



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

“Síntesis de fucooligosacáridos empleando α -L-fucosidasas microbianas: estudio *in vitro* e *in silico*”

Tesis que para obtener el grado de:

Doctor en Biotecnología

Presenta

M. en B. Mauricio Eduardo Pavón Chimal

Matrícula: 2173801844

Comité tutorial:

Directora: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesor: Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría

Asesor: Dr. Luis Guillermo González Olivares

Jurado:

Presidente: Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría

Secretario: Dr. Francisco Javier Guzmán Rodríguez

Vocal: Dr. Agustín López-Munguía Canales

Vocal: Dr. Luis Guillermo González Olivares

Ciudad de México a 13 de diciembre de 2023

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCyT, con la referencia 001466

Este trabajo fue realizado con apoyo del CONAHCyT (Becario 638147).

Índice

Índice de figuras	V
Índice de tablas.....	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 La leche humana	2
2.1.1 Lípidos.....	3
2.1.2 Proteínas	3
2.1.3 Carbohidratos	4
2.2 Beneficios de la alimentación de lactantes con leche humana.....	5
2.2.1 Microbiota intestinal y su interacción con leche humana.....	6
2.3 Bifidobacterias	7
2.3.1 Metabolismo de carbohidratos en bifidobacterias	8
2.4 Síntesis de OLH fucosilados	11
2.4.1 Síntesis química	12
2.4.2 Síntesis mediante ingeniería metabólica de microorganismos.....	12
2.4.3 Síntesis enzimática.....	14
2.5 Modelación molecular de sistemas biológicos	19
2.5.1 Acoplamiento molecular	19
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos.....	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos particulares	23

5	Metodología.....	24
5.1	Metodologías <i>in silico</i>	24
5.1.1	Estructuras 3D y ligandos.....	24
5.1.2	Comparación de fucosidasas de la subfamilia GH29A y GH29B	25
5.1.3	Acoplamiento molecular de fucosidasas <i>TmFuc</i> , <i>AlfC</i> y <i>BiAfcB</i> con el donador de fucosilo	25
5.1.4	Validación del método de acoplamiento molecular	25
5.1.5	Estudio teórico de la síntesis de oligosacáridos fucosilados por acoplamiento molecular.....	26
5.2	Metodologías <i>in vitro</i>	27
5.2.1	Propagación de bifidobacterias.....	27
5.2.2	Preparación de suspensión de biomasa	27
5.2.3	Obtención del extracto enzimático.....	28
5.2.4	Lavado del extracto enzimático	28
5.2.5	Actividad enzimática (hidrólisis).....	28
5.2.6	Prueba de inhibición por el sustrato aceptor de fucosilo	29
5.2.7	Síntesis de OLH fucosilados.....	29
5.2.8	Cuantificación del <i>p</i> -nitrofenol liberado	29
5.2.9	Cuantificación de los fucooligosacáridos sintetizados.....	30
5.2.10	Identificación de los componentes del producto sintetizado.....	30
6	Resultados y discusión	31
6.1	Comparación de fucosidasas de las subfamilias GH29A y GH29B.....	31
6.2	Acoplamiento molecular de fucosidasas de las subfamilias GH29 con el donador de fucosilo <i>pNP-Fuc</i>	36
6.2.1	Acoplamiento molecular entre <i>TmFuc</i> y <i>pNP-Fuc</i>	36
6.2.2	Acoplamiento molecular con <i>AlfC</i> y <i>pNP-Fuc</i>	37
6.2.3	Acoplamiento molecular con <i>BiAfcB</i> y <i>pNP-Fuc</i>	38

6.3	Estudio teórico de la síntesis de oligosacáridos fucosilados por acoplamiento molecular de <i>TmFuc</i> con el donador de fucosilo (lactosa).....	42
6.3.1	Interacción entre <i>TmFuc</i> como apoenzima y lactosa	43
6.3.2	Interacción entre el complejo <i>TmFuc</i> -fucosa y lactosa.....	44
6.4	Estudio teórico de la síntesis de oligosacáridos fucosilados por acoplamiento molecular con <i>BiAfcB</i>	48
6.4.1	Interacción entre <i>BiAfcB</i> y sustratos aceptores.....	48
6.4.2	Interacción entre el complejo <i>BiAfcB</i> -fucosa y sustratos aceptores de fucosilo.....	52
6.4.3	Acoplamiento molecular de <i>BiAfcB</i> con 2'-FL y 3-FL	55
6.5	Síntesis de oligosacáridos fucosilados con extracto enzimático de <i>B. longum</i> ...	57
7.	Conclusiones	64
8.	Perspectivas	65
9.	Bibliografía.....	66
	Anexo 1. Redocking con las estructuras 3D 1ODU y 6O1A	84
	Anexo 2. Hidrofobicidad del bolsillo catalítico de <i>TmFuc</i>	86
	Anexo 3. Acoplamiento molecular de <i>TmFuc</i> como apoenzima con 2'FL y 3FL.....	87
	Anexo 4. Prueba de <i>t</i> de Student	88
	Anexo 5. Lista de productos obtenidos de la Tesis	89

Índice de figuras

Figura 1 Composición de macronutrientes de la leche humana	2
Figura 2 Estructura base de los OLH	5
Figura 3 Representación de la composición de la microbiota intestinal de infantes alimentados con leche humana y alimentados con fórmula láctea	7
Figura 4 Mecanismo de reacción de la α -L-fucosidasa de la familia GH29	16
Figura 5 Diagrama del acoplamiento molecular acumulativo	27
Figura 6. A- Alineamiento de la secuencia de <i>TmFuc</i> , <i>AlfC</i> y <i>BiAfcB</i> con el dominio conservado Alpha_L_fucos y estructura de las tres fucosidasas.	33
Figura 7 Alineamiento del sitio activo de fucosidasas de la subfamilia GH29A y GH29B .	35
Figura 8 Dockings obtenidos con <i>TmFuc</i> , <i>AlfC</i> , <i>BiAfcB</i> y <i>pNP-Fuc</i>	40
Figura 9 Docking acumulativo con lactosa y <i>TmFuc</i> en forma de apoenzima y en complejo con fucosa.	46
Figura 10 Docking acumulativo con <i>BiAfcB</i> en forma de apoenzima con lactosa y lactulosa.	50
Figura 11 Liberación de <i>p</i> -nitrofenol en la reacción de hidrólisis de <i>pNP-Fuc</i> y en la reacción de transfucosilación empleando lactosa y lactulosa como sustratos aceptores .	51
Figura 12 Docking acumulativo de lactosa y lactulosa con <i>BiAfcB</i> en complejo con fucosa	54
Figura 13 Acoplamiento molecular de <i>BiAfcB</i> con 2'-FL y 3-FL.....	56
Figura 14 Cromatograma de la reacción de transfucosilación empleando disacáridos como sustratos aceptores	59
Figura 15 Cromatograma de la reacción de transfucosilación empleando monosacáridos como sustratos aceptores	60
Figura 16 Cinética de síntesis de oligosacáridos fucosilados empleando <i>pNP-Fuc</i> como sustrato donador y diferentes sustratos aceptores.....	61

Figura 17 Producto colectado de la reacción de transfucosilación entre *p*NP-Fuc y fructosa..... 63

Índice de tablas

Tabla 1 Fucosil transferasas utilizadas en la síntesis de OLH fucosilados	14
Tabla 2 Fucosidasas de <i>L. casei</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> y <i>T. maritima</i> utilizadas en la síntesis de OLH fucosilados	17
Tabla 3. Estructuras 3D utilizadas.....	24
Tabla 4. ΔG_b y K_b obtenidas del docking entre las tres fucosidasas y pNP-Fuc	41
Tabla 5. ΔG_b y K_b de docking acumulativo con lactosa	43
Tabla 6. Fucosidasas de la familia GH29 utilizadas en la síntesis de oligosacáridos fucosilados.....	47
Tabla 7. ΔG_b y K_b de docking acumulativo con <i>BiAfcB</i> , lactosa y lactulosa	51
Tabla 8 Velocidad inicial de hidrólisis de pNP-Fuc en presencia de sustratos aceptores de fucosilo	52
Tabla 9. ΔG_b y K_b de docking acumulativo con <i>BiAfcB</i> en complejo con fucosa, lactosa y lactulosa	55
Tabla 10 ΔG_b y K_b de docking con <i>BiAfcB</i> , sustratos y productos de la síntesis de OLH fucosilados.....	57

Resumen

Algunos de los beneficios proporcionados por la leche humana a los lactantes se atribuyen a los oligosacáridos que posee. La mayor parte de estos oligosacáridos se encuentran fucosilados y cuentan principalmente con actividad prebiótica, promoviendo el crecimiento selectivo de bifidobacterias en el intestino, por lo que existe interés en producirlos para aprovechar su actividad biológica. Uno de los métodos disponibles para la obtención de oligosacáridos fucosilados es la síntesis enzimática mediante glicosil-hidrolasas como la α -L-fucosidasa. Las fucosidasas pertenecientes a la familia GH29 son las que han demostrado una mayor aptitud para realizar la reacción de transfucosilación. En el presente trabajo, se realizó un estudio *in silico* para estudiar las diferencias entre dos α -L-fucosidasas de la subfamilia GH29A pertenecientes a *Thermotoga maritima* y *Lactocaseibacillus casei*, así como una de la subfamilia GH29B perteneciente a *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, identificando diferencias en el sitio activo que se relacionan a la afinidad con el sustrato donador de fucosilo, *para*-nitrofenil fucosa. Además, se llevó a cabo una simulación de la reacción de síntesis de oligosacáridos fucosilados mediante acoplamiento molecular con la α -L-fucosidasa de *T. maritima*, encontrando sitios de unión favorables para el sustrato aceptor lactosa que se ocupan antes de que el sustrato se aproxime al sitio activo. Posteriormente se evaluó *in silico* la interacción entre la α -L-fucosidasa de *B. longum* subsp. *infantis* con los sustratos donadores 2'-fucosil lactosa y 3-fucosil lactosa, así como con lactosa y lactulosa como sustratos aceptores, verificando que teóricamente es posible realizar la reacción de transfucosilación con esta enzima. Finalmente se realizó la síntesis de oligosacáridos fucosilados *in vitro*, empleando un extracto enzimático de *B. longum*, utilizando *para*-nitrofenil fucosa como sustrato donador de fucosilo y lactosa, lactulosa, galactosa y fructosa como sustratos aceptores, obteniendo rendimientos de 0.046%, 0.16 %, 0.32% y 2.4 % respectivamente, logrando confirmar la transferencia de fucosa a fructosa mediante la hidrólisis ácida del disacárido fucosa-fructosa, obteniendo una proporción equimolar de 0.9 : 1.

Palabras clave: bifidobacteria, α -L-fucosidasa, fucooligosacáridos, transfucosilación.

Abstract

Some of the benefits provided by human milk to infants are attributed to the oligosaccharides it contains. Most of these oligosaccharides are fucosylated and mainly produce a prebiotic action, promoting the selective growth of bifidobacteria in the gastrointestinal tract, which is why there is interest in synthesizing them to take advantage of their biological activity. One of the methods available to synthesize them is enzymatic synthesis using glycosyl hydrolases such as α -L-fucosidase. The fucosidases belonging to the GH29 family are those that have shown greater ability to carry out the transfucosylation reaction. In the present work, an *in silico* study was carried out to study the differences between two α -L-fucosidases from the GH29A subfamily belonging to *Thermotoga maritima* and *Lactocaseibacillus casei*, as well as one of the GH29B subfamily belonging to *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, identifying differences in the active site that are related to the affinity with the fucosyl donor substrate, *para*-nitrophenyl fucose. Furthermore, a simulation of the synthesis reaction of fucosylated oligosaccharides was carried out by molecular docking with the α -L-fucosidase from *T. maritima*, finding favorable binding sites for the acceptor substrate lactose, that are occupied before the substrate approach the active site. Subsequently, the interaction between the α -L-fucosidase from *B. longum* subsp. *infantis* with the donor substrates 2'-fucosyl lactose and 3-fucosyl lactose were examined, as well with lactose and lactulose as acceptor substrates, verifying that it is theoretically possible to carry out the transfucosylation reaction with this enzyme. Finally, the synthesis of fucosylated oligosaccharides was carried out *in vitro*, employing an *B. longum* enzymatic extract, and using *para*-nitrophenyl fucose as a fucosyl donor substrate and lactose, lactulose, galactose and fructose as acceptor substrates, obtaining yields of 0.046%, 0.16%, 0.32% and 2.4% respectively, confirming the transfer of fucose to fructose through the acid hydrolysis of the fucose-fructose disaccharide, obtaining an equimolar proportion of 0.9: 1.

Keywords: Bifidobacteria, α -L-fucosidase, fucooligosaccharides, transfucosylation.

1. Introducción

La leche humana es considerada como el mejor alimento para los lactantes, ya que proporciona toda la energía y los nutrientes que necesitan en los primeros meses de vida, así como protección ante enfermedades gastrointestinales y otros padecimientos crónicos. La leche humana cuenta con una gran variedad de moléculas bioactivas, como anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas y oligosacáridos, que son responsables de algunos de sus beneficios (Okburan & Kızıler, 2023). En particular, los oligosacáridos de la leche humana (OLH) producen principalmente una acción prebiótica, favoreciendo selectivamente la presencia de bifidobacterias en el intestino.

De hecho, los oligosacáridos de la leche humana son el tercer componente más abundante de la leche en base seca, teniendo una mayor concentración a la de las proteínas (Okburan & Kızıler, 2023). Están formados a base de solo cinco monosacáridos: como la glucosa, N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido N-acetilneuramínico y pueden extenderse en forma lineal o ramificada para formar oligosacáridos de entre 3 y 15 unidades (Perna, Meier, *et al.*, 2023). Del total de OLH, entre el 35-50% están fucosilados, siendo el más abundante la 2'-fucosil lactosa (Okburan & Kızıler, 2023). Existe un creciente interés en sintetizar oligosacáridos de estructura idéntica a los de la leche humana para aprovechar su acción prebiótica, principalmente en fórmulas infantiles (Enam & Mansell, 2019), las cuales al estar formuladas a base de leche de vaca no cuentan con la cantidad ni la variedad de oligosacáridos presentes en la leche humana (Bode *et al.*, 2016; Cimmino *et al.*, 2023).

Los OLH se han obtenido por vía química (Agoston *et al.*, 2019), mediante la ingeniería metabólica de microorganismos (J. Meng *et al.*, 2023) y mediante síntesis enzimática. Para la síntesis enzimática de OLH se han utilizado α -L-fucosidasas de las familias GH29 y GH95, de las cuales las GH29 han demostrado ser más aptas para realizar reacciones de transfucosilación, por su mecanismo de retención y su especificidad, que son esenciales para la síntesis de estos compuestos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la síntesis de oligosacáridos fucosilados mediante una reacción de transfucosilación empleando α -L-fucosidasas microbianas en modelos *in silico* y realizar la síntesis *in vitro*, empleando un extracto enzimático de *B. longum*.

2. Antecedentes

2.1 LA LECHE HUMANA

La leche humana (LH) se considera el mejor alimento para los lactantes. Contiene macronutrientes como carbohidratos, proteínas y lípidos, además de micronutrientes como vitaminas y minerales. Es segura, inocua y además de proveer toda la energía y los nutrientes que el infante necesita en los primeros meses de vida, contiene moléculas bioactivas que lo protegen de algunas enfermedades de la infancia. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leche humana debe ser el único alimento para recién nacidos y lactantes durante los primeros 6 meses, y se sugiere que la lactancia debe continuar hasta los dos años, acompañando a los alimentos complementarios que se incorporan a la dieta del infante (*Breastfeeding*, s. f.).

La composición de la leche humana es única para cada madre, y está influenciada por muchos factores, como la dieta, la edad gestacional, el modo de nacimiento, el índice de masa corporal de la madre, el sexo y edad del lactante, etapa de lactancia, volumen y frecuencia de la lactancia, entre otros (Binder *et al.*, 2023). Sin embargo, las proporciones en los macronutrientes se conservan, siendo los carbohidratos el componente que se presenta en mayor abundancia, seguidos de los lípidos, los oligosacáridos de la leche humana (OLH) y las proteínas (Figura 1).

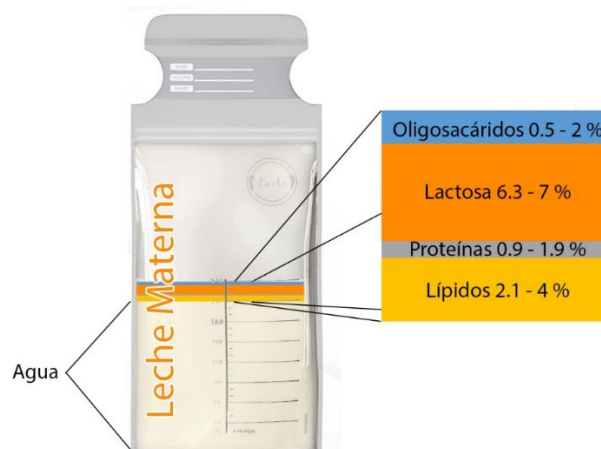


Figura 1 Composición de macronutrientes de la leche humana. (Cimmino *et al.*, 2023; Okburan & Kızıler, 2023).

2.1.1 Lípidos

Los lípidos son el macronutriente más variable de la leche humana (Xi *et al.*, 2023). Reportándose incluso variaciones a lo largo de una sola toma de lactancia, en la cual la leche que el infante consume al inicio cuenta con una concentración de lípidos dos o tres veces menor a la que consume al final de la toma. (Ballard & Morrow, 2013).

Aproximadamente el 98% de los lípidos de la leche humana están en forma de triglicéridos (Andreas *et al.*, 2015; Karbasi *et al.*, 2023), en los que se puede encontrar una gran abundancia de ácido palmítico y oleico (Ballard & Morrow, 2013). Además de ser la principal fuente de energía para los recién nacidos, participa en la síntesis de precursores de hormonas como la prostaciclina, mejorando así la función ventricular, así como de otras que regulan el desarrollo, el sistema inmune y el metabolismo (Karbasi *et al.*, 2023; Ramiro-Cortijo *et al.*, 2020). También se ha demostrado que los ácidos grasos como el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico que contiene la leche humana son un componente esencial en el desarrollo del sistema nervioso y las funciones cognitivas del infante (George *et al.*, 2021).

