *A. niger* showed  
516 the highest yield of this group (61%), while fucosidase from *F. proliferatum* successfully employed the recently employed  
517 substrate XyG in transfucosylation reactions. In the group of animal fucosidases, the best fucosidase for transfucosylation  
518 was the bovine kidney fucosidase with a yield of synthesis of 14%. It is important to recognize that fucosidases from these  
519 three different sources are able to synthesize as well fucooligosaccharides as pNP-fucosides, and methyl-fucosides; for  
520 example isomers of FL were synthesized in the highest yields with fucosidases from bacteria *Alcaligenes* sp. (3FL, yield  
521 34%), *T. maritima* (FL, yield 32.5%) and the fungus *F. proliferatum* (2'FL, yield 14%).

522 Of the broad spectrum offered by nature, only few fucosidases have shown potential for synthesis of  
523 fucosylated compounds and have turned out to be interesting study models and encourage to continue with  
524 research in this area of study, focusing not only in increasing the yields of the synthesis but also towards a  
525 future scaling of processes. In addition, a whole plethora of fucosidases is expected to be studied for its ability  
526 of synthesis. Just to mention some examples, so far there is no report about the ability of transfucosylation by  
527 plant fucosidases.

528 Remarkable advances have been achieved not only by manipulating the reaction conditions to favor the  
529 balance towards synthesis, but also complementing this approach with modifications on the enzyme itself  
530 through genetic engineering, which has allowed to obtain modified enzymes that offer important and  
531 attractive characteristics, such as higher yields than wild type enzymes and which do not hydrolyze the  
532 synthesized products obtained by transfucosylation [7, 34-36]. The development of these modified enzymes is  
533 complicated, it is expected that in the future, advances in molecular biology will allow to expand the  
534 repertoire of modified fucosidases.

535 Quest for new donor substrates represents an interesting area of research, XyG, the fucoidans present in algae,  
536 and the fucosylated chondroitin sulfate of sea cucumber [19,73,74] could be considered as candidates in the  
537 search for new donor substrates other than pNP-Fuc [44,45], which is widely used, and which has certain  
538 disadvantages such as low solubility in aqueous media and toxicity, which restrict it for certain purposes, for  
539 example synthesis of fucooligosaccharides oriented to food products. An advantage of using XyG as a donor  
540 substrate is its high availability, since it can be obtained from agroindustrial by-products such as citric peel,  
541 and that during transfucosylation reactions, side products released (glucanes) are safe; on the other hand the  
542 number of fucosidases from family GH29 that can use it as a donor substrate is limited to an  $\alpha$ -L- fucosidase  
543 from *F. graminearum*, a fucosidase from soil metagenome (Mfuc5), and the  $\alpha$ -L-fucosidase from *T. maritima*,  
544 with relatively low yields as shown above [41]. In the case of fucoidan, its highly available from several  
545 species of marine seaweed, but the remotion of sulfate group in the anomeric center of fucose units, as well as  
546 the use of fucoidanases, needs to be achieved in order to proceed to the synthesis of fucooligosaccharides. In  
547 fact, is important to mention that XyG as well as fucoidan are simple and well-defined compounds, but  
548 families of compounds that shows structural differences from one species to other, so specific strategies of  
549 purification, pretreatment with endoglycosidases and transfucosylation conditions, would need to be  
550 developed in every case to succeed in the synthesis of fucosylated compounds [74]. Therefore, the study of  
551 fucosidases in the synthesis of oligosaccharides thus represents a promising field of science, barely explored  
552 in the last 30 years, which keeps us surprises about to be discovered.

### 553 **Conflict of interest**

554 The authors declare that they have no conflict of interest.

### 555 **9. References**

- 556 1. Intra, J., Perotti, M. E., Pavesi, G. and Horner, D. (2007) *Gene* 392, 34-46.
- 557 2. Benešová, E., Lipovova, P., Dvorakova, H. and Kralova, B. (2013) *Glycobiology* 23, 1052-1065.
- 558 3. Rodríguez-Díaz, J., Carbajo, R. J., Pineda-Lucena, A., Monedero, V. and Yebra, M. J. (2013) *Appl.*  
559 *Environ. Microbiol.* 79, 3847-3850.
- 560 4. Shaikh, F. A., Lammerts van Bueren, A., Davies, G. J. and Withers, S. G. (2013) *Biochemistry* 52,  
561 5857-5864.
- 562 5. Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* 280, 309-316.

- 563 6. CAZy Carbohydrate-Active Enzymes: <http://www.cazy.org> (Revised 2018)
- 564 7. Hancock, S. M., Vaughan, M. D. and Withers, S. G. (2006) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 509-519.
- 565 8. Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J. D. and Meyer, A. S. (2014) *J. Agric. Food. Chem.* 62, 9615-9631.
- 566 9. Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulff, L., Gotfredsen, C. H., Mikkelsen, M. D. and Mikkelsen, J. D. (2016)
- 567 *PLoS ONE* 11, e0147438.
- 568 10. McCarter, J. D. and Withers, S. G. (1994) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 885-892.
- 569 11. Withers, S. and Williams, S. (2017) Glycoside hydrolases:
- 570 [https://www.cazypedia.org/index.php?title=Glycoside\\_hydrolases&oldid=11575](https://www.cazypedia.org/index.php?title=Glycoside_hydrolases&oldid=11575) (Revised 2018)
- 571 12. Nagae, M., Tsuchiya, A., Katayama, T., Yamamoto, K., Wakatsuki, S. and Kato, R. (2007) *J. Biol.*
- 572 *Chem.* 282, 18497-18509.
- 573 13. Luis, A. (2018) Glycoside hydrolase family 141:
- 574 [https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_141](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_141) (Revised 2018)
- 575 14. Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A. S., Baslé, A., Gray, J., Venditto, I., Briggs, J., Zhang,
- 576 X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffetto, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R. A., Zhu, Y., O'Neill,
- 577 M. A., Urbanowicz, B. R., York, W. S., Davies, G. J., Abbott, D. W., Ralet, M.-C., Martens, E. C.,
- 578 Henrissat, B. and Gilbert H. J. (2017) *Nature* 544, 65-70.
- 579 15. Moreti, R., Perrella, N. N. and Lopes, A. R. (2013) *J. Insect. Physiol.* 59, 1069-1075.
- 580 16. Alhadef, J. A., Khunsook, S., Choowongkamon, K., Baney, T., Heredia, V., Tweedie, A. and Bean,
- 581 B. (1999) *Mol. Hum. Reprod.* 5, 809-815.
- 582 17. Matsumoto, M., Hirata, J., Hirohashi, N. and Hoshi, M. (2002) *Zoolog. Sci.* 19, 43-48.
- 583 18. Culleton, H., McKie, V. and de Vries, R. P. (2013) *Biotechnol. J.* 8, 884-894.
- 584 19. Del-Bem, L.-E. (2018) *New Phytol.* 219, 1150-1153.
- 585 20. Rodríguez-Díaz, J., Rubio-del-Campo, A. and Yebra, M. J. (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78,
- 586 4613-4619.
- 587 21. BRENDA Braunschweig Enzyme Database: <http://www.brenda-enzymes.info> (Revised 2018)
- 588 22. Weijers, C. A., Franssen, M. C. and Visser, G. M. (2008) *Biotechnol. Adv.* 26, 436-456.
- 589 23. Palcic, M. M. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 616-624.
- 590 24. Watt, G. M., Lowden, P. A. and Flitsch, S. L. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 652-660.