2.1.2 Proteínas

Las proteínas de la leche humana se dividen en proteínas del suero y fracciones de caseína o complejos, los cuales se componen de una amplia variedad de proteínas y péptidos (Ballard & Morrow, 2013). Las proteínas más abundantes son caseína, α -lactoalbúmina, lactoferrina, inmunoglobulina secretora IgA, lisozima y albúmina sérica. También cuenta con compuestos nitrogenados no proteicos como urea, ácido úrico, creatina, creatinina, aminoácidos y nucleótidos (Ballard & Morrow, 2013).

Se ha reportado que la alimentación a base de leche humana con una mayor cantidad de proteína se asocia a un mejor crecimiento y desarrollo neurológico, especialmente en infantes pretérmino (Binder *et al.*, 2023). Las proteínas de la leche humana también participan en el aumento de la biodisponibilidad de los micronutrientes y el fortalecimiento del sistema inmunológico (Karbasi *et al.*, 2023). El consumo de leche con un mayor contenido de proteína también se ha asociado como un factor de riesgo de presentar obesidad en la infancia o la adolescencia (Binder *et al.*, 2023).

2.1.3 Carbohidratos

El carbohidrato principal de la leche humana es el disacárido lactosa, siendo además el componente más abundante de la leche y el segundo más importante en cuanto al aporte de energía (Xi *et al.*, 2023). La lactosa constituye aproximadamente el 80% de los carbohidratos de la leche y el resto lo constituyen los OLH. La concentración de lactosa en la leche humana es la menos variable de los macronutrientes (Ballard & Morrow, 2013) y se mantiene relativamente estable, mientras que los OLH sí presentan cambios en su concentración a lo largo del tiempo, teniendo su máxima concentración en el calostro y disminuyendo en cantidad a medida que madura la leche (Okburan & Kızıler, 2023).

2.1.3.1 Oligosacáridos de la leche humana

Después de la lactosa y los lípidos, el tercer componente más abundante de la leche son los OLH, que representan aproximadamente el 20% de la concentración total de carbohidratos de la leche y presentándose en una cantidad mayor a la de las proteínas (Okburan & Kızıler, 2023). Los OLH están formados a base de monosacáridos como la glucosa (Glc), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), fucosa (Fuc) y ácido *N*-acetilneuramínico, también conocido como ácido siálico (Neu5Ac), contando en su mayoría con una molécula de lactosa en su extremo reductor (Urashima *et al.*, 2018) (Figura 2), la cual puede extenderse con lacto-*N*-biosa I (Gal- β 1,3GlcNAc) o lactosamina (Gal- β 1,4-GlcNAc) (Wiciński *et al.*, 2020). Estos oligosacáridos se extienden en forma lineal o ramificada para formar oligosacáridos de entre 3 y 15 unidades (Perna, Meier, *et al.*, 2023) al formar enlaces β 1-3 o β 1-6 con la lactosa, así como incorporando moléculas de fucosa a través de enlaces α 1-2,3,4 o de ácido siálico a través de enlaces α 2-3,6 (Wiciński *et al.*, 2020). Debido a las muchas posibles longitudes de los OLH, y tipos de arreglos de sustitución, existe una gran variedad de ellos y se han purificado más de 250 OLH (Urashima *et al.*, 2018), de los cuales se han caracterizado alrededor de 180 estructuras diferentes de OLH (Perna, Meier, *et al.*, 2023), siendo entre 35-50% fucosilados, 12-14% sialilados y 42-55% neutros no fucosilados (Okburan & Kızıler, 2023).

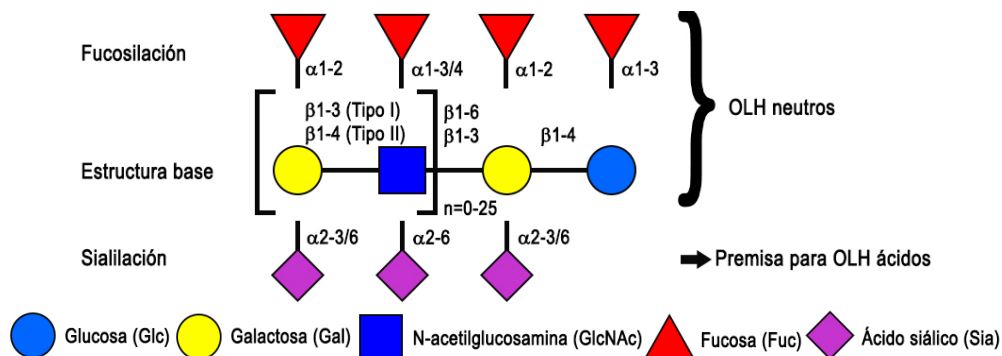


Figura 2 Estructura base de los OLH

Los OLH se sintetizan y secretan en la glándula mamaria mediante la fucosil transferasa FUT2, que transfiere unidades de fucosa en posición $\alpha 1-2$ y con la fucosil transferasa FUT3, que transfiere en posición $\alpha 1-3/4$ (Brunser Tesarschü, 2019). Cuando se secretan ambos genes se pueden sintetizar todos los oligosacáridos fucosilados, así como los antígenos de Lewis, mientras que cuando el gen FUT2 es pasivo, no se pueden sintetizar oligosacáridos $\alpha 1-2$ fucosilados como la 2'-FL y cuando el gen FUT3 está inactivo, no se pueden sintetizar oligosacáridos $\alpha 1-3,4$ fucosilados como 3-FL. Las combinaciones que se dan por la expresión de estos genes también tienen efecto sobre la cantidad de oligosacáridos fucosilados que se encuentran en la LH (Urashima *et al.*, 2022). Por otra parte, los OLH sialilados se sintetizan mediante sialil transferasas $\alpha 2-3$ o $\alpha 2-6$, formando 3'-sialil lactosa (3'-SL), 6'-sialil lactosa (6'-SL) o sialil lacto-N-tetraosa a (LST a) (Zheng *et al.*, 2022).

Cada individuo en etapa de lactancia secreta un perfil de OLH distinto que permanece relativamente constante durante este periodo (Thum *et al.*, 2021) y menos de 50 están presentes en cantidades significativas. El más abundante en la LH de la mayoría de las muestras es la 2'-fucosil lactosa (2'-FL), que es un trisacárido que consta de glucosa, galactosa y fucosa (Okburan & Kiziler, 2023). Este OLH se detectó en un 85% de las muestras de un estudio internacional realizado con 400 participantes de 10 países (Erney *et al.*, 2000), mientras que en otro estudio realizado en cohortes de 11 países diferentes, se detectó la presencia de 2'-FL en entre 65 y 98% de las muestras (McGuire *et al.*, 2017).

2.2 BENEFICIOS DE LA ALIMENTACIÓN DE LACTANTES CON LECHE HUMANA

La ingesta adecuada de macronutrientes que ofrece la leche humana, incluidas proteínas, lípidos y carbohidratos, se asocia con una menor incidencia de infecciones

gastrointestinales y afecciones crónicas a futuro, como enfermedades autoinmunes y síndrome metabólico. Debido a la calidad de las proteínas en su composición, estas son muy importantes para un buen desarrollo del infante. Además sus ácidos grasos contribuyen a un buen desarrollo del sistema nervioso central (Xi *et al.*, 2023) y sus micronutrientes y otros componentes bioactivos y sustancias inmunogénicas contribuyen no solo al crecimiento y desarrollo, sino también contribuyen a la madurez del sistema inmune (Ruiz-Ojeda *et al.*, 2023).

2.2.1 Microbiota intestinal y su interacción con leche humana

Los OLH no son digeridos por el infante, pero tienen una serie de funciones biológicas que incluyen el crecimiento selectivo de la microbiota intestinal, la inhibición de la adhesión y la invasión de patógenos potenciales en el intestino, la modulación de la función inmune del huésped y la expresión génica de las células epiteliales intestinales (Lagström *et al.*, 2020). Asimismo, cuando los oligosacáridos sialilados de la leche materna llegan al intestino de los lactantes, una o ambas unidades terminales de ácido siálico de su cadena de glucanos son liberadas por hidrólisis, pasan a la circulación y atraviesan la barrera hemato-encefálica. Este suministro de ácido siálico contribuye a satisfacer los elevados requerimientos del tejido nervioso en una etapa de rápido crecimiento y desarrollo de sus estructuras. Este tipo de compuestos son resistentes al bajo pH del estómago, a las enzimas del cepillo pancreático (Wiciński *et al.*, 2020) y se ha reportado que el 1% es absorbido por la circulación sistémica mientras que el resto es excretado en las heces y la orina (Bode, 2015) 2015). Sin embargo, una parte experimenta una compleja digestión realizada por la microbiota intestinal. Esto se ha comprobado ya que la cantidad y el perfil de los oligosacáridos de la leche humana muestran cambios irregulares respecto a los encontrados en las heces, demostrando que la microbiota intestinal los metaboliza, degrada y transforma para ser utilizados por otros microorganismos (Xi *et al.*, 2023).

Los OLH son esenciales para construir y preservar la microbiota gastrointestinal del infante. Como puede verse en la Figura 3, en un lactante alimentado exclusivamente con leche humana, las bifidobacterias son la especie dominante en la microbiota, constituyendo entre el 50 y 90% de la población. Esta concentración es atribuible a su notable capacidad para metabolizar y consumir componentes prebióticos provenientes de la leche humana (Walsh *et al.*, 2020). Es en este sentido que, favorecer el crecimiento selectivo de bifidobacterias

contribuye a la protección de los infantes contra enfermedades gastrointestinales infecciosas (Okburan & Kızıler, 2023). Sin embargo, sólo algunas especies y subespecies de bifidobacterias están equipadas con conjuntos genéticos y enzimáticos dedicados a la utilización de OLH, como *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* y *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* (Asakuma *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2021), mientras que otros microorganismos de los géneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Lactocaseibacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Veillonella* *especies pluralis* cuentan con un limitado o nulo uso de OLH (Jost *et al.*, 2015; Z.-T. Yu *et al.*, 2013).

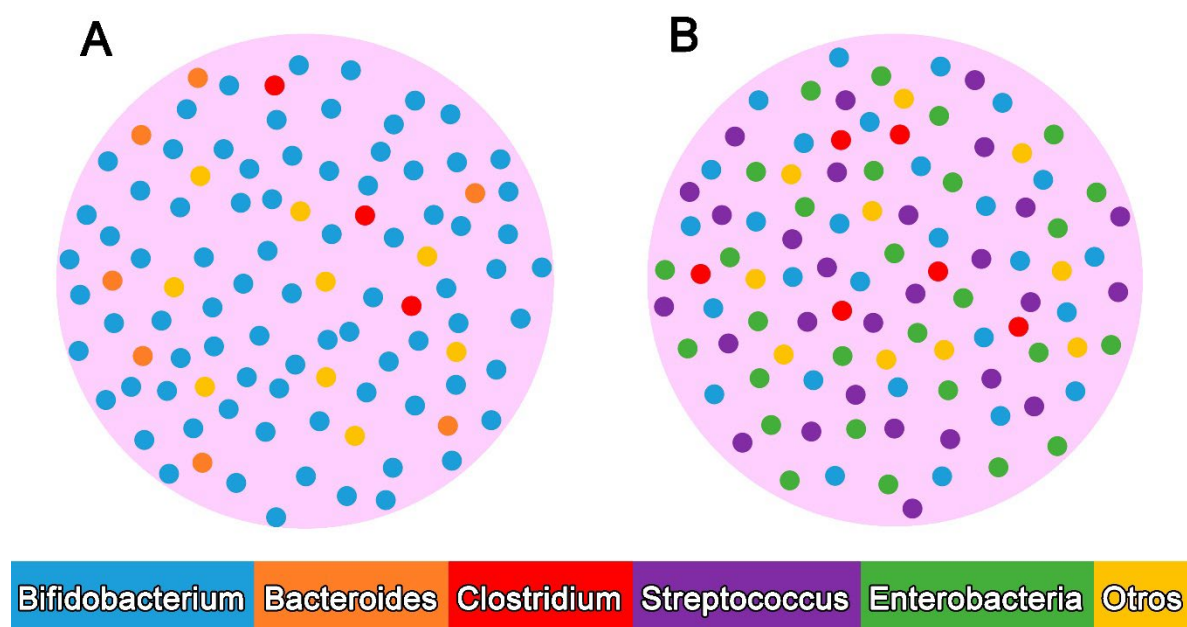


Figura 3 Representación de la composición de la microbiota intestinal de infantes alimentados con leche humana y alimentados con fórmula láctea. A: alimentados exclusivamente con leche humana; B: alimentados con fórmula láctea (Bottacini *et al.*, 2014).

2.3 BIFIDOBACTERIAS

Las bifidobacterias son habitantes típicos del intestino de mamíferos e insectos, son *Gram* positivas, anaeróbicas o facultativamente anaeróbicas ya que algunas especies toleran el O₂ solo en presencia de CO₂). Presentan pruebas negativas para lo siguiente: indol, hidrólisis de gelatina, catalasa (excepto *B. indicum* y *B. asteroides* cuando crecen en presencia de aire) y oxidasa (Biavati & Mattarelli, 2006). Pertenecen a la familia

Bifidobacteriaceae, orden *Bifidobacteriales* y filo *Actinobacteria*, siendo esta última una de las unidades taxonómicas más grandes y pobladas del reino *Eubacteria* (Tsakalidou & Papadimitriou, 2011).

Esta familia consta de varillas pleomórficas que se presentan individualmente o concatenadas en grupos de muchas células. Las células no tienen cápsula, no forman esporas, no son móviles y no son filamentosas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35–39 °C y su pH óptimo al comienzo del crecimiento se sitúa entre 6.5 y 7.0. No registran crecimiento a pH inferior a 4.5 o superior a 8.5 con la excepción de *B. thermacidophilum*, que puede crecer a pH 4.0.

Poseen fructosa-6-fosfoetolasa (EC 4.1.2.2), que hidroliza la fructosa-6-fosfato en acetil fosfato y eritrosa-4-fosfato. Son quimioorganótrofas y tienen un tipo de metabolismo fermentativo, producen ácido láctico, pero no gas a partir de una variedad de carbohidratos.

No son patógenas, excepto las bifidobacterias aisladas de la caries dental (y probablemente involucradas en la patología de la caries) (Biavati & Mattarelli, 2006). Algunas especies de bifidobacterias se encuentran exclusivamente en la microbiota intestinal del adulto humano, como *Bifidobacterium pseudolongum* y *Bifidobacterium bifidum*; o de los neonatos, como *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. Otras se distribuyen más ampliamente independientemente de la edad del huésped, como *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium adolescentis* (Turróni *et al.*, 2009). Entre estas especies destaca *B. longum*, porque puede encontrarse en el intestino de humanos de todas las edades, desde bebés hasta ancianos. Esto se debe en gran medida a sus enzimas dedicadas al metabolismo de carbohidratos, las cuales les permite prosperar a lo largo de la vida humana, aprovechando tanto los OLH presentes en la LH como otros glucanos que contienen arabinosa o xilosa, provenientes de otros alimentos (Singh, 2019).

2.3.1 Metabolismo de carbohidratos en bifidobacterias

Los OLH no son metabolizados por el ser humano, así que al llegar al intestino una parte de ellos pueden hidrolizarse y pasar a la circulación sistémica, y en su mayoría actúan como compuestos prebióticos para microorganismos como las bifidobacterias y los lactobacilos, que cuentan con la capacidad metabólica para degradarlos (Ventura *et al.*, 2007). Se han encontrado lactobacilos en el duodeno (Vaughan *et al.*, 2005), donde fermentan mono, di

y trisacáridos relativamente simples, mientras que en las partes inferiores del tracto gastrointestinal, se pueden encontrar a las bifidobacterias, las cuales cuentan con la capacidad de metabolizar carbohidratos complejos (Ventura *et al.*, 2007). Es así que las bifidobacterias reflejan el alto nivel de adaptación al intestino que presentan por la gran cantidad de enzimas dedicadas al metabolismo de carbohidratos que poseen. De hecho se ha reportado que más del 14% de los genomas bifidobacterianos están involucrados en el metabolismo de carbohidratos (Arboleya *et al.*, 2018; Singh, 2019). Este valor es 30% superior al de otros microorganismos que también pueden encontrarse en el tracto gastrointestinal, como *E. coli*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis* (Ventura *et al.*, 2007).

Entre la gran variedad de genes encontrados en bifidobacterias que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, se tienen glicosil-hidrolasas (GH), permeasas, transportadores de tipo ABC y PEP-PTS (PEP: fosfoenolpiruvato; PTS: sistema de fosfotransferasa), transportadores que representan aproximadamente la mitad de los genes dedicados a la absorción de carbohidratos (Pokusaeva *et al.*, 2011). Dentro del arsenal enzimático responsable del metabolismo de carbohidratos en bifidobacterias, las GH son las enzimas más importantes y son responsables de la hidrólisis de los carbohidratos complejos. Estas enzimas realizan su acción catalítica sobre los enlaces glucosídicos en oligo y polisacáridos, para liberar productos metabolizables de menor tamaño (Blanco *et al.*, 2020) y monosacáridos que participan como intermedios de la vía de fermentación de hexosa, también llamada derivación de fructosa-6-fosfato o derivación 'bífida', donde se generan 2 y 3 moléculas de lactato y acetato a partir de 2 moléculas de glucosa respectivamente, con la producción de 5 moléculas de ATP (Singh, 2019). Además se producen ácidos grasos de cadena corta y otros compuestos orgánicos, algunos de los cuales pueden ser beneficiosos para el infante y para otros microorganismos mediante el mutualismo (Pokusaeva *et al.*, 2011).

En un análisis comparativo realizado por Blanco *et al.* (2020) sobre la presencia de GH en cepas de *B. longum* subsp. *infantis* y *B. longum* subsp. *longum*, encontraron 46 GH diferentes, de las cuales 38 se encontraron en ambas subespecies. De igual manera. Arboleya *et al.* (2018) reportó que algunas enzimas como la α -galactosidasa de la familia GH36 y β -galactosidasa de la familia GH42 se encontraron en las 20 cepas de *B. longum* que estudiaron. Estos autores determinaron que se trata de enzimas constitutivas, mientras

que enzimas como la α -L-fucosidasa de la familia GH95 se encontraron en 4 de las 20 cepas. Algunas de las GH asociadas con la subespecie *infantis* de *B. longum* incluyen sialidasas, fucosidasas y N-acetil-galactosaminidasas, todas ellas involucradas en la degradación de HMO complejos (Blanco *et al.*, 2020).

2.3.1.1 Fucosidasas

La gran influencia de los compuestos fucosilados presentes en la leche materna consiste en actuar como prebióticos altamente selectivos para conformar la microbiota intestinal, siendo las α -L-fucosidasas herramientas indispensables que les permiten metabolizar los OLH (Curiel *et al.*, 2021). Las α -L-fucosidasas son GH que pueden hidrolizar el resto terminal del α -L-fucosilo de diferentes tipos de oligosacáridos y glicoconjugados. De acuerdo a la clasificación CAZy, pertenecen a las familias GH29, GH95, GH139, GH141 y GH151 (Koval'ová *et al.*, 2022), que difieren entre sí en su estructura y el mecanismo utilizado para la catálisis de la reacción hidrolítica.

Las fucosidasas de la familia GH29 catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de la fucosa mediante un mecanismo de retención de doble desplazamiento de dos pasos y actúan sobre enlaces Fuc- α 1,2/3/4/6. Generalmente se dividen en dos subfamilias, GH29A y GH29B. La subfamilia A contiene α -fucosidasas con especificidades de sustrato hacia enlaces Fuc- α 1,2/4/6 y son capaces de hidrolizar *p*-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (*p*NP-Fuc), mientras que los miembros de la subfamilia B cuentan con más especificidad hacia enlaces Fuc- α 1,3/4 y cuentan con una menor capacidad de hidrolizar *p*NP-Fuc (Curiel *et al.*, 2021; Sakurama *et al.*, 2012).

Por su parte, las fucosidasas GH95 catalizan la hidrólisis de fucosa a través de un mecanismo de desplazamiento directo (Benešová *et al.*, 2015), lo que resulta en la inversión de la configuración anomérica. Estas fucosidasas cuentan con una especificidad hacia enlaces Fuc- α 1,2 (Curiel *et al.*, 2021). La GH139 está clasificada como una α -2-O-Me-L-fucosidasa de la cual se desconoce su mecanismo catalítico (Koval'ová *et al.*, 2022; Ndeh *et al.*, 2017). En el caso de la GH141, se reportó una α -L-fucosidasa de *Clostridium thermocellum* (Ndeh *et al.*, 2017), así como también una endoxilanasas de *Bacteroides thetaiotaomicron* (Heinze *et al.*, 2017), de las cuales se desconoce el mecanismo de reacción. Respecto a las fucosidasas GH151, se ha reportado que una fucosidasa de *Paenibacillus thiaminolyticus* cuenta con actividad sobre disacáridos fucosilados y *p*NP-

fucosa, además es capaz de realizar la reacción de transfucosilación reteniendo la configuración anomérica en el hemiacetal liberado, utilizando como sustrato donador el *p*NP-Fuc y como aceptores *p*NP-glicopiranosidos, alcoholes, y monosacáridos como glucosa, galactosa, manosa y maltosa (Benešová *et al.*, 2015; Koval'ová *et al.*, 2022).

2.4 SÍNTESIS DE OLH FUCOSILADOS

Aunque la OMS recomienda la alimentación exclusiva con LH durante los primeros 6 meses de edad y que sea complemento de la dieta hasta los 2 años (*Breastfeeding*, s. f.), no siempre es posible proporcionarla al infante y debe sustituirse parcialmente o complementarse con fórmulas infantiles. Este tipo de sucedáneo de leche intenta imitar la composición nutricional de la LH, y al ser comúnmente formulada a base de leche bovina, cuenta con una menor cantidad y variedad de OLH, (Bode *et al.*, 2016; Cimmino *et al.*, 2023). En el caso de fórmulas a base de hidrolizados de soya, carecen, entre otros nutrientes, de OLH (Perna, Meier, *et al.*, 2023). Por los beneficios que aportan y su baja disponibilidad en las fórmulas lácteas, la síntesis de oligosacáridos de estructura idéntica a los OLH se ha convertido en un campo de estudio de gran interés (Enam & Mansell, 2019).

Actualmente se cuenta con producción industrial de algunos OLH como la 2'-FL y lacto-*N*-neotetraosa (LNnT) (Cheng *et al.*, 2021) producidos con microorganismos recombinantes o mediante síntesis química (Perna, Meier, *et al.*, 2023). Además de contar con disposición a nivel industrial, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha avalado a la 2'-FL, lacto-*N*-fucopentaosa I, LNnT- y 3'-sialil lactosa (3'-SL) como Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS) (aviso GRAS n.º 659, 766, 859, 1035). Mientras tanto la Unión Europea (UE) considera a la 2'-FL y LNnT, como alimentos autorizados que pueden usarse en fórmulas infantiles (Reglamento implementado por la Regulación (EU) 2017/2470). En estas regulaciones se detalla el método de síntesis del OLH, así como el método de purificación, y cuando se utiliza un microorganismo recombinante, se indican las modificaciones que se le realizaron y detalles sobre la cepa para descartar su patogenicidad y garantizar la inocuidad del producto. Gracias a la existencia de regulaciones y disponibilidad de OLH, en la actualidad ya se encuentran disponibles fórmulas lácteas que contienen 2'-FL y LNnT en el mercado. Es por ello que se han realizado esfuerzos de investigación para implementar diferentes métodos de síntesis de OLH, los cuales se revisarán a continuación.

2.4.1 Síntesis química

La síntesis química es uno de los métodos de síntesis de OLH fucosilados más reportados. Mediante este método de síntesis, generalmente se emplean procesos que necesitan múltiples pasos de protección y desprotección de los hidroxilos en los reactivos para guiar el procedimiento hacia la síntesis de los intermediarios adecuados, además de múltiples pasos de purificación de estos compuestos mediante cromatografía, así como el uso de reactivos costosos y tóxicos. Todo ello limita la escalabilidad de los procesos para la obtención de OLH (Zhu *et al.*, 2022). Recientemente Agoston *et al.* (2019) desarrollaron un método para sintetizar 2'-FL a escala de kilogramos utilizando 10 kg de donador de fucosilo y 1 kg de aceptor, reduciendo de 8 a 1 las etapas de purificación mediante cromatografía y obteniendo un producto sólido de alta pureza. Este procedimiento podría sentar las bases de la producción industrial de 2'-FL, que pudiera funcionar como precursor de otros OLH más complejos. Sin embargo, por esta última razón el nivel de complejidad estructural aumenta. Es por ello que la síntesis química de carbohidratos complejos no es un método de producción rentable para la síntesis a gran escala de OLH. Aun así, la síntesis química es una herramienta importante para fines analíticos. Es a través de ella que se generan sustratos que posteriormente son utilizados en procesos de síntesis enzimática. Esta combinación de métodos se le ha llamado síntesis quimioenzimática de OLH (Zeuner *et al.*, 2019).

2.4.2 Síntesis mediante ingeniería metabólica de microorganismos

La síntesis mediante ingeniería metabólica de microorganismos consiste en mejorar y dotar de enzimas necesarias a microorganismos recombinantes para construir una ruta metabólica para la síntesis de ciertos compuestos, como podrían ser los OLH. En este sentido, el objetivo principal es dotar al microorganismo de tres factores principales: un suministro efectivo de aceptores, la disponibilidad de nucleótidos donadores de carbohidratos como la guanósín difosfato-L-fucosa (GDP-Fuc) que actúan como intermediarios y la expresión funcional de glicosiltransferasas (GT) (Zhu *et al.*, 2022), que son enzimas que catalizan la formación de enlaces glucosídicos a través de la transferencia de la fracción de carbohidrato de un donante activado a un aceptor. Por lo anterior, es necesario regenerar cofactores y cosustratos como NADPH, GTP y UTP para mantener el suministro de precursores y maximizar la síntesis de producto. En el metabolismo de

diferentes organismos, este compuesto es un donador de fucosilo en varias reacciones de fucosilación. Es por ello que reforzando la expresión de genes involucrados en la síntesis de GDP-Fuc, introduciendo genes para la expresión de una GT como la α 1,2-fucosiltransferasa y suministrando lactosa como sustrato aceptor, el microorganismo recombinante podría adquirir la capacidad de sintetizar 2'-FL (J. Meng *et al.*, 2023). Adicionalmente, se pueden incorporar transportadores específicos para los productos, con la finalidad de exportarlos al exterior de la célula y facilitar su purificación (Zhu *et al.*, 2022).

El huésped más común para la producción de 2'-FL son cepas modificadas de *E. coli* debido a que contiene el grupo de genes endógenos de síntesis de GDP-Fuc de la vía *de novo* (Zhu *et al.*, 2022). Sin embargo, se han utilizado otros microorganismos para los estudios de producción de 2'-FL, tal como *Saccharomyces cerevisiae* (S. Yu *et al.*, 2018). Hollands *et al.* (2019) demostró que se podía sintetizar 2'-FL a partir de la vía de síntesis *de novo* de GDP-manosa a GDP-Fuc con *S. cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*. Este estudio se realizó utilizando ingeniería metabólica para sobre expresar el gen relacionado con la síntesis de GDP-Fuc por la vía "*salvage*" (o de salvamento), mediante la cual se puede sintetizar este compuesto a partir de intermediarios en su vía de degradación o de una similar, e incorporando los genes LAC12 de *Kluyveromyces lactis* y una fucosil transferasa. Otro microorganismo con el que se ha conseguido la síntesis de 2'-FL y 3'-FL es *Bacillus subtilis*. A este microorganismo se le han introduciendo los genes de la vía de *salvage* de síntesis de GDP-Fuc, sobre expresando transportadores de carbohidratos como la permeasa de lactosa LAC12 y desactivando genes de la ruta metabólica (Deng *et al.*, 2019).

Destacadamente, mediante el uso de microorganismos recombinantes en la síntesis de OLH, se ha conseguido la síntesis a nivel industrial de 2'-FL, LNFP-I y LNnT, los cuales han sido registrados como seguros por la FDA y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Estos compuestos obtenidos ya se encuentran disponibles en fórmulas infantiles en más de 30 países. Sin embargo, se han enfrentado dificultades para la síntesis de OLH más complejos ya que se requieren de más de una glicosil transferasa (GT) para sintetizar moléculas más ramificadas. Además, hay dificultades en el transporte lo que dificulta tanto la concentración del producto al interior de la célula como su purificación (Zeuner *et al.*, 2019).

2.4.3 Síntesis enzimática

Para la síntesis enzimática de OLH se han utilizado GT y GH. Las GT catalizan la formación de enlaces glucosídicos a través de la transferencia de la fracción de carbohidrato de un donante activado a un aceptor. Particularmente, la obtención de OLH fucosilados se ha realizado con fucosil transferasas (FT), que forman enlaces glicosídicos α -1,2, α -1,3 o α -1,4, provenientes de *E. coli*, *Thermosynechococcus elongatus*, *Helicobacter pylori* y *Bacteroides fragilis* (Zheng *et al.*, 2022) (Tabla 1). En la síntesis de OLH fucosilados se ha utilizado GDP-Fuc como sustrato donador de fucosilo, que es un nucleótido fucosilado activado, de baja disponibilidad y alto costo, por lo que para la obtención de este donador también se estudian métodos enzimáticos, químicos y quimioenzimáticos (Qiao *et al.*, 2021).

Tabla 1 Fucosil transferasas utilizadas en la síntesis de OLH fucosilados

FT	Microorganismo de origen	Enlaces	Donador	Aceptor	Producto	Rendimiento (%)	Ref.
Te2FT	<i>T. elongatus</i>	α -1,2	GDP-Fuc	LNT	LNFP I	95	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
TeFucT	<i>T. elongatus</i>	α -1,2	GDP-Fuc	Lactosa	2'-FL	95	(Li <i>et al.</i> , 2020)
HpFucT	<i>H. pylori</i>	α -1,2	GDP-Fuc	Lactosa	2'-FL	91.3	
FucTIII	<i>H. pylori</i>	α -1,3	GDP-Fuc	LNT	LNFP V	70	(Tsai <i>et al.</i> , 2019)
		α -1,4	GDP-Fuc	LNFP V	LNDFH II	53	
		α -1,3	GDP-Fuc	LNnT	LNFP VI	70	
Bf13FT	<i>B. fragilis</i>	α -1,3	GDP-Fuc	ρ LNnH	DF- ρ LNnH	81	(Huang <i>et al.</i> , 2021)
		α -1,3	GDP-Fuc	ρ LNH	TF- ρ LNH II	87	
Wbgl	<i>E. coli</i>	α -1,2	GDP-Fuc	Lactosa	2'-FL	44	(Engels & Elling, 2014)

Modificado de (Zheng *et al.*, 2022)

Por otra parte, las GH también han sido utilizadas para realizar la síntesis de OLH. A pesar de que estas enzimas catalizan la hidrólisis de carbohidratos en oligosacáridos y otras moléculas glicosiladas, si se controlan las condiciones de reacción se pueden realizar la síntesis de oligosacáridos mediante una reacción de transglicosilación. Las GH utilizadas en la síntesis de OLH fucosilados son las α -L-fucosidasas, en particular las de las familias GH29 y GH95. Las GH29 han demostrado ser las más aptas para realizar la reacción de transfucosilación en comparación con las GH95, porque cuentan con una especificidad más amplia y por su mecanismo de retención de la configuración anomérica.

El mecanismo de reacción de las fucosidasas de la familia GH29 puede verse en la Figura 4. La reacción consiste en un mecanismo de retención de Koshland para hidrólisis de glicósidos llevada a cabo por un ácido aspártico (ASP), el cual es el residuo nucleofílico, y un ácido-base general, que normalmente es un ácido glutámico (GLU), aunque esta función también puede ser realizada por otro ASP. En una primera etapa hay un intercambio de electrones entre los residuos catalíticos y el donador de fucosilo mediante el cual el aspartato consigue la carga adecuada para realizar un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico de la fucosa. Mediante esta acción se consigue la hidrólisis del enlace glucosídico entre el Carbono 1 (C1) y el oxígeno glicosídico, liberando el aglicón del donador de fucosilo y formando el complejo enzima-sustrato entre el ASP y la fucosa. Posteriormente, en una segunda etapa el aceptor de fucosilo es desprotonado por el ácido-base general. Este aceptor desprotonado se queda activado para realizar el ataque nucleofílico sobre el complejo enzima/sustrato [ES], transfiriendo la fucosa al sustrato aceptor y restaurando la carga del residuo que actúa como nucleófilo. Cuando una molécula de agua hace el ataque nucleofílico sobre el complejo enzima-sustrato se realiza una reacción de hidrólisis obteniendo una molécula de fucosa libre. Por el contrario, cuando este ataque nucleofílico lo realiza otra molécula como la lactosa se realiza una reacción de síntesis en la que se produce un oligosacárido nuevo, el cual también es susceptible de ser hidrolizado por la enzima (Davies & Henrissat, 1995; McCarter & Stephen Withers, 1994; Zeuner *et al.*, 2014).

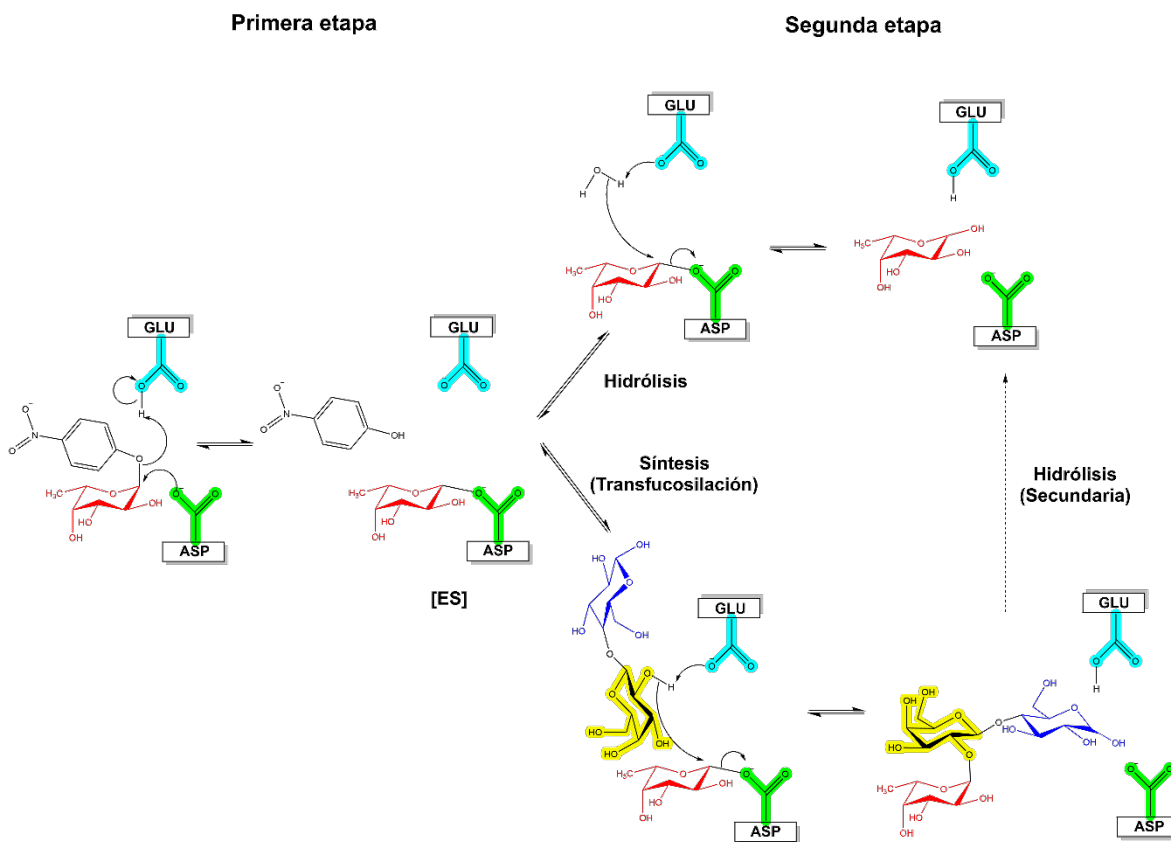


Figura 4 Mecanismo de reacción de la α -L-fucosidasa de la familia GH29. La fucosa se representa en color rojo, la glucosa en color azul y la galactosa en color amarillo.

La síntesis de OLH fucosilados se ha llevado a cabo con fucosidasas de bacterias lácticas tales como *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum*. De igual modo se han utilizado fucosidasas de *Thermotoga maritima* la cual es una bacteria de origen marino (Tabla 2).