- 591 25. Crout, D. H. and Vic, G. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 98-111.
- 592 26. Palcic, M. M. (2011) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 226-233.
- 593 27. Petschacher, B. and Nidetzky, B. (2016) *J. Biotechnol.* 235, 61-83.
- 594 28. Chin, Y.-W., Seo, N., Kim, J.-H. and Seo, J.-H. (2016) *Biotechnol. Bioeng.* 113, 2445-2452.
- 595 29. Li, C., Zhu, S., Ma, C. and Wang, L.-X. (2017) *J. Am. Chem. Soc.* 139, 15074-15087.
- 596 30. Sakurama, H., Fushinobu, S., Hikada, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H., Kitaoka, M.,  
597 Kumagai, H., Yamamoto, K. and Katayama, T. (2012) *J. Biol. Chem.* 287, 16709-16719.
- 598 31. Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai,  
599 H., Kitaoka, M., Yamamoto, K. (2008) *FEBS Lett.* 582, 3739-3743.
- 600 32. Sugiyama, Y., Gotoh, A., Katoh, T., Honda, Y., Yoshida, E., Kurihara, S., Ashida, H., Kumagai,  
601 H., Yamamoto, K., Kitaoka, M. and Katayama, T. (2016) *Glycobiology* 26, 1235-1247.
- 602 33. Sugiyama, Y., Katoh, T., Honda, Y., Gotoh, A., Ashida, H., Kurihara, S., Yamamoto, K., Katayama, T.  
603 (2017) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81, 283-291.
- 604 34. Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Bedini, E., Corsaro, M. M., Parrilli, M., Sulzenbacher, G., Lipski,  
605 A., Dal Piaz, F., Lepore, L., Rossi, M. and Moracci, M. (2009) *Chem. Biol.* 16, 1097-1108.
- 606 35. Saumonneau, A., Champion, E., Peltier-Pain, P., Molnar-Gabor, D., Hendrickx, J., Tran, V.,  
607 Hederos, M., Dekany, G. and Tellier, C. (2016) *Glycobiology* 26, 261-269.
- 608 36. Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C. and Tellier, C. (2007)  
609 *Biochemistry* 46, 1022-1033.
- 610 37. Zeuner, B., Vuillemin, M., Holck, J., Muschiol, J. and Meyer, A. S. (2018) *Enzyme Microb. Technol.*  
611 115, 37-44.
- 612 38. Murata, T., Morimoto, S., Zeng, X., Watanabe, S. and Usui, T. (1999) *Carbohydr. Res.* 320, 192-  
613 199.
- 614 39. Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-  
615 Garibay, M. and Cruz-Guerrero, A. (2018) *Appl. Biochem. Biotechnol.*
- 616 40. Shvetsova, S. V., Shabalin, K. A., Bobrov, K. S., Ivanen, D. R., Ustyuzhanina, N. E., Krylov, V. B.,  
617 Nifantiev, N. E., Naryzhny, S. N., Zgoda, V. G., Eneyskaya, E. V. and Kulminskaya, A. A. (2017)  
618 *Biochimie* 132, 54-65.