Rodríguez Díaz *et al.* (2013) utilizaron las fucosidasas AlfB y AlfC de *L. casei* para sintetizar fucosil α -1,3-*N*-acetilglucosamina y fucosil α -1,6-*N*-acetilglucosamina a partir de *p*NP-Fuc y GlcNac, aprovechando las diferentes especificidades de ambas fucosidasas. Respecto al uso de fucosidasas de bifidobacterias, se ha realizado la síntesis de OLH fucosilados con *BiAfcB*, que es una de las cinco fucosidasas encontradas en *B. longum* subsp. *infantis* y que corresponde al gen *Blon_2336* (Sela *et al.*, 2012). Con ello se han sintetizado LNFP-II a partir de 3-FL y LNT, con la enzima salvaje y mutantes derivadas de esta con el propósito de mejorar el rendimiento de la síntesis de oligosacáridos fucosilados (Saumonneau *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha utilizado un enfoque similar con la fucosidasa *BbAfcB* de *B.*

bifidum, con la que se sintetizaron OLH fucosilados con la enzima nativa (Zeuner, Muschiol, *et al.*, 2018; Zeuner, Vuillemin, *et al.*, 2018), y con mutantes. Además, el mecanismo involucró el reemplazo de la 3-FL como sustrato donador de fucosilo por Fluoruro de fucosilo (FucF) (Sakurama *et al.*, 2012; Sugiyama *et al.*, 2016, 2017; Wada *et al.*, 2008). En el caso del uso de *T. maritima* la síntesis de OLH fucosilados se ha enfocado en la síntesis de 2'-FL a partir de *pNP-Fuc* y lactosa, tanto con enzimas nativas como con mutantes (Lezyk *et al.*, 2016a; Zeuner, Muschiol, *et al.*, 2018). Además se consiguió incrementar el rendimiento de transfucosilación empleando diferentes proporciones de sustrato donador y aceptor (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018a, 2018b), así como reduciendo la actividad de agua (Robles-Arias *et al.*, 2021).

Tabla 2 Fucosidasas de *L. casei*, *B. longum*, *B. bifidum* y *T. maritima* utilizadas en la síntesis de OLH fucosilados.

Microorganismo de origen	Enzima	Donador	Aceptor	Producto	Rendimiento (%)	Ref.
<i>L. casei</i>	AlfB	<i>pNP-Fuc</i>	GlcNac	Fucosil α -1,3- <i>N</i> -acetilglucosamina	23 ¹	(Rodríguez-Díaz <i>et al.</i> , 2013)
	AlfC	<i>pNP-Fuc</i>	GlcNac	Fucosil α -1,6- <i>N</i> -acetilglucosamina	56 ¹	
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	<i>BiAfcB</i> WT	3-FL	LNT	LNFP-II	6 ²	(Saumonneau <i>et al.</i> , 2016)
	L321P	3-FL	LNT	LNFP-II	8 ²	
	L321P/F34H	3-FL	LNT	LNFP-II	7 ²	
	L321P/F34Y	3-FL	LNT	LNFP-II	9 ²	
	L321P/F34I	3-FL	LNT	LNFP-II	17 ²	
	L321P/F34I	3-FL	LNnT	LNFP-III	21 ²	
	L321P/F34I	3-FL	LNFP-I	LNDFH-I	11 ²	
	L321P/F34I	3-FL	2'-FL	LDFT	17 ²	
	<i>BiAfcB</i> mutante	3-FL	LNT	LNFP-II	41 ¹	(Champion <i>et al.</i> , 2016)
<i>BiAfcB</i> mutante	3-FL	LNnT	LNFP-III	49 ¹		
<i>B. bifidum</i>	<i>BbAfcA</i>	Fucosil	Lactosa	2'-FL	6 ¹	(Wada <i>et al.</i> , 2008)
	D766G	fluoruro (FucF)				
		FucF	Lactosa	2'-FL	88 ³	(Sugiyama <i>et al.</i> , 2016)
	FucF	LNT	LNFP-I	75 ³	(Sugiyama <i>et al.</i> , 2017)	

	<i>BbAfcB</i>	3-FL	LNT	LNFP-II	13 ¹	(Zeuner, Muschiol, <i>et al.</i> , 2018)
	<i>BbAfcB</i>	3-FL	LNnT	LNFP-III	1.4 ¹	
	<i>BbAfcB</i>	FucF	Lactosa	3-FL	13 ¹	(Sakurama <i>et al.</i> , 2012)
	D703S					
	<i>BbAfcB</i>	FucF	2'-FL	LDFT	5.5 ¹	
	D703S					
	<i>BbAfcB</i>	FucF	LNT	LNFP-II	41 ¹	
	D703S					
	<i>BbAfcB</i>	3-FL	LNT	LNFP-II	14 ¹	(Zeuner, Vuillemin, <i>et al.</i> , 2018)
	<i>BbAfcB</i>	3-FL	LNnT	LNFP-III	3 ¹	
	<i>BbAfcB_{mut}</i>	3-FL	LNT	LNFP-II	39 ¹	
	<i>BbAfcB_{mut}</i>	3-FL	LNnT	LNFP-III	11 ¹	
<i>T. maritima</i>	<i>TmaFuc</i>	2'-FL	LNT	LNFP-I	10 ¹	(Zeuner, Muschiol, <i>et al.</i> , 2018)
	Thma	pNP-Fuc	Lactosa	2'-FL	6.4 ¹	(Lezyk <i>et al.</i> , 2016a)
	Mfuc5	pNP-Fuc	Lactosa	Fucosil lactosa	3.6 ¹	
	Mfuc6	pNP-Fuc	Lactosa	Difucosil- pNP	34 ¹	
	Mfuc5	Xiloglucano de cítricos	Lactosa	Fucosil lactosa	3.9 ¹	
	α-l-fucosidasa	pNP-Fuc	Lactosa	Fucosil lactosa	12.5 ¹	(Guzmán-Rodríguez <i>et al.</i> , 2018a)
	α-l-fucosidasa	pNP-Fuc	Lactosa	Fucosil lactosa	32.5 ¹	(Guzmán-Rodríguez <i>et al.</i> , 2018b)
	α-l-fucosidasa	pNP-Fuc	Lactosa	Fucosil lactosa	40.67 ¹	(Robles-Arias <i>et al.</i> , 2021)

¹ Rendimiento respecto a la concentración del donador, ² Rendimiento respecto a la concentración del aceptor,

³ Rendimiento respecto a la depletación del donador.

Aunque el uso de fucosidasas para la síntesis de OLH fucosilados todavía se encuentra en desarrollo, estas enzimas ofrecen la ventaja de tolerar ampliamente las modificaciones del donador y el aceptor, con la desventaja de que el producto también es propenso a sufrir hidrólisis. Esto abre la posibilidad al uso de sustratos obtenidos a partir de xiloglucano de cítricos (Biel-Nielsen *et al.*, 2022) o fucoidan de algas (Lee *et al.*, 2019), más accesibles que los necesarios para el uso de fucosil transferasas (Mészáros *et al.*, 2021). De las fucosidasas de la Tabla 2, se seleccionaron para este trabajo *AlfC* y *BiAfcB* porque

proviene de microorganismos con los que se han realizado trabajos previos en el grupo de investigación, así como con *TmFuc* (denominadas como *TmaFuc* y *Thma*), con la cual también se ha trabajado previamente en este grupo.

2.5 MODELACIÓN MOLECULAR DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Las interacciones de las enzimas con otras moléculas gobiernan varios procesos celulares. Las enzimas han sido estudiadas para comprender su mecanismo de reacción, identificar los sitios de unión y los aminoácidos involucrados en la actividad catalítica, así como la afinidad de unión de los complejos enzima-sustrato. Sin embargo, la disponibilidad de datos para complejos entre enzimas y carbohidratos es relativamente limitada, en comparación con los complejos proteína-proteína y proteína-ácido nucleico (Gromiha *et al.*, 2019). Para reducir tiempo, costos y factores de riesgo en el manejo de algunas sustancias para el estudio de interacciones entre moléculas, actualmente se utiliza ampliamente el diseño asistido por computadora. En este método, se usa un procedimiento basado en programas computacionales para establecer una relación entre estructura y actividad.

En este sentido, se pueden aplicar dos tipos de aproximaciones en el diseño asistido por computadora, la directa y la indirecta (Surabhi & Singh, 2018). En la aproximación directa la estructura de la proteína objetivo se conoce y se utiliza el acoplamiento molecular para estimar la afinidad de esta proteína con diferentes moléculas (ligandos). En el caso de la aproximación indirecta, aunque la estructura objetivo se desconoce, sí se conocen moléculas que interaccionan con la proteína objetivo y a partir de esta información se construye un modelo con las características estructurales para que se dé una interacción entre la proteína objetivo y los ligandos.

2.5.1 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (docking) es un método *in silico* que consiste en simular la conformación óptima entre pequeñas moléculas (ligandos) y una proteína objetivo (receptor) (Fan *et al.*, 2019) mediante la estimación de los modos de unión más favorables y las afinidades de los ligandos con su receptor (Surabhi & Singh, 2018). En este método se acopla un ligando en un sitio de unión combinando y se optimizan variables como la complementariedad estérica, hidrófoba y electrostática (Sethi *et al.*, 2020) con la finalidad

de encontrar la interacción con menor energía, lo que permite estudiar de manera rápida la afinidad de complejos enzima-sustrato.

Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular, se requiere de la estructura tridimensional de una enzima obtenida mediante cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o una estructura modelada por homología con un sitio de unión conocido (Sethi *et al.*, 2020). Posteriormente se necesita al menos un algoritmo de búsqueda y un método computacional para asignarle una puntuación a la afinidad de unión del ligando en el complejo con una estructura de proteína (Bitencourt-Ferreira & de Azevedo, 2019; Ferreira *et al.*, 2015) para crear y analizar estos complejos (Surabhi & Singh, 2018).

2.5.1.1 Algoritmos de búsqueda

El algoritmo de búsqueda realiza la exploración de las diferentes localizaciones y conformaciones que puede tomar el ligando con la estructura rígida en un sitio de búsqueda tridimensional. Los algoritmos de búsqueda modifican los parámetros estructurales de los ligandos, tales como los grados de libertad torsional, que son la cantidad de enlaces rotables que posee la molécula, así como su movimiento traslacional y rotacional en un espacio de búsqueda tridimensional para realizar la búsqueda de la conformación de mayor afinidad. Los algoritmos realizan esta tarea aplicando métodos de búsqueda sistemáticos y estocásticos (Ferreira *et al.*, 2015). En los métodos sistemáticos se realizan ligeras variaciones en los parámetros estructurales cambiando gradualmente la conformación de los ligandos hasta converger en la solución que ofrece la energía mínima después de una serie de ciclos iterativos de búsqueda y evaluación. Por otro lado, en los métodos estocásticos se establecen condiciones iniciales aleatorias a partir de las cuales se modifican los parámetros estructurales para encontrar la solución de menor energía. El software para realizar acoplamiento molecular emplea ambos métodos. Por ejemplo, programas como FRED, Surflex y DOCK aplican un algoritmo en el cual el ligando se descompone en fragmentos. El fragmento que muestra interacciones máximas con el receptor se ancla y posteriormente cada uno de los fragmentos se van agregando paso a paso. De esta manera el ligando se reconstruye con un método sistemático basado en las configuraciones de menor energía y continuando el proceso hasta la reconstrucción total del ligando. La complejidad de este método incrementa a medida que aumenta el número de enlaces rotables con los que cuenta el ligando.

Por otra parte, software como AutoDock y Gold emplean algoritmos genéticos que se basan en métodos estocásticos. El algoritmo genético aplica conceptos de la teoría de la evolución y la selección natural, codificando todos los parámetros estructurales de la estructura inicial en un cromosoma. A partir de este cromosoma, el algoritmo de búsqueda aleatoria genera una población inicial de cromosomas que son evaluados para conservar a los más aptos, es decir los cromosomas con interacciones de menor energía. A estos cromosomas se les generan modificaciones para obtener una población nueva (Sethi *et al.*, 2020). Este procedimiento disminuye la energía promedio del conjunto cromosómico al transmitir las características estructurales favorables de una población la siguiente generación. Este proceso se ejecuta repetidamente y después de ciclos de búsqueda y evaluación, converge en una conformación correspondiente al mínimo de energía global (Ferreira *et al.*, 2015).

2.5.1.2 Funciones de puntuación

Una vez que se cuenta con un algoritmo de búsqueda para estimar la energía de unión de los complejos ligando-receptor predichos, los valores se expresan como constante de unión (K_b), energía libre de unión (ΔG_b), el logaritmo de la constante de inhibición o el logaritmo de la constante de disociación, entre otras (Bitencourt-Ferreira & de Azevedo, 2019). Como es necesario un sistema para clasificarlos, se han desarrollado una serie de funciones de puntuación que se pueden clasificar en tres categorías principales: basadas en el campo de fuerza, empíricas y basada en el conocimiento.

Las funciones de puntuación basadas en el campo de fuerza estiman la energía de unión sumando las contribuciones de las fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, longitudes de enlace, ángulos de enlace y torsiones derivadas de datos experimentales y de cálculos “*ab initio*”, utilizando ecuaciones basadas en la mecánica clásica. Esta función de puntuación cuenta con la limitación de no poder estimar con precisión las contribuciones entrópicas y las energías de desolvatación, al no considerar por completo al solvente.

La base de la función de puntuación empírica se basa en que las energías de enlace de un complejo se pueden aproximar mediante una suma de términos individuales no correlacionados en la formación del complejo ligando-receptor. Estos incluyen enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas y apolares, así como efectos de desolvatación y entrópicos. Los coeficientes de los diversos términos implicados en el cálculo de la energía de enlace se obtienen a partir del análisis de regresión, utilizando energías de enlace

determinadas experimental o potencialmente a partir de información de las estructuras 3D. Al emplear términos de energía simples, las funciones empíricas son más rápidas que los métodos basados en campos de fuerza. Sin embargo, tienen el inconveniente de depender de la precisión de los datos utilizados para desarrollar el modelo.

Las funciones de puntuación basadas en el conocimiento se derivan de la información estructural obtenida de complejos ligando-receptor para obtener una función general. Las funciones utilizan análisis estadístico sobre estructuras 3D de complejos obtenidos experimentalmente para obtener las frecuencias de contacto interatómicas entre la proteína y el ligando. Para ello, se toma en cuenta la frecuencia con la que se encuentran dos átomos diferentes dentro de una distancia determinada en el conjunto de datos estructurales. De esta manera se clasifican y ponderan además, los diferentes tipos de interacciones observadas en la estructura obteniendo la puntuación final al sumar las interacciones individuales.

Las funciones de puntuación suelen estimar la energía de enlace del complejo utilizando muchas suposiciones y simplificaciones para aproximarse lo máximo posible a la energía de enlace real en un tiempo mínimo. Estas funciones buscan un equilibrio entre la estimación precisa de la energía de enlace y el costo computacional en términos de tiempo. Es por ello, que la principal limitación del acoplamiento molecular se debe a la falta de confianza en la capacidad de las funciones de puntuación para proporcionar energías de enlace precisas. Esto se debe al hecho de que algunos términos de interacción intermolecular difícilmente se pueden predecir con precisión, como el efecto de solvatación y el cambio de entropía (Sethi *et al.*, 2020). Así es que, podría ser útil el uso simultáneo de diferentes metodologías de puntuación para obtener una puntuación consensuada para combinar las ventajas y reducir las deficiencias de cada método. Además, para verificar la precisión de la conformación predicha del ligando dentro del sitio de unión objetivo mediante el acoplamiento molecular, se pueden comparar estos complejos con los datos de su estructura 3D correspondiente.

3. Hipótesis

Mediante el estudio *in silico* del mecanismo de reacción de fucosidasas microbianas de la familia GH29 será posible realizar la síntesis *in vitro* de oligosacáridos fucosilados con la α -L-fucosidasa de *B. longum*, empleando como sustrato donador el *p*NP-fucosa y diferentes sustratos aceptores.

4. Objetivos

4.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la síntesis de oligosacáridos fucosilados mediante una reacción de transfucosilación empleando α -L-fucosidasas microbianas en modelos *in silico* y técnicas *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Hacer comparaciones del sitio activo de dos fucosidasas de la subfamilia GH29A, *Thermotoga maritima* (*TmFuc*), *Lactocaseibacillus casei* (*AlfC*) y una de la GH29B, *B. longum* subsp. *infantis* (*BiAfcB*) mediante métodos *in silico*.
- Desarrollar un acoplamiento molecular con el donador de fucosilo *p*NP-fucosa y las tres fucosidasas estudiadas.
- Comprobar el efecto de la presencia de lactosa y su interacción con la enzima libre *TmFuc* y en complejo con fucosa.
- Analizar la interacción de los sustratos donadores de fucosilo 2'-FL, 3-FL y *p*NP-fucosa con *BiAfcB*.
- Determinar el grado de interacción de los sustratos aceptores de fucosilo lactosa y lactulosa con la enzima libre *BiAfcB* y en complejo con fucosa.
- Realizar la síntesis de fucooligosacáridos utilizando *p*NP-fucosa como sustrato donador de fucosilo y lactosa, lactulosa, galactosa y fructosa como sustratos aceptores, empleando un extracto enzimático de *B. longum*.

5 Metodología

5.1 METODOLOGÍAS *IN SILICO*

5.1.1 Estructuras 3D y ligandos

Las estructuras 3D de las α -L-fucosidasas mostradas en la Tabla 3 se recuperaron de la base de datos RCSB-PDB (rscb.org) (Berman *et al.*, 2000). De entre los modelos disponibles se seleccionaron estructuras de apoenzima y en complejo con fucosa o una molécula análoga, además de seleccionar las que tuvieran una resolución menor a 3 Å y no indicaran errores en los programas computacionales. Todos los modelos se prepararon con *UCSF Chimera* (Versión 1.15) (E. C. Meng *et al.*, 2006), conservando sólo la cadena proteica A cuando la estructura tuviera más de una y removiendo las moléculas de disolvente. A las estructuras seleccionadas se añadieron los hidrógenos faltantes de acuerdo al pKa de los aminoácidos a un pH de 7 en el servidor *PlayMolecule™*, mediante la herramienta *ProteinPrepare* (Martínez-Rosell *et al.*, 2017).