- 619 41. Zeuner, B., Muschiol, J., Holck, J., Lezyk, M., Gedde, M. R., Jers, C., Mikkelsen, J. D. and Meyer,  
620 A. S. (2018) *N. Biotechnol.* 41, 34-45.
- 621 42. Farkas, E., Thiem, J. and Ajsaka, K. (2000) *Carbohydr. Res.* 328, 293-299.
- 622 43. Ajsaka, K. and Shirakabe, M. (1992) *Carbohydr. Res.* 224, 291-299.
- 623 44. Koizumi, M., Yamamoto, Y., Ito, Y., Tanako, M. Enami, T., Kamata, E. and Hasegawa R. (2001) *J.*  
624 *Toxicol. Sci.* 26, 299-311.
- 625 45. Zhang, H., Fei, C. Z., Zhang, D. B. and Tang, F. (2007) *J. Hazard. Mater.* 145, 227-232.
- 626 46. Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Kalkkinen, N., Nifantiev, N. E., Arbatskii, N. P., Saenko, A.  
627 I., Chepurnaya, O. V., Arutyunyan, A. V., Shabalin, K. A. and Neustroev, K. N. (2001) *Glycoconj. J.*  
628 18, 827-834.
- 629 47. Prabasari, I., Pettolino, F., Liao, M.-L. and Bacic, A. (2011) *Carbohydr. Polym.* 84, 484-494.
- 630 48. Zeng, X., Murata, T. and Usui, T. (2003) *J. Carbohydr. Chem.* 22, 309-316.
- 631 49. Vitoria-Miñana, I. (2007) *Acta Pediatr. Esp.* 65, 129-133.
- 632 50. Weichert, S., Jennewein, S., Hufner, E., Weiss, C., Borkowski, J., Putze, J. and Schrotten, H. (2013)  
633 *Nutr. Res.* 33, 831-838.
- 634 51. Bode, L. (2015) *Early Hum. Dev.* 91, 619-622.
- 635 52. Watkins, W. M., Greenwell, P., Yates, A. D. and Johnson, P. H. (1988) *Biochimie* 70, 1597-1611.
- 636 53. Velupillai, P. and Harn, D. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 18-22.
- 637 54. Liu, S., Kulinich, A., Cai, Z. P., Ma, H. Y., Du, Y. M., Lv, Y. M., Liu, L. and Voglmeir, J. (2016)  
638 *Glycobiology* 26, 871-879.
- 639 55. Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V. and Yebra, M. J. (2011) *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 703-705.
- 640 56. Pratt, M. R. and Bertozzi, C. R. (2005) *Chem. Soc. Rev.* 34, 58-68.
- 641 57. Lee, W.-H., Pathanibul, P., Quarterman, J., Jo, J.-H., Han, N. S., Miller, M. J., Jin, Y.-S. and Seo, J.-  
642 H. (2012) *Microb. Cell Fact.* 11, 48.
- 643 58. Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G. M., Altaye, M., Jiang, X., Guerrero, M. L., Meinzen-Derr, J. K.,  
644 Farkas, T., Chaturvedi, P., Pickering, L. K. and Newburg, D. S. (2004) *J. Pediatr.* 145, 297-303.
- 645 59. Newburg, D. S. (2009) *J. Anim. Sci.* 87, 26-34.

- 646 60. Good, M., Sodhi, C. P., Yamaguchi, Y., Jia, H., Lu, P., Fulton, W. B., Martin, L. Y., Prindle, T.,  
647 Nino, D. F., Zhou, Q., Ma, C., Ozolek, J. A., Buck, R. H., Goehring, K. C. and Hackam, D. J. (2016)  
648 *Br. J. Nutr.* 116, 1175-1187.
- 649 61. Nutritional Outlook: [http://www.nutritionaloutlook.com/food-beverage/infant-formulas-europe-](http://www.nutritionaloutlook.com/food-beverage/infant-formulas-europe-approved-include-human-milk-oligosaccharide-ingredient-helps-close-gap)  
650 [approved-include-human-milk-oligosaccharide-ingredient-helps-close-gap](http://www.nutritionaloutlook.com/food-beverage/infant-formulas-europe-approved-include-human-milk-oligosaccharide-ingredient-helps-close-gap) (revised 2018)
- 651 62. Sotgiu, S., Arru, G., Fois, M. L., Sanna, A., Musumeci, M., Rosati, G. and Musumeci, S. (2006) *Int.*  
652 *J. Biomed. Sci.* 2, 114-120.
- 653 63. Ajisaka, K., Fujimoto, H. and Miyasato, M. (1998) *Carbohydr. Res.* 309, 125-129.
- 654 64. Giordano, A., Andreotti, G., Tramice, A. and Trincone, A. (2006) *Biotechnol. J.* 1, 511-530.
- 655 65. Nilsson, K. G. I., Eliasson, A. and Larsson-Lorek, U. (1995) *Biotechnol. Lett.* 17, 717-722.
- 656 66. Nilsson, K. G. I., Pan, H. and Larsson-Lorek, U. (1997) *J. Carbohydr. Chem.* 16, 459-477.
- 657 67. Berteau, O., Bielicki, J., Kilonda, A., Machy, D., Anson, D. S. and Kenne, L. (2004) *Biochemistry*  
658 43, 7881-7891.
- 659 68. Wiederschain, G. Y., Kolibaba, L. G. and Rosenfeld, E. L. (1973) *Clin. Chim. Acta* 46, 305-310.
- 660 69. White, W. J., Jr., Schray, K. J., Legler, G. and Alhadeff, J. A. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 912,  
661 132-138.
- 662 70. Svensson, S. C. and Thiem, J. (1990) *Carbohydr. Res.* 200, 391-402.
- 663 71. Zeng, X., Morimoto, S., Murata, T. and Usui, T. (1999) *J. Appl. Glycosci.* 46, 241-247.
- 664 72. Yamashita, K., Tachibana, Y. and Kobata, A. (1976) *Biochemistry* 15, 3950-3955.
- 665 73. Myron, P., Siddiquee, S. and Al Azad, S. (2014) *Carbohydr. Polym.* 112, 173-178.
- 666 74. Ale, M. T. and Meyer, A. S. (2013) *RSC Adv.* 3, 8131-8141.
- 667
- 668

**669 Figure legends**

670 **Fig. 1** Structures of some human milk oligosaccharides.

671 **Fig. 2** Catalytic mechanism for retention (A) and inversion (B)  $\alpha$ -L-fucosidases. X, is the leaving group from  
672 fucosyl donor, HOR is the acceptor substrate.

673 **Fig. 3** Distribution of fucosidases in nature. Ar, archaea; Ba, bacteria; Pr, protists; Pl, plants; Fu, fungi; T,  
674 trematodes; Mo, molluscs; N, nematodes; Ch, chelicerated; Cr, crustaceans; In, insects; Ec, echinoderms; As,  
675 ascidians; Fi, fishes; Am, amphibians; Bi, birds and Ma, mammals.

**Table 1** Bacterial fucosidases and their reaction conditions for transfucosylation

Organism	pH	T (°C)	t (h)	Donor	Acceptor	Synthesis products	Yield (%)	References
<i>Alcaligenes</i> sp.	7	50	24	pNP-Fuc (10.5 mM)	LacNAc (260.9 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-LacNAc	54	[38]
	7	50	24	pNP-Fuc (10.5 mM)	Lactose (204.7 mM)	3FL	34	
	7	50	24	pNP-Fuc (10.5 mM)	$\beta$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ -D-Glc-O-Me (205.9 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ - D-Glc-O-Me	42	
	7	50	24	pNP-Fuc (10.5 mM)	$\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ -D-Glc-O-Me (205.9 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ - D-Glc-O-Me	67	
	7	50	24	pNP-Fuc (10.5 mM)	$\beta$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ -D-GlcNAc-O- Me (183.6 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-Gal-(1-4)- $\beta$ - D-GlcNAc-O-Me	67	
	7	50	80	pNP-Fuc (14.6 mM)	pNP-LacNAc (33 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-LacNAc-pNP $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-LacNAc-pNP	1 37	[48]
	7	50	68	pNP-Fuc (14.6 mM)	pNP-Lac (45 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Lac-pNP $\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-Lac-pNP $\alpha$ -L-Fuc-(1-6)- $\beta$ -D-Lac-pNP	3 34 1	
	7	50	68	pNP-Fuc (14.6 mM)	pNP-Glc (69.2 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-Glc-pNP $\alpha$ -L-Fuc-(1-4)- $\beta$ -D-Glc-pNP	45 8	
	7	50	68	pNP-Fuc (14.6 mM)	pNP-GlcNAc (60.9 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc-pNP $\alpha$ -L-Fuc-(1-4)- $\beta$ -D-GlcNAc-pNP	1 12	

<i>Anaerolinea thermophila</i> (Mfuc5)	7	30	0.8	pNP-Fuc (20 mM)	Lactose (25 mM)	2'FL	0.15	[9]
						FL	1.2	
						$\alpha$ -L-Fuc-(1-2/3/4)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	3.7	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	7	30	~0.4	XyG (Fucose 5.5 mM)	Lactose (140 mM)	FL	3.9 <sup>a</sup>	
	5.5	40	0.083	3FL (10 mM)	LNT (100 mM)	LNFP-II	13	[41]
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	5.5	40	0.083	3FL (10 mM)	LNnT (100 mM)	LNFP-II	1.4	
	7	37	~0.5	3FL (20 mM)	LNT (20 mM)	LNFP-II	6	[35]
<i>Clostridium perfringens</i>	7	37	~0.5	3FL (200 mM)	LNT (200 mM)	LNFP-II	12	
	7	40	0.167	3FL (10 mM)	LNT (100 mM)	LNFP-II	39	[41]
	7	40	0.583	3FL (20 mM)	LNT (20 mM)	LNFP-II	35	
	7	40	0.167	3FL (10 mM)	LNnT (100 mM)	LNFP-III	5	
	7	40	0.167	3FL (20 mM)	LNnT (20 mM)	LNFP-III	1.2	
<i>Corynebacterium</i> sp.	8	37	16	pNP-Fuc (39.8 mM)	Galactose (398.1 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)-D-Gal	18	[43]
	8	37	16	pNP-Fuc (82.9 mM)	Gal-O-Me (905.4 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Gal-O-Me	25	
<i>Cylindrospermum stagnale</i>	7	30	0.8	pNP-Fuc (20 mM)	Lactose (25 mM)	FL	0.05	[9]
						$\alpha$ -L-Fuc-(1-2/3/4)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	33.7	
<i>Emticicia oligotrophica</i>	7	37	24	pNP-Fuc (60 mM)	4- methylumbelliferone (0.02 mM)	7-Fuc-4-methylumbelliferone	15	[54]

*Lactobacillus casei* BL23

( $\alpha$ -L-fucosidase AlfB)	7	42	~0.5	pNP-Fuc (50 mM)	GlcNAc (200 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-GlcNAc	23	[3]
--------------------------------	---	----	------	-----------------	-----------------	--------------------------------	----	-----

( $\alpha$ -L-fucosidase AlfC)	7	42	~0.5	pNP-Fuc (50 mM)	GlcNAc (200 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-6)-D-GlcNAc	56	
--------------------------------	---	----	------	-----------------	-----------------	--------------------------------	----	--

<i>Mahella australiensis</i>	7	30	0.8	pNP-Fuc (20 mM)	Lactose (25 mM)	FL	0.1	[9]
------------------------------	---	----	-----	-----------------	-----------------	----	-----	-----

$\alpha$ -L-Fuc-(1-2/3)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	0.8	
--	-----	--

<i>Paenibacillus</i>	8	45	3.5	pNP-Fuc (50 mM)	pNP-Gal (33 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\alpha$ -D-Gal-pNP	32	[2]
----------------------	---	----	-----	-----------------	-----------------	--	----	-----

*thiaminolyticus*

	8	45	3.3	pNP-Fuc (50 mM)	pNP-Glc (33 mM)	$\alpha$ -L-Fuc- $\alpha$ (1-2/6)- $\alpha$ -D-Glc-pNP	21	
--	---	----	-----	-----------------	-----------------	--	----	--

(1:1)

	8	45	4	pNP-Fuc (50 mM)	pNP-Man (33 mM)	NI <sup>b</sup>	NQ <sup>c</sup>	
--	---	----	---	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	--

	8	45	3.5	pNP-Fuc (80 mM)	pNP-Fuc	$\alpha$ -L-Fuc $\alpha$ (1-2/4)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	14	
--	---	----	-----	-----------------	---------	---	----	--

(1:1)

	8	45	4	pNP-Fuc (20 mM)	Methanol (30 % v/v)	Fuc-O-Me	69	
--	---	----	---	-----------------	---------------------	----------	----	--

	8	45	3.5	pNP-Fuc (60 mM)	Ethanol (10 % v/v)	Fuc-O-Et	56	
--	---	----	-----	-----------------	--------------------	----------	----	--

	8	45	2	pNP-Fuc (20 mM)	1-Propanol (5 % v/v)	Fuc-O-Pro	48	
--	---	----	---	-----------------	----------------------	-----------	----	--

	8	45	3	pNP-Fuc (60 mM)	2-Propanol (10 % v/v)	Fuc-O-(2-Pro)	34	
--	---	----	---	-----------------	-----------------------	---------------	----	--

	8	45	0.8	pNP-Fuc (60 mM)	Octanol, 2-octanol (10 % v/v)	NI <sup>b</sup>	NQ <sup>c</sup>	
--	---	----	-----	-----------------	-------------------------------	-----------------	-----------------	--