De la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) se obtuvieron las moléculas de pNP-Fuc (CID: 82473), 2'-fucosil lactosa (CID: 16219342), 3-fucosil lactosa (CID: 1318537869), fucosa (CID: 17106), lactosa (CID: 6134) y lactulosa (CID: 11333), las cuales se optimizaron con el software *Avogadro* (Versión 1.2.0) (Hanwell *et al.*, 2012), con un campo de fuerza MMFF94, 1000 pasos del algoritmo *steepest descent*, con una convergencia de 10^{-7} .

Tabla 3. Estructuras 3D utilizadas.

Organismo fuente	Enzima	Subfamilia	PDB ID	Sustrato*	Resolución	Referencias
<i>Thermotoga maritima</i>	TmFuc	GH29A	2ZWY	s/s	2.75 Å	(Wu <i>et al.</i> , 2010)
<i>Thermotoga maritima</i>	TmFuc	GH29A	1ODU	Fucosa	2.80 Å	(Sulzenbacher <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	AlfC	GH29A	6O18	s/s	2.55 Å	(Klontz <i>et al.</i> , 2020)
<i>Lactocaseibacillus casei</i>	AlfC	GH29A	6O1A	Fucosa	2.60 Å	(Klontz <i>et al.</i> , 2020)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	BiAfcB	GH29B	3UES	Desoxifuconojirimicina	1.60 Å	(Sakurama <i>et al.</i> , 2012)

* Sustrato cristalizado con la enzima; PDB ID: identificador en Protein Data Bank; s/s: sin sustrato

5.1.2 Comparación de fucosidasas de la subfamilia GH29A y GH29B

Las estructuras 3D de *TmFuc* (2ZWY), *AlfC* (6O18) y *BiAfcB* (3UES) se superpusieron utilizando la herramienta *MatchMaker* del programa *UCSF Chimera* tomando como referencia la estructura 2ZWY. El mejor alineamiento se determinó con base en la raíz de la desviación cuadrática media de la distancia entre los carbonos alfa para cada residuo entre la estructura 3D de referencia y las otras estructuras (RMSD-ca). Para este cálculo se empleó el algoritmo *Needleman-Wunsch* y la matriz *BLOSUM-62* con un multialineamiento entre las secuencias basado en la estructura posterior a la superposición. Adicionalmente, se realizó una búsqueda de otras α -L-fucosidasas homólogas con un porcentaje de identidad superior al 20%, comparando con *TmFuc*. La herramienta de búsqueda utilizada fue la de alineamiento básico local para proteínas (BLAST®P) (Altschul *et al.*, 1990) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

5.1.3 Acoplamiento molecular de fucosidasas *TmFuc*, *AlfC* y *BiAfcB* con el donador de fucosilo

Se realizó el acoplamiento molecular de las tres α -L-fucosidas: 2ZWY, 6O18, 3UES y como ligando se utilizó *pNP-Fuc*. Además, se realizó acoplamiento molecular de 3UES con fucosa, 2'-FL y 3-FL. Con *AutoDock Tools* (versión 1.5.6) se delimitó el espacio de búsqueda a la cavidad del sitio activo con las siguientes dimensiones: 17.25 x 27.75 x 22.5 Å para *TmFuc*, 18 x 27 x 28.5 Å para *AlfC* y 18 x 27.75 x 18.75 Å para *BiAfcB*. El docking se realizó con *AutoDock 4.2*, la constante de unión (K_b) y la energía libre de unión (ΔG_b) se calcularon con el algoritmo *genético de Lamarckian*. Se realizaron 250 corridas del algoritmo con una población inicial de 150 genes con un máximo de 2×10^3 generaciones y 25×10^6 evaluaciones de energía.

Los complejos obtenidos mediante el acoplamiento molecular de las tres α -L-fucosidasas se compararon con estructuras obtenidas de la base de datos de PDB, los cuales se consideraron como referencia. Las estructuras utilizadas fueron las siguientes: 1ODU para *TmFuc*, 6O1A para *AlfC* y 3UES para *BiAfcB*.

5.1.4 Validación del método de acoplamiento molecular

Para validar el método de acoplamiento molecular se realizó un redocking, que consiste en retirar el ligando de la estructura 3D y realizar un acoplamiento molecular con el ligando

para colocarla de nuevo, buscando que se coloque en la misma posición, con un RMSD menor a 2 Å al superponer la pose obtenida en el acoplamiento molecular con la pose del ligando en la estructura 3D. Este procedimiento se realizó con las condiciones de la sección 5.1.3 con las estructuras 1ODU, 6O1A y 3UES.

5.1.5 Estudio teórico de la síntesis de oligosacáridos fucosilados por acoplamiento molecular

Se realizó un acoplamiento molecular acumulativo con *TmFuc*, perteneciente a la subfamilia GH29A y *BiAfcB*, de la subfamilia GH29B, de acuerdo con el diagrama de la Figura 5, conservando un complejo enzima-ligando (*TmFuc*-lactosa y *BiAfcB*-lactosa) con la posición más frecuente. Posteriormente se utilizó ese complejo para realizar otro acoplamiento molecular, seleccionando nuevamente la posición más frecuente y guardando el complejo acumulando una molécula más de lactosa. Este ciclo se repitió hasta que las moléculas de lactosa se posicionaran en la cercanía del sitio activo.

Este procedimiento se realizó con las estructuras 2ZWY y 1ODU de *TmFuc*, así como con la 3UES de *BiAfcB*, a la que se le removió el ligando para usarla como estructura Apo y con la que se realizó un docking con fucosa para usarla como la estructura en complejo con fucosa. Los valores de K_b y ΔG_b se calcularon como se describe en la sección 5.1.3, con la modificación de 150 corridas y empleando una caja de dimensiones tales que cubriera toda la superficie de la enzima. Las imágenes del acoplamiento molecular acumulativo se generaron con *Discovery Studio Visualizer* (*Discovery Studio*, BIOVIA, Dassault Systèmes).

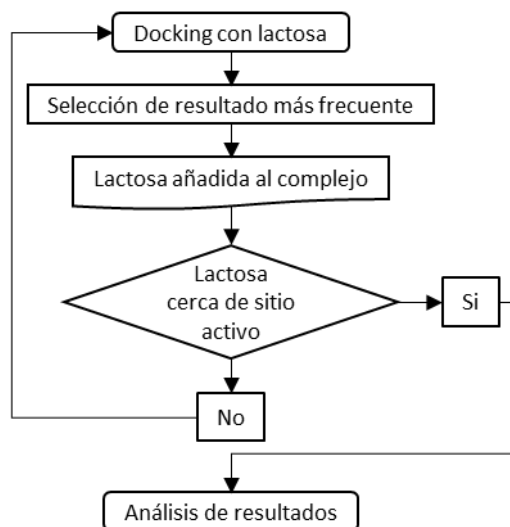


Figura 5 Diagrama del acoplamiento molecular acumulativo

5.2 METODOLOGÍAS *IN VITRO*

5.2.1 Propagación de bifidobacterias

Se utilizó una cepa de *B. longum* perteneciente al cepario de la UAM Xochimilco, denominada *Bifidobacterium longum* UAMX, la cual demostró tener actividad fucosidasa sobre pNP-Fuc en una investigación previa en la que se estudió la sobreexpresión de la enzima al reemplazar la fuente de carbono por inulina. Se inocularon 500 μ L de *B. longum* conservada en medio MRS-glicerol en una botella serológica con 10 mL de medio de cultivo MRS (Difco™) burbujeado con CO₂. Posteriormente, se incubaron durante 24 h a 37 °C con agitación orbital a 140 rpm se y resembraron 2.5 mL de este cultivo en botellas serológicas con 35 mL de medio de cultivo MRS con inulina como fuente de carbono incubando en las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

5.2.2 Preparación de suspensión de biomasa

Después de la incubación en medio MRS-inulina, se centrifugaron a 5500 rpm por 12 min a 4 °C (Avanti J-E, Beckman Coulter). Posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 10 mL buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7, con la finalidad de hacer un lavado. Después de resuspender las células, se centrifugó a 5500 rpm por 12 min a 4 °C, desechando el sobrenadante. El proceso de lavado se realizó dos veces. Las

células obtenidas fueron resuspendidas en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7, a una concentración de 45 mg de células /mL. Se cuantificó la concentración de la suspensión de células realizando una dilución 1:100 con agua, se utilizó un blanco de agua y se midió absorbancia a 600 nm, para obtener la concentración en mg/mL empleando la siguiente curva patrón elaborada previamente por el grupo de investigación:

$$mg \text{ de biomasa/mL} = \frac{ABS_{600nm} - 0.019}{0.2424}$$

Después, la suspensión de células se dividió en alícuotas de 10 mL que se depositaron en tubos para centrifuga de 15 mL y se conservaron en congelación.

5.2.3 Obtención del extracto enzimático

Los tubos con suspensión de células se descongelaron y se sonicaron con una sonda de 3 mm (CPX130PB, Cole Palmer), aplicando un tratamiento a 90% de amplitud durante 2 min con 30 s de reposo y un segundo ciclo de 2 min. Posteriormente los tubos con la suspensión fueron centrifugaron a 7500 rpm por 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

5.2.4 Lavado del extracto enzimático

El extracto enzimático se deshidrató mediante liofilización (Scientz-10N, Ningbo Scientz Biotechnology Co.), recuperándolo a un volumen menor y posteriormente se removió el exceso de sales con membranas de ultrafiltración de 30 kDa (Amicon® Ultra-4, Millipore) centrifugando a 7500 rpm por 15 min a 15 °C. El extracto enzimático se dosificó en volúmenes de 500 µL en microtubos de 1.5 mL y se conservó en congelación.

5.2.5 Actividad enzimática (hidrólisis)

Se preparó una solución de *p*NP-Fuc a 3.4 mM en buffer de fosfatos 0.005 M a pH 7 y en microtubos de 1.5 mL se colocaron 270 µL de solución de sustrato y 30 µL de extracto enzimático con actividad de 15 U. Las unidades enzimáticas (U) se definieron como el volumen de extracto enzimático necesario para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de reacción (pH 7, 37 °C). Cada mezcla de reacción se incubó a 37 °C en una incubadora con agitación orbital a 140rpm, se monitoreó la liberación de *p*-nitrofenol tomando muestras de 0 a 24 h en intervalos de 3 h, adicionando 30 µL de NaOH 0.5 M para

finalizar la reacción. Los tubos se mantuvieron en congelación hasta la cuantificación del nitrofenol liberado. Este procedimiento se realizó por triplicado.

5.2.6 Prueba de inhibición por el sustrato aceptor de fucosilo

Se siguió la metodología de 5.2.5, añadiendo lactosa o lactulosa a la solución de *p*NP-Fuc a una concentración de 14 mM. Este procedimiento se realizó por triplicado. Los datos fueron analizados con el software SPSS® Statistics 25 (IBM®) para obtener la velocidad inicial mediante regresión lineal y se realizó la prueba *t* de Student para identificar si las pendientes contaron con diferencias significativas.

5.2.7 Síntesis de OLH fucosilados

Para la reacción de síntesis se preparó una solución de sustrato donador con *p*NP-Fuc a 3.4 mM y 14 mM del sustrato aceptor (lactosa, lactulosa, galactosa o fructosa), en solución amortiguadora de fosfatos 0.005 M a pH 7 y se colocaron 270 µL de solución de sustrato y 30 µL de extracto enzimático con actividad de 15 U en microtubos de 1.5 mL. Cada mezcla de reacción se incubó a 37 °C, se monitoreó la liberación de *p*-nitrofenol y la síntesis de OLH fucosilados tomando muestras de 0 a 24 h, en intervalos de 3 h, adicionando 30 µL de NaOH 0.5 M para finalizar la reacción. Los tubos se mantuvieron en congelación hasta la cuantificación del nitrofenol liberado y ser inyectados en el HPLC para detectar los productos sintetizados. Este procedimiento se realizó por duplicado.

5.2.8 Cuantificación del *p*-nitrofenol liberado

La metodología se basó en la empleada por Escamilla-Lozano *et al.* (2019), realizando algunas modificaciones. El *p*-nitrofenol liberado tanto en la reacción de hidrólisis como en la de la reacción de síntesis se cuantificó mediante espectrofotometría a 410 nm (UV-1800, Shimadzu), empleando solución amortiguadora de fosfatos 0.005 M a pH 7 como blanco. Se diluyó con agua cuando los valores de absorbancia fueron superiores a 1. Los resultados obtenidos se compararon con una curva patrón de *p*-nitrofenol de 0 a 3.7 mM.

$$\mu\text{mol de } p - \text{nitrofenol} = \frac{ABS_{420nm}}{0.018437}$$

5.2.9 Cuantificación de los fucooligosacáridos sintetizados

Las muestras obtenidas de la síntesis de OLH fucosilados (sección 5.2.7) se filtraron con filtros de nylon de 0.22 μm (Allpure) y se analizaron en un equipo de HPLC (Lab Alliance) con una columna para oligosacáridos (HC75+ 305x7.75 mm, Hamilton) y un detector de dispersión de luz (light scattering) (300S ELSD, SofTA Corporation), utilizando agua desionizada como fase móvil (Milli-Q, Millipore) y nitrógeno molecular (N_2) como propelente (NiGen Micro, Claind srl). Se inyectó extracto enzimático y buffer de fosfatos como referencia y estándares de fucosa, lactosa, lactulosa, galactosa y glucosa para identificar el pico correspondiente al producto sintetizado. Para identificar y cuantificar posibles trisacáridos sintetizados se utilizó un estándar de rafinosa y en el caso de disacáridos, se utilizó un estándar de lactosa.

5.2.10 Identificación de los componentes del producto sintetizado

Se realizaron colectas del pico correspondiente al OLH sintetizado tomando el líquido antes de entrar al detector del sistema de HPLC, utilizando una columna para oligosacáridos (RNO Oligosaccharide Na^+ , 60x10 mm, RezexTM). Posteriormente se concentró mediante liofilización y se ajustó el volumen a 550 μL . Se inyectó en el equipo HPLC la colecta concentrada para verificar la presencia del producto sintetizado y posteriormente se tomaron 200 μL para realizar hidrólisis ácida, añadiendo 6 μL de HCl 2 M y se incubaron a 90 °C por 4 h. El hidrolizado se analizó mediante HPLC para cuantificar los monosacáridos liberados (Sección 5.2.9).

6 Resultados y discusión

6.1 COMPARACIÓN DE FUCOSIDASAS DE LAS SUBFAMILIAS GH29A Y GH29B

Las fucosidasas de la familia GH29 pertenecen al clan GH-R (Henrissat & Bairoch, 1996) por las características de su estructura terciaria y función catalítica, compartiendo este clan con las fucanasas de la familia GH107. Las enzimas de este clan se caracterizan por tener actividad sobre moléculas fucosiladas y estructuralmente, por contar con un plegamiento de barril (β/α)₈, que es una estructura compuesta de ocho unidades catenadas de hebra, bucle, hélice y giro, donde las láminas β se ubican en la parte interior de la enzima, conformando las tablillas del barril, mientras que las α hélices empaquetan el exterior. En las enzimas con este tipo de plegamiento se puede encontrar el sitio activo en los bucles $\beta \rightarrow \alpha$ (Silverman *et al.*, 2001). De acuerdo con la clasificación CAZy, *TmFuc* pertenece a la familia GH29 (Henrissat & Davies, 1997) y es una de las enzimas más estudiadas de esta familia (Shaikh *et al.*, 2013; Sulzenbacher *et al.*, 2004; Tarling *et al.*, 2003). Esta enzima fue la primera fucosidasa GH29 en la que se identificó el residuo catalítico ácido-base (Tarling *et al.*, 2003) y la primera de la que se obtuvo una estructura tridimensional (Sulzenbacher *et al.*, 2004). Adicionalmente, ha sido investigada en la síntesis de OLH fucosilados por su capacidad para catalizar la transfucosilación. Además, tiene una alta similitud estructural con fucosidasas de origen eucarionte, en especial con la fucosidasa humana FUCA1 (Jiménez-Pérez *et al.*, 2023), con la que comparte un 38% de identidad, la cual es de importancia médica, porque los procesos de defucosilación realizados por fucosidasas como FUCA1 contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamación crónica, y también intervienen en el señalamiento celular de tumores cancerígenos. (Fu *et al.*, 2022; Stütz & Wrodnigg, 2016). Al realizar una búsqueda de otras α -L-fucosidasas similares a *TmFuc* mediante el servicio BLAST®P, Se encontraron las siguientes: *Fusarium graminearum* de origen fúngico con 27% de identidad y las de origen bacteriano de *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Paenibacillus thiaminolyticus* con 26% y 33% de identidad respectivamente. Asimismo, cuenta con un 35% de identidad con respecto a la fucosidasa de *Bos taurus* (Zhou *et al.*, 2019), la cual es de origen animal.

Las fucosidasas de la familia GH29 se subdividen en las subfamilias A y B, las cuales tienen diferencias en sus secuencias que tienen efecto en su especificidad (Stütz & Wrodnigg,

2016). Para observar estas diferencias entre las dos subfamilias se tomó como referencia a *TmFuc*. Esta enzima pertenece a la subfamilia GH29A, con ella se realizó un comparativo junto con la fucosidasa AlfC de la subfamilia GH29A y *BiAfcB* perteneciente a la subfamilia GH29B, ambas utilizadas en la síntesis de fucooligosacáridos (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013; Saumonneau *et al.*, 2016) y provenientes de microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) (*GRAS Notices*, s. f.). Como se observa en la Figura 6A, estas enzimas cuentan con el dominio conservado *Alpha_L_fucos* (región morada) de acuerdo a la base de datos *Simple Modular Architecture Research Tool* (número de acceso SMART: SM00812) (Letunic *et al.*, 2021), lo que las incluye en esta familia de enzimas.

Las secuencias que tienen en común estas enzimas se encuentran principalmente en sus dominios catalíticos, los cuales pueden verse en las Figuras 6B, 6C y 6D. El dominio catalítico de *TmFuc* comprende del residuo 1 al 357, para *BiAfcB* del 21 al 359 y para el caso de AlfC, el dominio catalítico comprende toda su secuencia. En contraste, *TmFuc* y *BiAfcB* cuentan además con un dominio C terminal compuesto de β plegadas.