	8	45	3.5	pNP-Fuc (40 mM)	Boc-L-Tre-OMe (40 mM)	Fuc-Boc-L-Tre-O-Me	3.5	
--	---	----	-----	-----------------	-----------------------	--------------------	-----	--

	8	45	3.5	pNP-Fuc (40 mM)	Boc-L-Ser-OMe (40 mM)	Fuc-Boc-L-Ser-O-Me	3.2	
--	---	----	-----	-----------------	-----------------------	--------------------	-----	--

*Roseiflexus* sp. RS-1

Mfuc1	7	30	0.8	pNP-Fuc (20 mM)	Lactose (25 mM)	FL	0.3	[9]
						$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	0.5	
Mfuc4	7	30	0.8	pNP-Fuc (20 mM)	Lactose (25 mM)	FL	0.2	[9]
						$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	0.9	
<i>Tannerella forsythia</i>	7	40	1	2'FL (10 mM)	LNT (100 mM)	Isomers of LNFP-I	35	[41]
	7	40	4	XyG (Fucose 2 mM)	Lactose (100 mM)	2'FL	0.7	
<i>Thermotoga maritima</i>	5	65	d	pNP-Fuc (150 mM)		$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	17	[36]
						NI <sup>b</sup>	3	
						Trisaccharide	7	
	5	40	6-8	pNP-Fuc (10 mM)	pNP-Gal (10 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	10.3	
	5	65	d	pNP-Fuc (20 mM)	pNP-Gal (40 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Gal-pNP	7	
	5	65	d	pNP-Fuc (18 mM)	pNP-Gal (100 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Gal-pNP	14	
	5	65	d	pNP-Fuc (50 mM)	$\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ -D-Glc-O-Ph (100 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Gal-pNP	7	
	5	65	d	pNP-Fuc (50 mM)	$\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ -D-Glc-O-Ph (100 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ - D-Glc-O-Ph	23	
	5	65	d	pNP-Fuc (50 mM)	$\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ -D-Glc-O-Ph (100 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ - D-Glc-O-Ph	8	
	5	65	d	pNP-Fuc (50 mM)	$\beta$ -D-Gal-(1-3)- $\beta$ -D-Glc-O-Ph (100 mM)	NI <sup>b</sup>	4	
7	30	1.25	pNP-Fuc (25 mM)	Lactose (100 mM)	2'FL	6.4	[9]	
7	30	0.8	pNP-Fuc (20 mM)	Lactose (25 mM)	2'FL	1		

						$\alpha$ -L-Fuc-(1-2/3/4)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	17.6	
	5	60	3	pNP-Fuc (24 mM)	Lactose (29 mM)	FL	0.1	[39]
				pNP-Fuc (24 mM)	Lactose (58 mM)	FL	0.1	
				pNP-Fuc (24 mM)	Lactose (584 mM)	FL	3.1	
				pNP-Fuc (3.5 mM)	Lactose (15 mM)	FL	0.3	
				pNP-Fuc (3.5 mM)	Lactose (58 mM)	FL	2	
				pNP-Fuc (3.5 mM)	Lactose (146 mM)	FL	6	
				pNP-Fuc (3.5 mM)	Lactose (292 mM)	FL	14.1	
				pNP-Fuc (3.5 mM)	Lactose (584 mM)	FL	25.2	
				pNP-Fuc (0.9 mM)	Lactose (146 mM)	FL	0.9	
				pNP-Fuc (0.9 mM)	Lactose (292 mM)	FL	9.3	
				pNP-Fuc (0.9 mM)	Lactose (584 mM)	FL	21.5	
				pNP-Fuc (0.9 mM)	Lactose (876 mM)	FL	32.5	
	4.6	40	1	2'FL (10 mM)	LNT (100 mM)	Isomers of LNFP I	10	[41]
<i>Thermobaculum terrenum</i>	7	30	0.8	pNP-Fuc (20 mM)	Lactose (25 mM)	2'FL	0.4	[9]
						FL	0.4	
						$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)- $\alpha$ -L-Fuc-pNP	3.1	
<i>Thermus</i> sp.	6.5	37	1	pNP-Fuc (10 mM)	Methanol (15% <sub>v/v</sub> )	Fuc-O-Me	40	[46]
	6.5	37	1	pNP-Fuc (10 mM)	Ethanol (15% <sub>v/v</sub> )	Fuc-O-Et	35	



	6.5	37	1	Fuc-O-Me (10 mM)	GlcNAc (50 mM)	L-Fuc-D-GlcNAc	20	
	6.5	37	1	Fuc-O-Me (10 mM)	GalNAc (50 mM)	L-Fuc-D-GalNAc	20	
<i>Xanthomonas campestris</i>	5	40	1	2'FL (10 mM)	LNT (100 mM)	Isomers of LNFP I	18	[41]

---

<sup>a</sup> With respect to the enzymatically accessible fucose

<sup>b</sup> NI= Not identified

<sup>c</sup> NQ= Not quantified

<sup>d</sup> Reaction was stopped until consumption of donor substrate

**Table 2** Fungal fucosidases and their reaction conditions for transfucosylation

Organism	pH	T (°C)	t (h)	Donor	Acceptor	Synthesis products	Yield (%)	References
<i>Aspergillus niger</i>	5	37	12	pNP-Fuc (29.7 mM)	Glucose (235.2 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-Glc	61	[43]
	5	37	12	pNP-Fuc (29.7 mM)	GlcNAc (191.5 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-GlcNAc	58	
<i>Fusarium graminearum</i>	4.6	40	1	2'FL (20 mM)	LNT (200 mM)	Isomers of LNFP I	15	[41]
	4.6	40	24	XyG (Fucose 2 mM)	Lactose (100 mM)	2'FL	14	
<i>Fusarium proliferatum</i>	5.5	37	0.66	pNP-Fuc (34 mM)	pNP- $\beta$ Gal, pNP- $\beta$ Glc (75 mM)	Nitrophenyl glycosides	NQ <sup>e</sup>	[40]
	5.5	37	0.66	pNP-Fuc (34 mM)	pNP- $\alpha$ Gal, oNP- $\alpha$ Glc, pNP- $\beta$ Xyl (75 mM)	Nitrophenyl diglycosides	NQ <sup>e</sup>	
	5.5	37	<sup>a</sup>	pNP-Fuc (80 mM)	pNP-Fuc	pNP-Fuc-Fuc	1.5	
	5.5	37	<sup>b</sup>	pNP-Fuc (7 mM)	Methanol (30% v/v)	Fuc-O-Me	0.12 <sup>c</sup>	
	5.5	37	<sup>b</sup>	pNP-Fuc (7 mM)	Ethanol (30% v/v)	Fuc-O-Et	0.07 <sup>c</sup>	
	5.5	37	<sup>b</sup>	pNP-Fuc (7 mM)	1-Propanol (20% v/v)	Fuc-O-Pro	0.17 <sup>c</sup>	
<i>Penicillium multicolor</i>	5	37	20	pNP-Fuc (35.1 mM)	Glucose (277.5 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-Glc	27.9	[63]
	5	37	4	pNP-Fuc (35.1 mM)	GlcNAc (226 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-GlcNAc	49	
	5	37	30	pNP-Fuc (140 mM)	$\alpha$ -D-GlcNAc-O-Me (700 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAc-O-Me	29	[42]
	5	37	30	pNP-Fuc (140 mM)	$\alpha$ -D-GlcNAc-O-All (700 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAc-All	34	
	5	37	30	pNP-Fuc (140 mM)	$\beta$ -D-GlcNAc-O-All (700 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc-All	25	
	5	37	24	Fuc-F (160 mM)	$\alpha$ -D-GlcNAc-O-Me (800 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAc-Me	13	

5	37	24	Fuc-F (160 mM)	$\alpha$ -D-GlcNAc-O-All (800 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\alpha$ -D-GlcNAc-All	8
5	37	24	Fuc-F (160 mM)	$\beta$ -D-GlcNAc-O-All (800 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)- $\beta$ -D-GlcNAc-All	<sup>d</sup>
5	37	24	Fuc-F (160 mM)	GlcNAc (800 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-GlcNAc	7
5	37	24	Fuc-F (160 mM)	Glucose (800 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-3)-D-Glc	34

<sup>a</sup> Reaction was stopped when the conversion of substrate reached  $\approx 60$

<sup>b</sup> Time to reach 20 – 60% hydrolysis

<sup>c</sup> Reported by authors as transglycosylation effectiveness

<sup>d</sup> The most abundant product was unexpected because did not come from fucosidase activity. Expected fucosylated product was not quantified because its quantity was too low

<sup>e</sup> NQ= Not quantified

**Table 3** Animal fucosidases and their reaction conditions for transfucosylation

Organism	pH	T (°C)	t (h)	Donor	Acceptor	Synthesis products	Yield %	References
<i>Ampullaria sp.</i>	5	37	16	pNP-Fuc (79.9 mM)	Gal-O-Me (973 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-6)- $\beta$ -D-Gal-O-Me	14	[43]
<i>Bos taurus</i>								
(kidney)	5.5	27	<sup>a</sup>	pNP-Fuc (30 mM)	$\beta$ -D-[(6-O-Bn)-GlcNAc]-SEt (100 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-4)- $\beta$ -D-[(6-O-Bn)- GlcNAc]-Set	50	[65]
(testicle)	6	30	52	pNP-Fuc (30 mM)	$\beta$ -D-[(6-O-Bn)-GlcNAc]-SEt (100 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-4)- $\beta$ -D-[(6-O-Bn)- GlcNAc]-SEt	33	[66]
<i>Canis lupus familiaris</i>								
	7	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Fuc-O-Me (210 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2/3)- $\alpha$ -L-Fuc-O-Me	13	[67]
	7	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Glc-O-Me (210 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2/3/4/6)- $\beta$ -D-Glc-O- Me	3	
	7	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Xyl-O-Me (210 mM)	NI <sup>c</sup>	NQ <sup>d</sup>	
	7	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Gal-O-Me (210 mM)	$\alpha$ -L-Fuc- $\alpha$ (1-2/3/6)- $\beta$ -D-Gal-O- Me (45:42:13)	17	
	7	40	48			Oligosaccharides (DP <sup>b</sup> > 2)	NQ <sup>d</sup>	
	7	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Man-O-Me (210 mM)	NI <sup>c</sup>	NQ <sup>d</sup>	
<i>Homo sapiens</i>								
	5	37	0.17	pNP-Fuc (0.3 mM)	Methanol (30-3080 mM)	Fuc-O-Me	NQ <sup>d</sup>	[69]
<i>Pecten maximus</i>								
	4	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Fuc-O-Me (210 mM)	NI <sup>c</sup>	NQ <sup>d</sup>	[67]
	4	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Gal-O-Me (210 mM)	NI <sup>c</sup>	NQ <sup>d</sup>	
	4	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Xyl-O-Me (210 mM)	NI <sup>c</sup>	NQ <sup>d</sup>	

	4	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Glc-O-Me (210 mM)	NI <sup>c</sup>	NQ <sup>d</sup>	
	4	40	48	pNP-Fuc (70 mM)	Man-O-Me (210 mM)	NI <sup>c</sup>	NQ <sup>d</sup>	
<i>Sus scrofa domestica</i>	4.8	37	120	pNP-Fuc (330 mM)	Gal-O-Me (1330 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)-Gal-O-Me	6.5	[70]
						$\alpha$ -L-Fuc-(1-6)-Gal-O-Me	10	
	4.8	37	120	Fuc-F (180 mM)	Gal-O-Me (133 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2)-Gal-O-Me	5	
						$\alpha$ -L-Fuc-(1-6)-Gal-O-Me	4.7	
	4.8	40	30	pNP-Fuc (27.3 mM)	LacNAc (347.8 mM)	$\alpha$ -L-Fuc-(1-2/3/6)-D-LacNAc	13	[38]
	4.8	40	48	pNP-Fuc (13 mM)	pNP- Gal (110.7 mM)	Fuc $\alpha$ (1-2/3/6)- $\beta$ -Gal-pNP	40.6	[71]
						(58:22:20)		
	4.8	40	52	pNP-Fuc (12.5 mM)	pNP-Glc (118.6 mM)	Fuc $\alpha$ (1-2/3/4/6)- $\beta$ -Glc-pNP	21.2	
						(29:60:4:7)		
	4.8	40	15	pNP-Fuc (11.7 mM)	pNP-Lac (36 mM)	Fuc $\alpha$ (1-2/3/6)- $\beta$ -Lac-pNP	6.7	
						(25:45:30)		
	4.8	40	48	pNP-Fuc (14 mM)	pNP-GlcNAc (29.2 mM)	Fuc $\alpha$ (1-3/4)- $\beta$ -GlcNAc (38:62)	3.2	