Al realizar la superposición de las estructuras 3D, se encontró que *TmFuc* cuenta con un porcentaje de identidad de 26.67% con AlfC, y un RMSD de 0.874. Como se evidencia en las Figuras 6B y 6C, las secuencias conservadas entre AlfC y *TmFuc* se ubican principalmente en las α hélices correspondientes a *TmFuc* A1, A2, A3, A8 y en las hojas β B2, B3, B7 y B8, las cuales además, se ubican alrededor del sitio activo. Al realizar la superposición entre *TmFuc* y *BiAfcB* se obtuvo un 25.27% de identidad, coincidiendo con el 26% de identidad obtenido por Sela *et al.* (2012) entre el gen Blon_2336 de fucosidasa de *B. longum* subsp. *infantis* y el gen TM0306 de fucosidasa de *T. maritima*. Al comparar las secuencias de *TmFuc* y *BiAfcB* se obtuvo un RMSD de 1.044, y se encontraron secuencias conservadas en los alrededores del sitio activo de las estructuras secundarias correspondientes a *TmFuc* A2, A3, A8, B3, B4, B7 y B8 (Figura 6B y Figura 6D). En adición a las diferencias en el porcentaje de identidad y la similitud estructural, las fucosidasas de la subfamilia GH29A analizadas en este trabajo, cuentan con diferencias en el sitio activo, lo que se discutirá detalladamente más adelante.

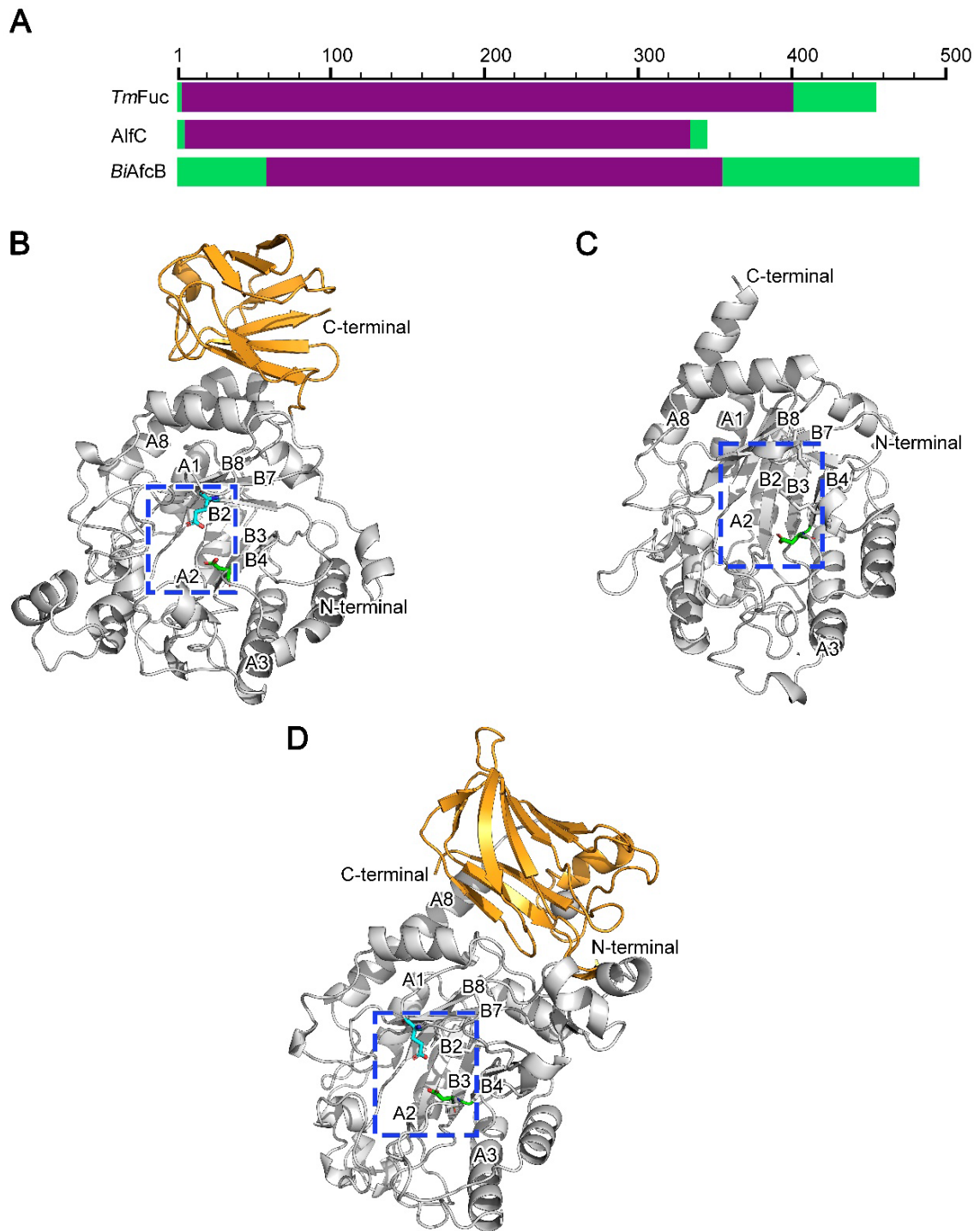


Figura 6. A- Alineamiento de la secuencia de TmFuc, AlfC y BiAfcB con el dominio conservado Alpha_L_fucos y estructura de las tres fucosidasas. A: La secuencia general de la enzima se indica en color verde, el dominio conservado Alpha_L_fucos se indica en color morado: B: TmFuc, C: AlfC, D: BiAfcB. El color gris corresponde al dominio catalítico, el color naranja corresponde al dominio C-terminal, el sitio activo se ubica al interior del recuadro punteado con líneas azules.

Como se observa en la Figura 7A, las enzimas de la subfamilia GH29A cuentan con una ARG que se encuentra conservada en las fucosidasas de esta subfamilia, como ARG254 en *TmFuc* y ARG229 en *AlfC*. Este residuo tiene la función de ayudar en el posicionamiento del sustrato al formar un puente de hidrógeno con el oxígeno endocíclico de la fucosa. Por otra parte, en *BiAfcB*, que pertenece a la subfamilia GH29B, esta ARG no está conservada, pero se tienen los residuos TRP213, GLU237 y ASP283 (Figura 7B), los cuales están asociados a un sitio de unión de galactosa y se encuentran conservados en otras fucosidasas de la subfamilia GH29B (Sakurama *et al.*, 2012). Respecto a los aminoácidos catalíticos, el nucleófilo ASP se encuentra conservado en las tres fucosidasas, como ASP224 en *TmFuc*, ASP200 en *AlfC* y ASP172 en *BiAfcB* (Figura 7A, Figura 7B y Figura 7C). Mientras que el otro residuo catalítico que actúa como ácido-base general, se encuentra conservado en *TmFuc* como GLU266 y en *BiAfcB* como GLU217 (Figura 7B y Figura 7C). Asimismo, en *AlfC* hay tres residuos que podrían realizar esta función: GLU 39, ASP242 y GLU274, como fue reportado por Klontz *et al.* (2020).

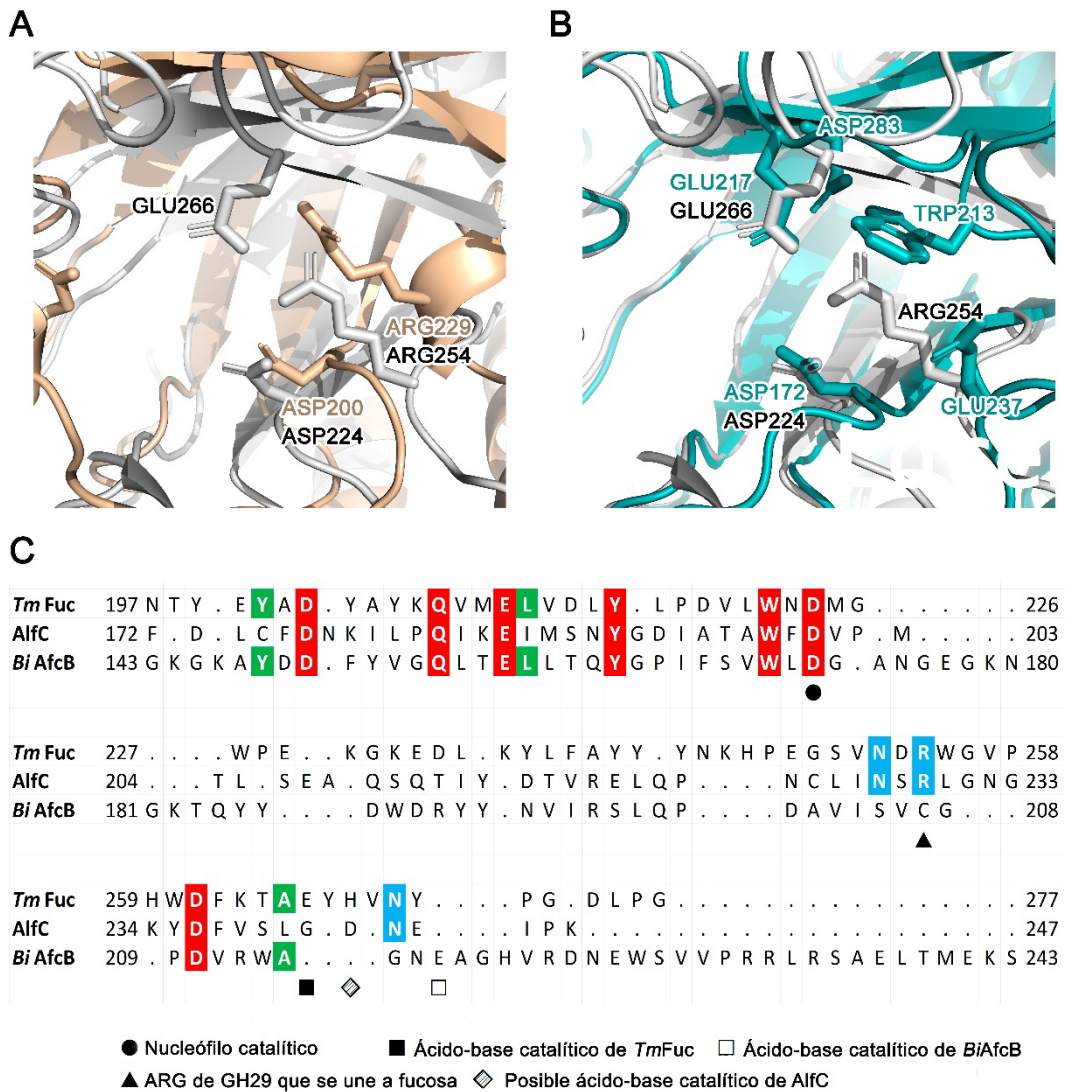


Figura 7 Alineamiento del sitio activo de fucosidasas de la subfamilia GH29A y GH29B. A: *TmFuc* (gris) y *AlfC* (café), dos fucosidasas de la subfamilia GH29A. B: *TmFuc* (gris) de la subfamilia GH29A y *BiAfcB* (azul) de la subfamilia GH29B. C: Multialineamiento de las secuencias de *TmFuc*, *AlfC* y *BiAfcB*. Secuencias conservadas entre *TmFuc* y *AlfC* en color azul, secuencias conservadas entre *TmFuc* y *BiAfcB* en color verde, secuencias conservadas entre las 3 en color rojo.

Mediante la comparación de las enzimas de ambas subfamilias, se confirmó que existen diferencias en la secuencia entre las fucosidasas que dan origen a su división en las subfamilias GH29A y GH29B, las cuales se relacionan a cambios estructurales que pueden influir tanto en su afinidad como en su especificidad hacia el sustrato.

6.2 ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE FUCOSIDASAS DE LAS SUBFAMILIAS GH29 CON EL DONADOR DE FUCOSILO *p*NP-FUC

El *p*NP-Fuc es una molécula activada que comúnmente es empleada para la síntesis de oligosacáridos fucosilados (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018a; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013; Zeuner, Vuillemin, *et al.*, 2018). Por esta razón se estudió la interacción entre este sustrato y las fucosidasas *TmFuc* y *AlfC* de la subfamilia GH29A, y *BiAfcB* de la subfamilia GH29B, para obtener información adicional a la reportada en la literatura sobre la afinidad de estas fucosidasas por *p*NP-Fuc (Osanojo *et al.*, 2007; Rodríguez-Díaz *et al.*, 2013; Sela *et al.*, 2012).

Para validar el procedimiento de docking que se presenta a continuación, se realizó un redocking con las estructuras 1ODU, 6O1A y 3UES utilizando el ligando presente en la estructura 3D, obteniendo valores de RMSD de 1.050 Å para 1ODU, 1.937 Å para 6O1A y 0.435 Å para 3UES (*Anexo 1*). Estos datos indican que el método utilizado para realizar el acoplamiento es fiable, ya que los datos de RMSD son inferiores a 2 Å entre el ligando de la estructura 3D y la superposición de la pose del ligando obtenida del redocking

6.2.1 Acoplamiento molecular entre *TmFuc* y *p*NP-Fuc

La Figura 8A muestra el acoplamiento molecular entre *TmFuc* y *p*NP-Fuc. Se obtuvo un complejo en donde el ligando se colocó entre los residuos catalíticos. La porción de fucosa correspondiente al monosacárido reductor de la molécula, ocupa el subsitio -1 dentro de la cavidad del sitio activo (Figura 8A y Figura 8B), mientras que la porción del *p*-nitrofenol, correspondiente al aglicón ubicado en el subsitio +1, se colocó en el exterior de la cavidad del sitio activo.

Además, en la Figura 8A se observó el anillo aromático del *p*NP-Fuc formando interacciones pi-alquil con la LEU50 y pi-sigma con la MET225, estabilizando el aglicón. Por otro lado, el C6 de la fucosa formó interacciones pi-alquil con los aminoácidos aromáticos PHE290, PHE32, TRP222 y con la HIS34, manifestando la hidrofobicidad de la parte exterior del bolsillo catalítico. Se determinó que el residuo catalítico ASP224 formó un puente de hidrógeno con el C4 de la fucosa, manteniéndose a 4 Å del C1 (Figura 8B), sobre el cual se debe realizar un ataque nucleofílico para formar el complejo enzima-sustrato. El otro residuo catalítico, el GLU266 está a 4.1 Å del C1 de la fucosa con una interacción carbono-

hidrógeno y la ARG254 formó un puente de hidrógeno con el oxígeno endocíclico. Finalmente, el complejo *TmFuc-pNP-Fuc* presentó una K_b de 167.15 μM y una ΔG_b de -5.6 kcal/mol, valor cercano al de -5.9 kcal/mol obtenido por Pérez-Escalante *et al* (2021) al realizar un análisis *in silico* con posibles donadores de fucosilo para realizar la reacción de transfucosilación con *TmFuc*.

Para validar el resultado del docking, se comparó con la estructura 3D de referencia 1ODU (Sulzenbacher *et al.*, 2004) la cual, está en complejo con fucosa porque la estructura 3D 1ODU se obtuvo experimentalmente y tiene la pose adecuada para el sustrato en el sitio -1 del sitio activo, que es precisamente donde se reconoce el residuo de fucosa. Por otro lado, el aglicón *p*-nitrofenol es corto y no está ramificado, por lo que no se esperaba impedimento estérico (Miura *et al.*, 2019). Como se puede observar en la Figura 8B, la fucosa del acoplamiento del donador *pNP-Fuc* se ubicó en una posición muy cercana a la de la estructura 3D de referencia en el subsitio -1, con distancias similares entre el C1 de la fucosa y el carboxilo de los residuos catalíticos.

6.2.2 Acoplamiento molecular con AlfC y *pNP-Fuc*

Como puede verse en la Figura 8C, cuando se realizó el docking entre AlfC y *pNP-Fuc*, el ligando se colocó cerca del ASP200, con la porción de fucosa de la molécula ubicada en el subsitio -1 y el aglicón en el subsitio +1 (Figura 8D).

La Figura 8C muestra las interacciones entre el ligando y la enzima, en las cuales el anillo aromático del nitrofenol del *pNP-Fuc* formó una interacción π -apilado con el TRP40 y el hidroxilo un puente de hidrógeno con la ALA154. Además, se observó un par de interacciones π -alquil que se establecieron entre el TRP198, el TRP283 y el C6 de la fucosa. HIS18 e HIS87 formaron puentes de hidrógeno con los hidroxilos del C4 y C5 respectivamente, mientras que la ARG229 formó un puente de hidrógeno con el oxígeno endocíclico de la fucosa. El residuo catalítico ASP200 no registró interacción con el ligando, sin embargo, el carbono carboxílico de este residuo catalítico se encuentra a 5.3 Å del C1 de la fucosa (Figura 8D. No hay interacción con el residuo que actúa como ácido-base general y no se observa en la cercanía del sitio activo, coincidiendo con Klontz *et al.* (2020). Estos autores reportaron que la enzima actúa con un mecanismo de pinza, es decir que tiene una región flexible sobre la cual se ubica uno de los posibles residuos catalíticos que realiza su función al cerrarse sobre el sitio activo, es por ello que este residuo catalítico se

encuentra a mayor distancia que en otras fucosidasas como la de *TmFuc*, en la cual se encuentran a una distancia más cercana debido a que el sitio activo consta de un bolsillo con una cavidad para acomodar la fucosa entre los residuos catalíticos. En este complejo enzima-ligando se obtuvieron una K_b de 261.42 μM y una ΔG_b de -4.89 kcal/mol.

Para validar el resultado del docking se comparó con la estructura 3D de referencia 6O1A en complejo con fucosa (Klontz *et al.*, 2020). Como se puede observar en la Figura 8D, la fucosa del *pNP-Fuc* del docking se ubicó en una posición muy cercana a la de la estructura 3D de referencia en el subsitio -1. Esta posición se encontró a una distancia de 5.6 Å entre el carbono carboxílico del ASP200 y el C1 de la fucosa, mientras que en la estructura 3D de referencia la distancia es de 5.3 Å.

6.2.3 Acoplamiento molecular con *BiAfcB* y *pNP-Fuc*

Como se muestra en la Figura 8E y Figura 8F, en el docking entre *BiAfcB* y *pNP-Fuc* el ligando también se colocó entre los residuos catalíticos. La porción de fucosa de la molécula se ubicó en el subsitio -1 dentro de la cavidad del sitio activo, la cual es la cavidad izquierda en la Figura 8E. A diferencia de *TmFuc* y *AlfC*, el sitio activo de *BiAfcB* tiene forma de ranura alargada con dos sitios de unión de carbohidratos. Uno de esos sitios de unión es para fucosa y el contiguo, que puede verse a la derecha en la figura Figura 8E, está reportado como un sitio de unión de galactosa (Sakurama *et al.*, 2012). El aglicón se ubicó en el subsitio +1, sin insertarse por completo en dicha cavidad, esta orientación es necesaria porque los residuos catalíticos se encuentran en medio de las 2 cavidades.