<sup>a</sup> Reaction was stopped when 70% of donor was consumed.

<sup>b</sup> DP=Degree of polymerization

<sup>c</sup> NI= Not identified.

<sup>d</sup> NQ= Not quantified.

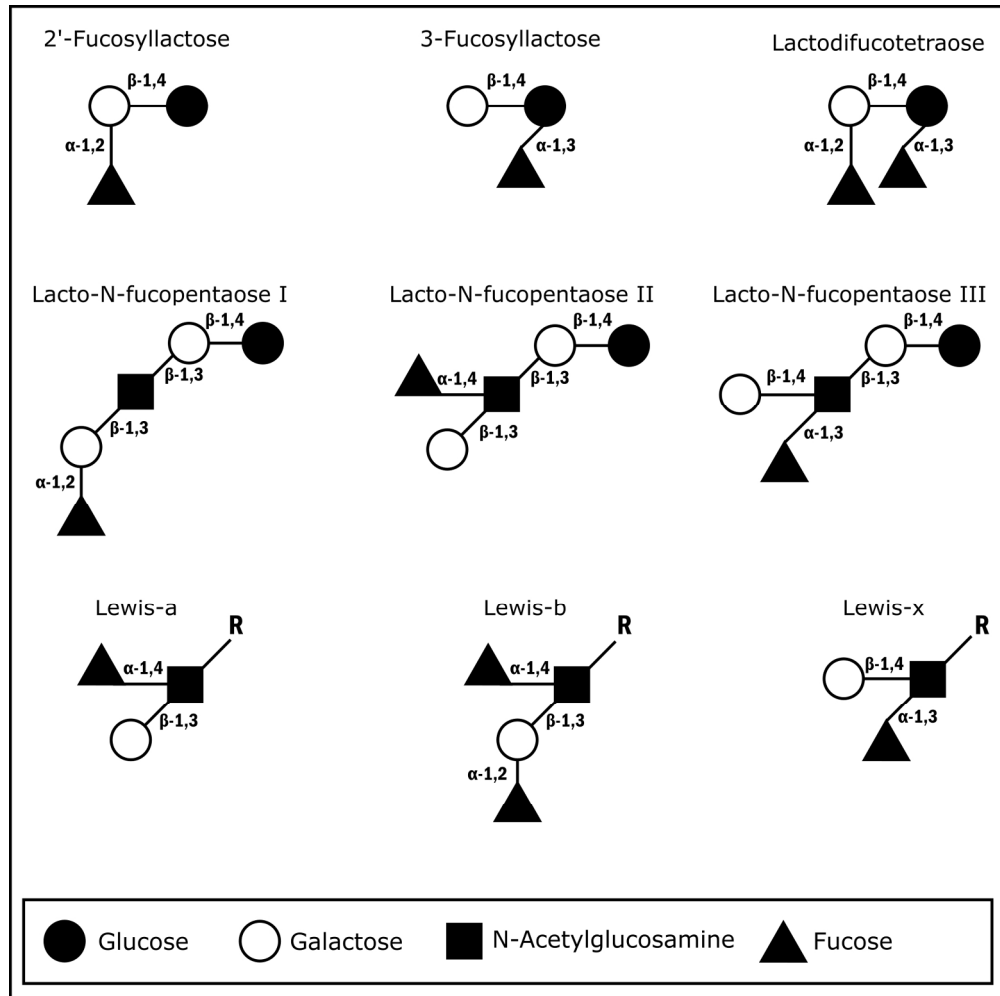


Fig. 1 Structures of some human milk oligosaccharides

174x173mm (299 x 299 DPI)