Como se muestra en la Figura 8E, el anillo aromático del *pNP-Fuc* formó enlaces pi-apilado con el TRP213, pi-alquil con la ALA174 y pi-anión con el ASP172. El C6 de la fucosa formó enlaces pi-apilado con el TRP290 y pi-alquil con el TRP170 y PHE34 y puentes de hidrógeno con la HIS36, TRP47 y HIS85. El residuo catalítico ASP172 no registró interacción con el ligando pero se encontró a 3.7 Å del C1 de la fucosa. Además, el GLU217, el cual actúa como ácido-base general, se ubicó a 4.1 Å del C1 (Figura 8F) con una interacción mediante fuerzas de van der Waals. El total de las interacciones entre la enzima y el ligando contaron con una K_b de 1.42 mM y una ΔG_b de -3.4 kcal/mol.

Para validar el resultado del docking se comparó con la estructura 3D de referencia 3UES (Sakurama *et al.*, 2012), que está en complejo con el inhibidor desoxifuconojirimicina (DFJ), el cual es un iminoazúcar muy similar a la fucosa, donde un átomo de nitrógeno sustituye

al oxígeno endocíclico. Se eligió esa estructura porque es la única disponible que está en complejo con un monosacárido similar a la fucosa, además de que este tipo de inhibidores forma fuertes interacciones con las fucosidasas, produciendo inhibición en el rango de nM. En la Figura 8F, se puede observar que la fucosa del pNP-Fuc del docking se ubicó en una posición muy cercana a la de la DFJ de la estructura 3D de referencia en el subsitio -1, con distancias similares entre el C1 de la fucosa y el carbono carboxílico de los aminoácidos catalíticos a las encontradas en la estructura 3D de referencia.

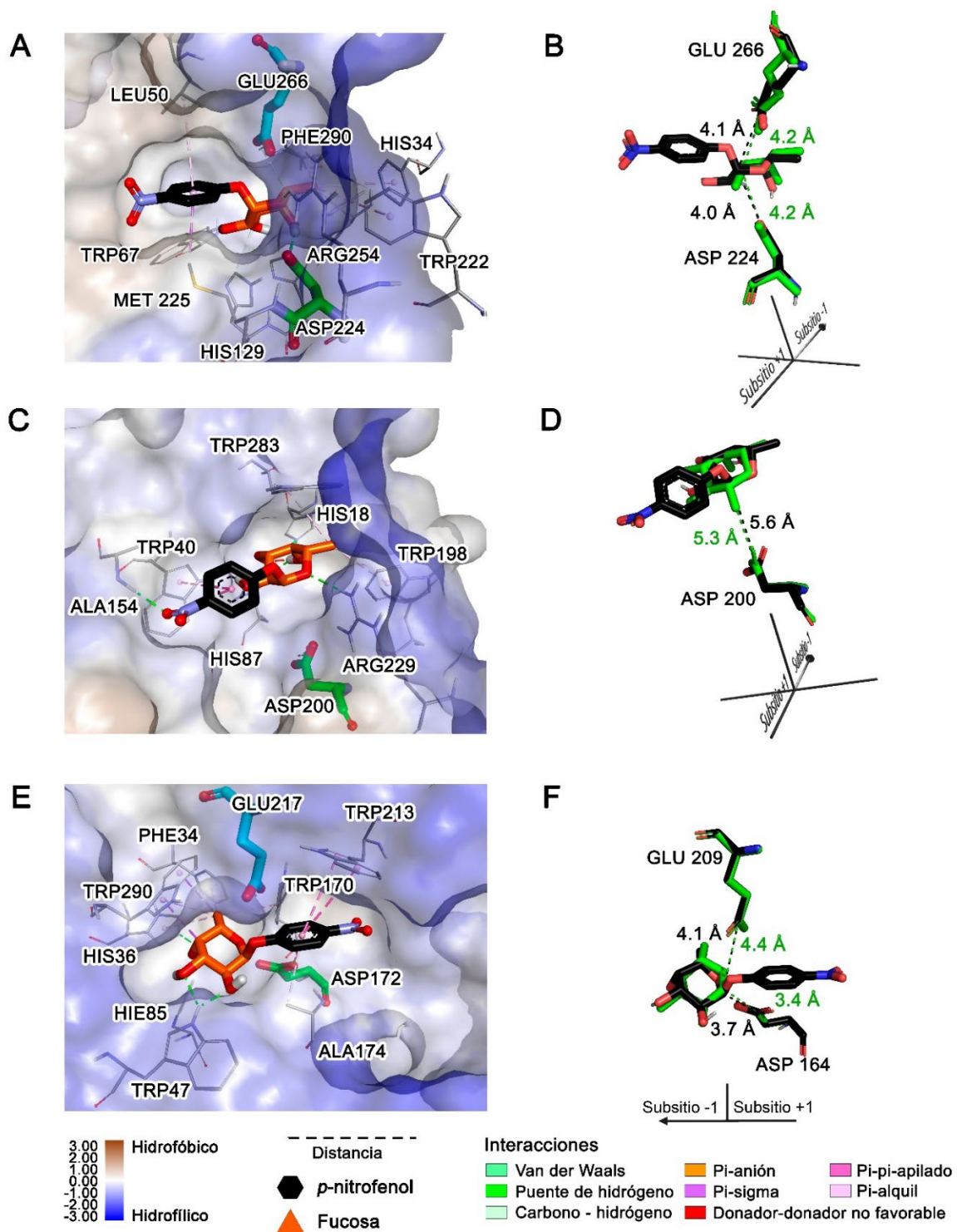


Figura 8 Dockings obtenidos con TmFuc, AlfC, BiAfcB y pNP-Fuc. A: TmFuc, C: AlfC, E: BiAfcB. Comparación de los complejos obtenidos y los cristales de referencia (en color morado) B: TmFuc y 1ODU (Sulzenbacher et al., 2004), D: AlfC y 6O1A (Sakurama et al., 2012), F: BiAfcB y 3UES (Klontz et al., 2020).

Como puede apreciarse en la Tabla 4, con las fucosidasas estudiadas de la subfamilia GH29A se obtuvo una menor ΔG_b que la α -L-fucosidasa estudiada de la subfamilia GH29B, por lo que las primeras parecen formar complejos energéticamente más estables con pNP-Fuc. Haciendo una analogía con la energía libre de Gibbs, es evidente que empleando las fucosidasas GH29A, la reacción se realizará con mayor facilidad que con la GH29B. Estos datos fueron confirmados con los reportados en la literatura, los cuales demuestran experimentalmente, que este donante de fucosilo tiene una mayor afinidad con *TmFuc* (Sakurama *et al.*, 2012).

Tabla 4. ΔG_b y K_b obtenidas del docking entre las tres fucosidasas y pNP-Fuc

Enzima	Microorganismo	Familia	K_b (μ M)	ΔG_b (kcal/mol)	K_M pNP-Fuc (μ M)
<i>TmFuc</i>	<i>T. maritima</i>	GH29A	167.15	-5.6	200 \pm 3 (Osanjo <i>et al.</i> , 2007)
AlfC	<i>L. casei</i>	GH29A	261.42	-4.89	700 \pm 30 (Klontz <i>et al.</i> , 2020)
<i>BiAfcB</i>	<i>B. longum subsp. infantis</i>	GH29B	1420	-3.88	-

K_b : constante de unión; ΔG_b energía de unión

Las diferencias en la ΔG_b obtenidas podrían estar relacionadas con las interacciones encontradas en el complejo enzima-ligando. Para el caso de las α -L-fucosidasas GH29A, se observó que la forma del sitio activo de *TmFuc* permitió sujetar mejor al anillo aromático del ligando al interactuar por ambos lados del plano del anillo con el bolsillo hidrofóbico. Mientras tanto, en AlfC esta interacción se dio solamente entre una de las caras del ligando y una región menos hidrofóbica de la enzima. La interacción encontrada con *TmFuc* coincide con reportes sobre una mejora en la capacidad inhibitoria sobre α -L-fucosidasas en moléculas que incorporan residuos hidrofóbicos en el aglicón, ya que mientras una molécula de L-fuconojirinimicina cuenta con una constante de inhibición (k_i) de 1 nM, una molécula derivada de esta que además cuenta con un aglicón compuesto de residuos aromáticos puede reducir la k_i hasta 231 pM (Moreno-Clavijo *et al.*, 2011).

Por otra parte, en la interacción obtenida con las α -L-fucosidasas GH29A también interviene el residuo de ARG característico de las GH29A y su acción sobre el oxígeno endocíclico de

la fucosa, la cual tiene la función de estabilizar el ligando en el sitio activo (Sakurama *et al.*, 2012) en los acoplamiento moleculares con *TmFuc* y *AlfC*, a diferencia de la GH29B que no cuenta con este residuo. Por otro lado, en el acoplamiento molecular con *BiAfcB*, el complejo podría ser menos estable debido a que el sitio activo es diferente porque tiene una cavidad adyacente reportada como un sitio de unión de galactosa (Sakurama *et al.*, 2012). El grupo *p*-nitrofenol del sustrato donador se aloja sobre este sin insertarse por completo, debido a que el enlace glucosídico en posición α que lo une a la fucosa y la rigidez del anillo aromático le restan flexibilidad, ocasionando que las interacciones no sean igual de favorables al no tener la capacidad de insertarse más en la cavidad.

Asimismo y como se observa en la Tabla 4, la K_b obtenida en el acoplamiento molecular para *TmFuc* fue 1.6 veces menor a la de *AlfC*. Dado que la K_b representa la unión y disociación de la enzima (α -L-fucosidasa) y el ligando (*pNP-Fuc*), esto se puede relacionar con K_M , la cual a su vez se relaciona la unión y disociación del complejo enzima – sustrato de una reacción enzimática. De tal forma, se puede asumir que tanto *TmFuc* como *AlfC* tienen mayor afinidad por *pNP-Fuc*, lo cual coincide con las K_M reportadas por Osanjo *et al.* (2007) para *TmFuc* y por Klontz *et al.* (2020) para *AlfC*. Mientras tanto, mediante el acoplamiento molecular se obtuvo para *BiAfcB* una K_b mayor a la de las otras dos fucosidasas (8.5 veces mayor a la de *TmFuc*) lo cual indica una menor afinidad, lo cual podría atribuirse a que se ha reportado que las fucosidasas GH29B tienen una especificidad más reducida hacia sustratos α -1,3.

Como se puede observar con los resultados obtenidos, las interacciones que establezca el donador de fucosa con la enzima son importantes y podrían estar relacionados con la afinidad. Estas diferencias en la interacción pueden deberse a la presencia de residuos particulares de cada subfamilia de α -L-fucosidasa.

6.3 ESTUDIO TEÓRICO DE LA SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS FUCOSILADOS POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE *TmFuc* CON EL DONADOR DE FUCOSILO (LACTOSA)

Para simular el mecanismo de reacción de *TmFuc*, se realizaron acoplamiento moleculares acumulativos con lactosa en dos conformeros diferentes: utilizando una estructura 3D de α -L-fucosidasa en forma apo (2ZWY) y una estructura 3D de α -L-fucosidasa en complejo con fucosa (1ODU). Teniendo en cuenta que no existe una interacción covalente entre la fucosa y la enzima en este modelo 3D, el hidroxilo C1 de la fucosa forma interacciones por puentes

de hidrógeno con el residuo catalítico ASP224 (Anexo 2), con el que el enlace covalente se incluye en el complejo intermediario.

6.3.1 Interacción entre *TmFuc* como apoenzima y lactosa

En la Figura 9A se observa el acoplamiento molecular acumulativo de la lactosa con la apoenzima. La lactosa se colocó en cavidades hidrofóbicas adyacentes a sitios altamente hidrofílicos en los primeros dos ciclos y en los ciclos 4, 5 y 6, se colocó en la cercanía del sitio activo. Se encontró que la lactosa no produce inhibición competitiva al formar interacciones más favorables con regiones de la enzima distintas al sitio activo. Esto podría estar relacionado con el incremento en el rendimiento de la reacción de transfucosilación al utilizar mayores proporciones de lactosa con respecto a *pNP-Fuc*. En la Figura 9B se muestra la posición más cercana al residuo catalítico GLU266, que se obtuvo en el ciclo 6, con una distancia de 12.2 Å entre el CC de la cadena lateral de este residuo y el hidroxilo del C2 de galactosa. Se llevaron a cabo un par de ciclos más en los que la lactosa se colocó en regiones más alejadas del sitio activo. En cuanto a la ΔG_b , en los ciclos 1 y 2 se obtuvieron los valores más bajos, seguidos del 3, 5 y 6, mientras que en los ciclos 4, 7 y 8 se obtuvieron los valores más altos (Tabla 5).

En la Tabla 5 se observa además, un aumento en el valor de ΔG_b con el aumento de ciclos. Esto indica que se pierde estabilidad en la interacción entre el sustrato aceptor y la enzima cuando hay más moléculas presentes. Además, la afinidad del complejo también disminuyó con valores obtenidos de K_b 14 veces superiores en la octava molécula de lactosa que se unió a la enzima respecto a la primera.

Tabla 5. ΔG_b y K_b de docking acumulativo con lactosa

Ciclo	Apoenzima		<i>TmFuc</i> -fucosa	
	K_b (μ M)	ΔG_b (kcal/mol)	K_b (μ M)	ΔG_b (kcal/mol)
1	337.94	-4.74	668.38	-4.33
2	237.21	-4.95	225.12	-4.98
3	901.3	-4.15	9670	-2.75
4	1620	-3.81	22980	-2.24
5	670.51	-4.33	-	-
6	499.33	-4.5	-	-
7	1492	-3.88	-	-
8	4940	-3.15	-	-

K_b : constante de unión; ΔG_b : energía de unión

6.3.2 Interacción entre el complejo *TmFuc*-fucosa y lactosa

En la Figura 9C, se observó que en el acoplamiento acumulativo con la enzima en complejo con fucosa, la lactosa se colocó frente a la cavidad del sitio activo en el tercer ciclo, a una distancia de 3.5 Å entre el CC de la cadena lateral del GLU266 y el hidroxilo del C2 de la galactosa y a 5.7 Å de distancia entre el CC del GLU266 y el hidroxilo del C3 de la glucosa (Figura 9D).

Como se puede observar en la Tabla 5, de manera similar al acoplamiento acumulativo entre la lactosa y la apoenzima, con el complejo enzima-fucosa formado, también se produce una disminución en la estabilidad de la interacción entre la lactosa y la enzima. Se obtuvo un aumento de la ΔG_b . La afinidad del complejo disminuyó con el paso de los ciclos aumentando el orden de magnitud de las K_b entre los dos primeros ciclos y los dos últimos.

En los 2 acoplamientos moleculares mencionados anteriormente, la lactosa se colocó en los primeros dos ciclos en las mismas cavidades adyacentes a una región altamente hidrofílica, formando complejos de baja ΔG_b . Estas incrementaron al colocarse las moléculas de lactosa en otras posiciones en ciclos posteriores. En la posición más frecuente, la cual fue obtenida en el primer ciclo (número 1 en las Figura 9A y Figura 9C), la lactosa se colocó en una cavidad bordeada por los residuos hidrofílicos GLU229, LYS230 y ASN197. Esta región de la fucosidasa de *T. maritima* coincide con la reportada por Zhou *et al.* (2019), para una molécula derivada de desoxifuconojirimicina. Esto sugiere que esta región es propicia para la unión de sustratos sin producir inhibición. En la segunda posición más frecuente (Figura 9A), la lactosa se colocó en una cavidad delimitada por la ARG16, que es un residuo altamente hidrofílico. Esta tendencia también se observó en posiciones posteriores, como la 4 (Figura 9A y Figura 9C), corroborando que la lactosa tiene mayor afinidad por las regiones hidrofílicas de la enzima. Esto coincide con la polaridad de la molécula. De tal modo al acercarse al sitio activo, el cual es una región hidrofóbica, las interacciones son menos favorables y la ΔG_b se incrementa.

Se descartó que la lactosa produjera inhibición competitiva a la enzima debido a que en el ciclo 6, con apoenzima, la molécula de lactosa posicionada más cerca al sitio activo no pudo ocuparlo ni colocarse frente a él (Figura 9B). Por otro lado, cuando la fucosa estaba presente en el sitio activo (Figura 9C), la lactosa se colocó frente al sitio activo en el tercer

ciclo a una distancia de 3.5 Å entre el hidroxilo del C3 de la glucosa y el oxígeno de la cadena lateral del GLU266. Además, el hidroxilo del C2 de la galactosa se localizó a una distancia de 1.8 Å de este residuo catalítico, formando un enlace de puente de hidrógeno entre el hidroxilo de C2 y el oxígeno de GLU266 (Figura 9D). Es así como, sería posible sintetizar 2'FL sobre 3-fucosilactosa (3FL) ya que el hidroxilo del C2 en la galactosa interactúa con el ácido-base general, según los resultados obtenidos del mecanismo de reacción (Zeuner *et al.*, 2014). En correspondencia, Burgin y Mayes (2019) recientemente reportaron estudios similares utilizando métodos *in silico*. Estos autores simularon la transferencia del sustrato donador 1-azido-β-L-fucosa hacia una molécula de 4-nitrofenil-β-D-xilopiranosido y encontraron este estado de transición de tipo oxocarbenio entre el aceptor de fucosilo y el GLU266 de la enzima, como se demostró en este estudio.