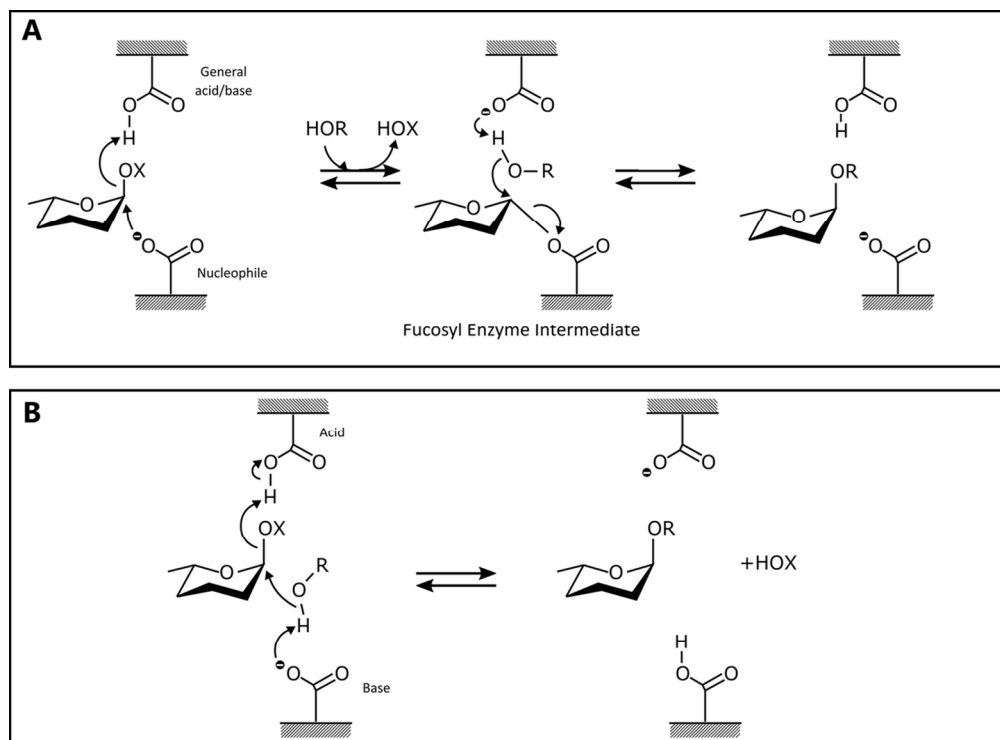


Fig. 2 Catalytic mechanism for retention (A) and inversion (B)  $\alpha$ -L-fucosidases. X, is the leaving group from fucosyl donor, HOR is the acceptor substrate.

107x79mm (300 x 300 DPI)

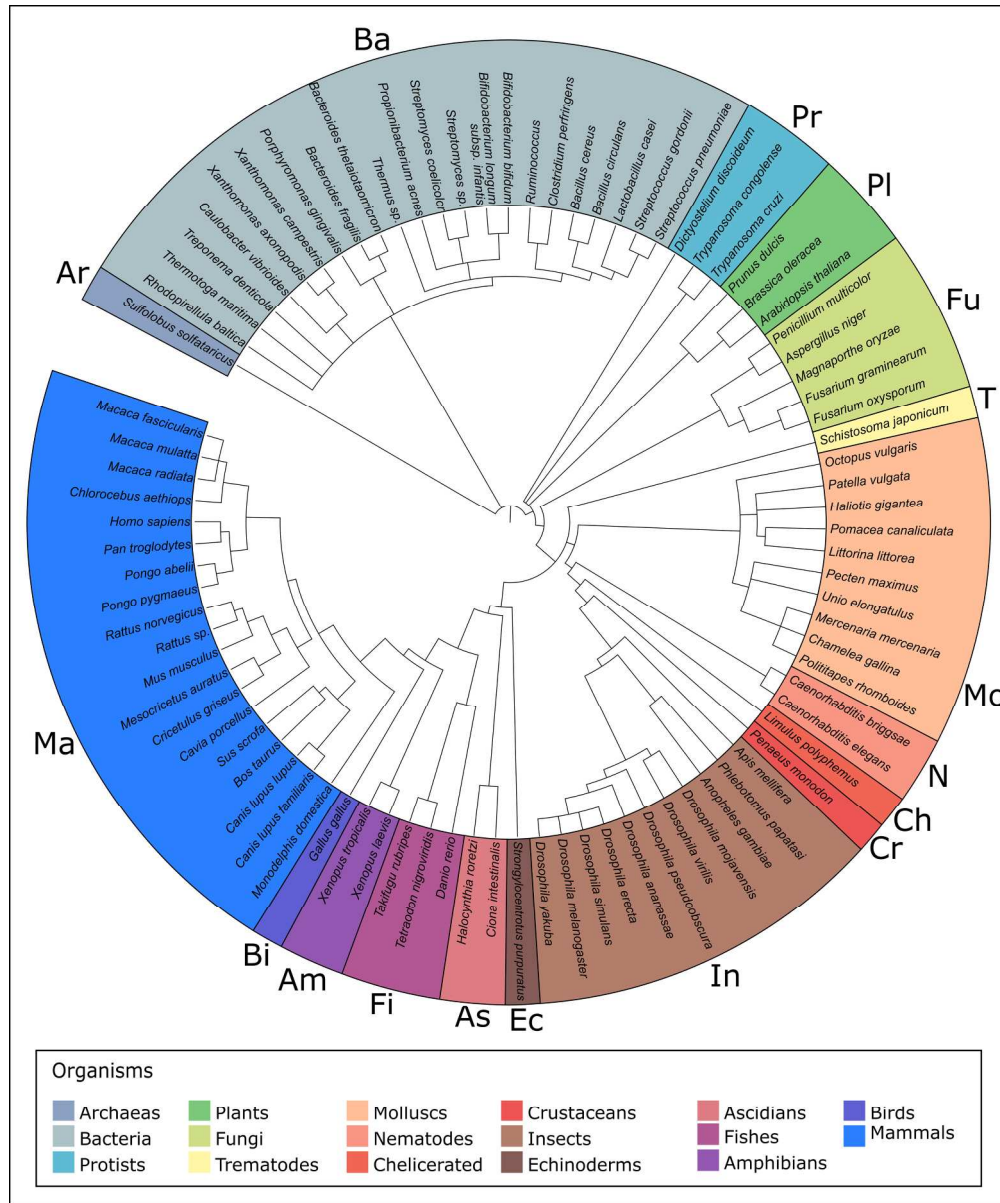


Fig. 3 Distribution of fucosidases in nature. Ar, archaea; Ba, bacteria; Pr, protists; Pl, plants; Fu, fungi; T, trematodes; Mo, molluscs; N, nematodes; Ch, chelicerated; Cr, crustaceans; In, insects; Ec, echinoderms; As, ascidians; Fi, fishes; Am, amphibians; Bi, birds and Ma, mammals.

209x251mm (300 x 300 DPI)





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00203

Matrícula: 2143800320

SINTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS  
FUCOSILADOS CON ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA EMPLEANDO  
FUCOSIDASA DE THERMOTOGA  
MARITIMA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 6 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO  
DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA  
DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS  
DR. SERGIO HUERTA OCHOA

Bajo la Presidencia de la primera 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:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: FRANCISCO JAVIER GUZMAN RODRIGUEZ

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



FRANCISCO JAVIER GUZMAN RODRIGUEZ

ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

*Aprobar*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ  
SERRANO

VOCAL

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE  
SANTAMARIA

VOCAL

DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS

SECRETARIO

DR. SERGIO HUERTA OCHOA