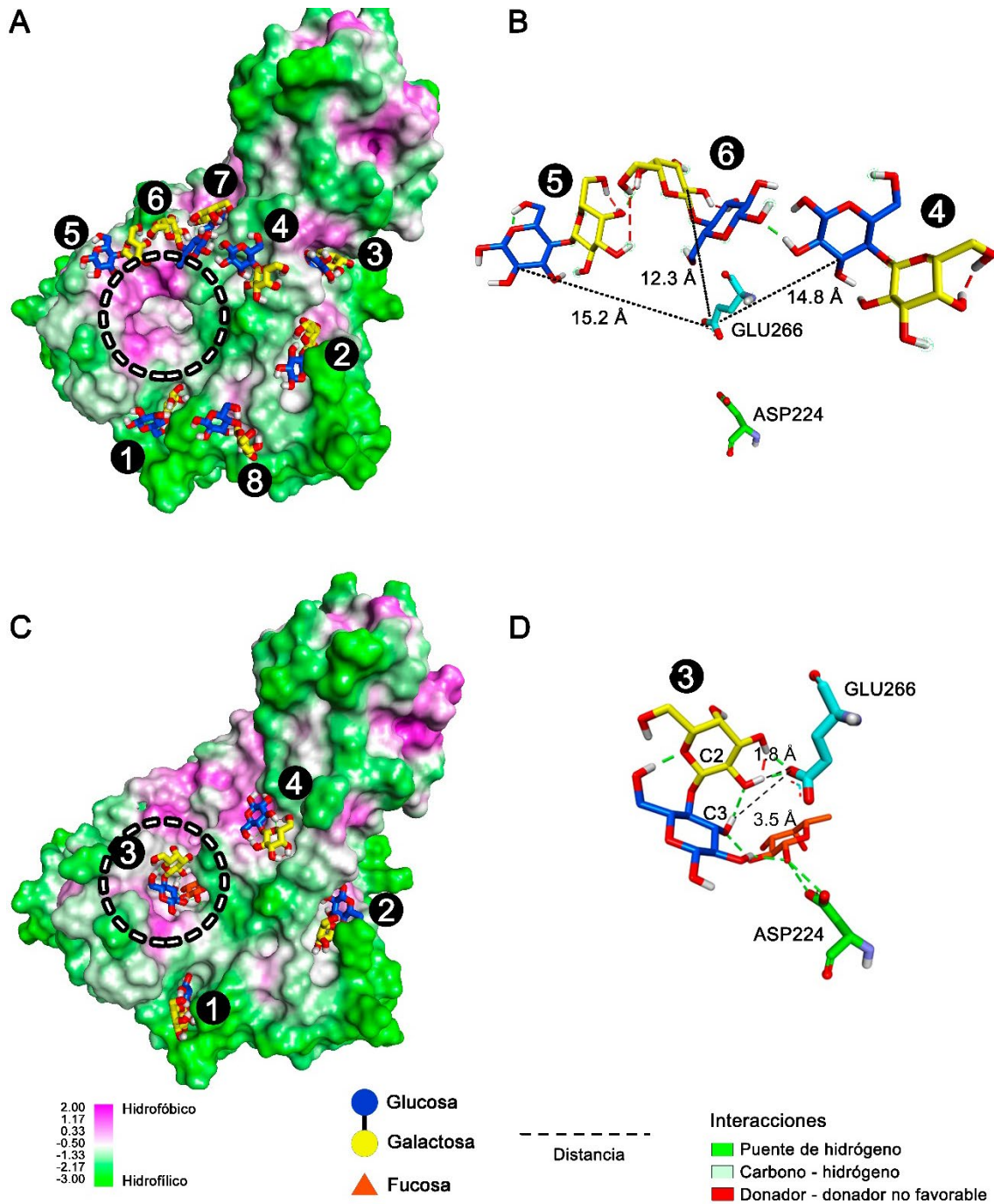


Figura 9 Docking acumulativo con lactosa y TmFuc en forma de apoenzima y en complejo con fucosa. A: apoenzima, C: enzima en complejo con fucosa. El sitio activo está señalado por el círculo punteado. Diagrama de interacciones entre enzima y ligando con las moléculas de lactosa más cercanas a los aminoácidos catalíticos, B: apoenzima, D: enzima en complejo con fucosa. Se indican las interacciones por puentes de hidrógeno en color verde, las interacciones no favorables en color rojo y las distancias entre átomos en color negro. Los números indican el ciclo en el que se obtuvo la posición del ligando.

Aunque las moléculas de lactosa ocupan otros lugares más favorables en su interacción con la enzima antes de llegar al sitio activo, la presencia de fucosa en el sitio activo parece favorecer el acercamiento de la lactosa, reduciendo la hidrofobicidad del subsitio +1 del bolsillo catalítico (Anexo 2. Hidrofobicidad del bolsillo catalítico de *TmFuc*). Este fenómeno puede explicar por qué, para aumentar el rendimiento en las reacciones de síntesis de oligosacáridos fucosilados se requieren mayores proporciones de sustrato aceptor con respecto a la proporción de sustrato donador.

Esta tendencia se puede observar en la Tabla 6 con los rendimientos de síntesis informados por Lezyk *et al.* (2016) y Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018), quienes utilizaron varias proporciones de sustrato aceptor (lactosa) y sustrato donador de fucosilo (*pNP-Fuc*) con *TmFuc*. En estos estudios se obtuvieron mayores rendimientos a medida que existe una mayor proporción de sustrato aceptor respecto al sustrato donador de fucosilo. También es probable que los productos de reacción se hidrolicen y afecten el rendimiento de la reacción. Debido a esto, se realizó el acoplamiento de *TmFuc* como apoenzima con 2'FL y 3FL (Anexo), obteniendo valores de ΔG_b de -4,7 y -3,23 kcal /mol respectivamente. Estos valores fueron superiores a las -5,15 kcal/mol obtenidas con *pNP-Fuc*. De igual manera, la K_b también fue mayor para los productos, con 356,49 μM para 2'FL y 4320 μM para 3FL, mientras que para el sustrato fue de 168,64 μM , lo que indicó la existencia de una preferencia por el sustrato sobre los productos.

Tabla 6. Fucosidasas de la familia GH29 utilizadas en la síntesis de oligosacáridos fucosilados

Enzima	Sub familia	Donador	Aceptor	D:A	Producto	Rendimiento (%)	Referencia
<i>TmFuc</i> (<i>T. maritima</i>)	GH29A	<i>pNP-Fuc</i>	Lactosa	1:1.25 1:4	2'FL	1 6.4	(Lezyk <i>et al.</i> , 2016)
<i>TmFuc</i> (<i>T. maritima</i>)	GH29A	<i>pNP-Fuc</i>	Lactosa	1:324 1:649 1:973	Trisacárido fucosilado	9.26 21.54 32.47	(Guzmán-Rodríguez <i>et al.</i> , 2018b)

D:A: proporción molar donador:aceptor.

6.4 ESTUDIO TEÓRICO DE LA SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS FUCOSILADOS POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR CON *BiAfcB*

De manera análoga a la simulación del mecanismo de reacción de *TmFuc* de la sección 6.3, se realizaron acoplamiento acumulativos con los sustratos aceptores de fucosilo lactosa y lactulosa. Estos acoplamiento se realizaron en dos conformeros diferentes: 1) utilizando la estructura 3D 3UES de *BiAfcB* removiendo el ligando para utilizarla como forma apo y además realizando un docking con esta estructura y 2) fucosa para posicionarla en el sitio activo y simular el complejo enzima-sustrato. Teniendo en cuenta que no existe una interacción covalente entre la fucosa y la enzima con este modelo 3D, el hidroxilo C1 de la fucosa forma interacciones por puentes de hidrógeno con el residuo catalítico ASP172 con el que el enlace covalente se incluye en el complejo intermediario.

6.4.1 Interacción entre *BiAfcB* y sustratos aceptores

6.4.1.1 Interacción entre *BiAfcB* como apoenzima y lactosa

En la Figura 10A se observa el acoplamiento molecular acumulativo con la apoenzima en el cual la lactosa se colocó en cavidades neutras y en el ciclo 5 se insertó en la cavidad del sitio activo. En la Figura 10B se observa la pose de la molécula de lactosa en el sitio activo, el cual se posicionó de modo que la glucosa ocupa el sitio de unión para fucosa, mientras que la galactosa ocupó la cavidad adyacente. La capacidad de la lactosa para ocupar el sitio activo sugiere que este sustrato aceptor podría producir inhibición al competir con el donador de fucosilo, sin que necesariamente tenga acción hidrolítica sobre la lactosa. Esto es importante debido a que se ha reportado que algunas α -L-fucosidasas también se han clasificado como galactosidasas por tener similitud con dominios de galactosidasas (Sela *et al.*, 2012), aunque solo algunas de ellas han demostrado tener ambas actividades catalíticas. A diferencia de la interacción entre *TmFuc* y lactosa, con *BiAfcB* no se observa una tendencia entre la afinidad por el sitio de unión y el ciclo en el que se colocó la molécula de lactosa, como puede verse en la Tabla 7. ΔG_b y K_b de docking acumulativo con *BiAfcB*, lactosa y lactulosa.

6.4.1.2 Interacción entre *BiAfcB* como apoenzima y lactulosa

Al realizar el acoplamiento molecular acumulativo con la apoenzima y lactulosa, esta se colocó dentro del sitio activo en el primer ciclo, como puede verse en la Figura 10C,

ocupando el sitio de unión de galactosa con su fracción de galactosa y con la fracción de fructosa en el sitio correspondiente a la fucosa, como puede verse en la Figura 10D. Esto podría indicar que este sustrato aceptor podría producir inhibición al competir con el donador de fucosilo. Este complejo contó con una K_b de 36.99 μM y una ΔG_b de -6.05.

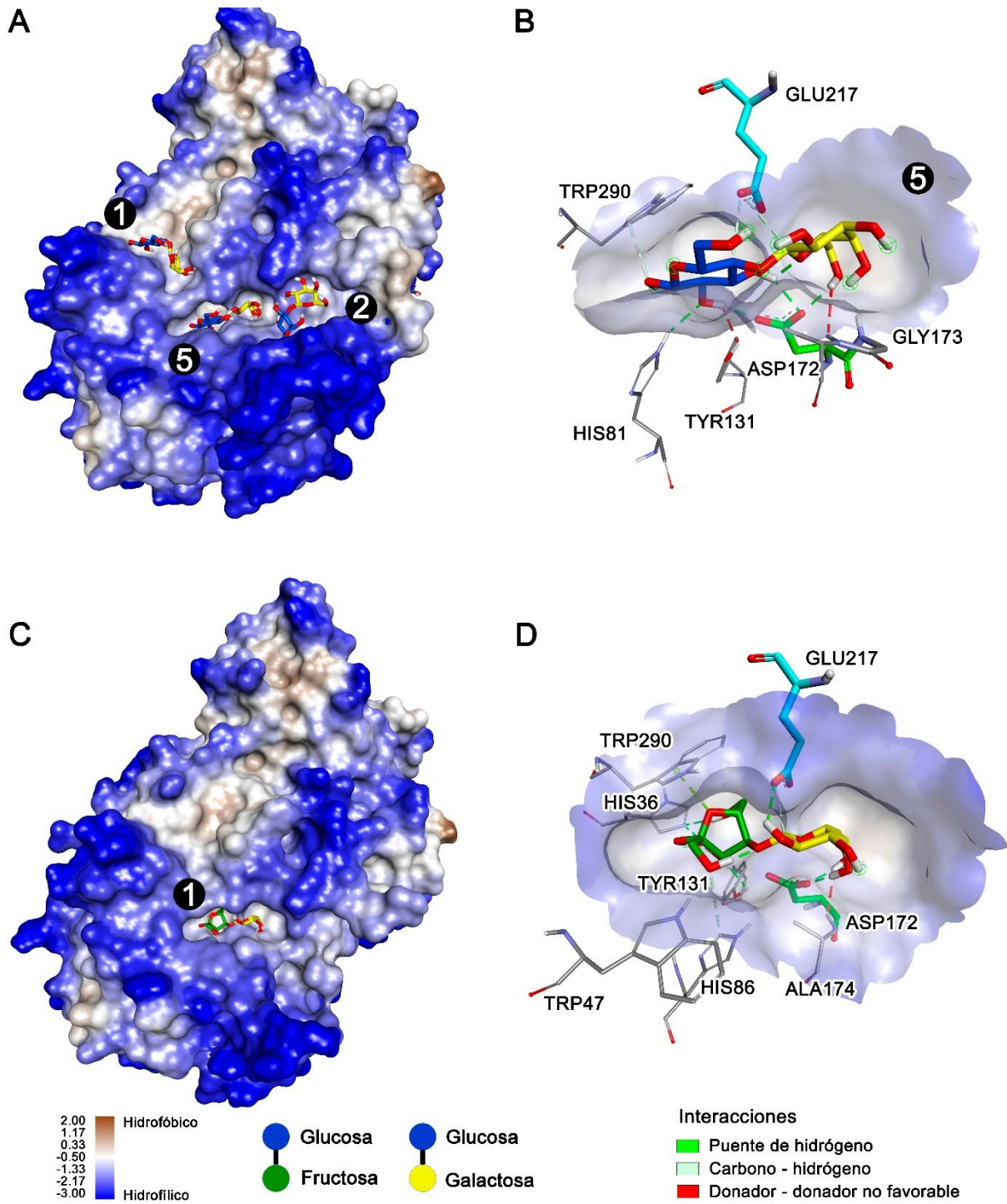


Figura 10 Docking acumulativo con BiAfcB en forma de apoenzima con lactosa y lactulosa. A: lactosa, C: lactulosa. Diagrama de interacciones entre enzima y el ligando más cercano a los aminoácidos catalíticos, B: lactosa, C: lactulosa. Los números indican el ciclo en el que se obtuvo la posición del ligando. Los números faltantes en la secuencia corresponden a moléculas de ligando que se colocaron en la parte posterior de la enzima.

Tabla 7. ΔG_b y K_b de docking acumulativo con BiAfcB, lactosa y lactulosa

Ciclo	BiAfcB - lactosa		BiAfcB - lactulosa	
	K_b (μM)	ΔG_b (kcal/mol)	K_b (μM)	ΔG_b (kcal/mol)
1	1070	-4.05	36.99	-6.05
2	65.69	-5.71	-	-
3	454.56	-4.56	-	-
4	93.12	-5.5	-	-
5	424.53	-4.6	-	-

K_b : constante de unión; ΔG_b : energía de unión

6.4.1.3 Análisis de la inhibición por sustrato aceptor

Por los resultados obtenidos en los dockings con lactosa y lactulosa, se realizó el experimento *in vitro* para comprobar si estos sustratos producían inhibición competitiva cuantificando el *p*-nitrofenol liberado sólo con el sustrato *p*NP-Fuc y en presencia de estos sustratos.

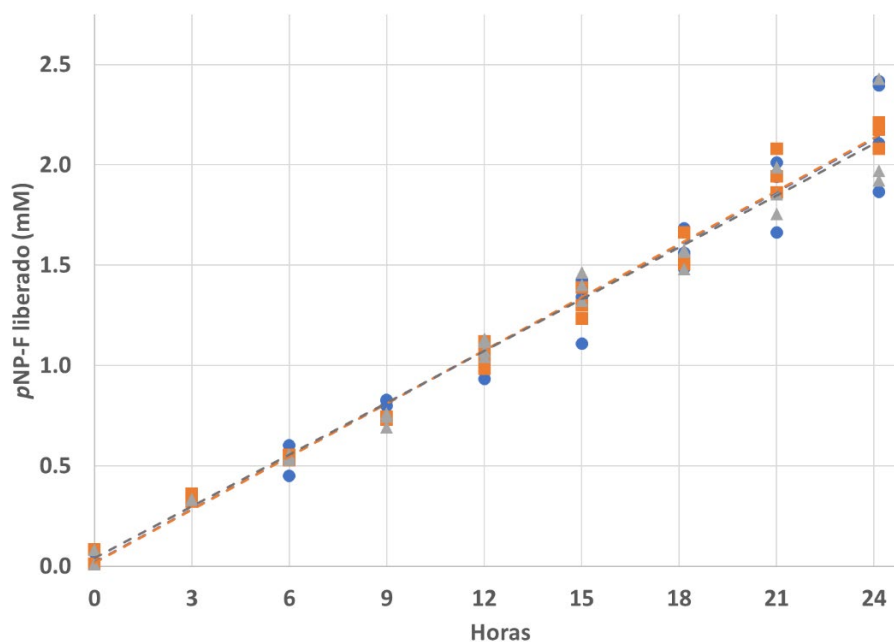


Figura 11 Liberación de *p*-nitrofenol en la reacción de hidrólisis de *p*NP-Fuc y en la reacción de transfucosilación empleando lactosa y lactulosa como sustratos aceptores. *p*NP-Fuc: círculo azul, *p*NP-Fuc y lactosa: cuadrado naranja, *p*NP-Fuc y lactulosa: triángulo gris.

Como se observa en la Figura 11 Liberación de *p*-nitrofenol en la reacción de hidrólisis de *p*NP-Fuc y en la reacción de transfucosilación empleando lactosa y lactulosa, el *p*-nitrofenol

liberado en presencia del sustrato aceptor es muy similar al que se libera cuando el único sustrato es el *p*NP-F. Asimismo al revisar la Tabla 8 se puede verificar que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre la velocidad inicial de hidrólisis del *p*NP-Fuc cuando es el único sustrato y cuando se encuentra en presencia de alguno de los sustratos aceptores de fucosilo (lactosa o lactulosa), esto sugiere que no se produce inhibición, aunque se necesitan más datos para confirmarlo con mayor sustento.

Tabla 8 Velocidad inicial de hidrólisis de *p*NP-Fuc en presencia de sustratos aceptores de fucosilo

Sustrato	$\mu\text{M}/\text{min}$
<i>p</i> NP-Fuc	1.465 ± 0.049
<i>p</i> NP-Fuc + lactosa	1.470 ± 0.030
<i>p</i> NP-Fuc + lactulosa	1.433 ± 0.041

6.4.2 Interacción entre el complejo *BiAfcB*-fucosa y sustratos aceptores de fucosilo

6.4.2.1 Interacción entre el complejo *BiAfcB*-fucosa y lactosa

En la Figura 12A se puede ver que, en el acoplamiento acumulativo con la enzima en complejo con fucosa, la lactosa se colocó frente al sitio de unión de galactosa adyacente al sitio activo en el tercer ciclo. La distancia calculada fue de 8 Å entre el CC lateral de GLU217 y el hidroxilo del C3 de la glucosa y a 10.9 Å del hidroxilo del C2 de la galactosa. Aunque aún no están a una distancia lo suficientemente cercana para registrar dichas interacciones, se registra interacción por puentes de hidrógeno entre el GLU217, el hidroxilo del C1 de la fucosa y el hidroxilo del C6 de la glucosa, siendo la última distancia de 2.7 Å. Si hubiera una aproximación más cercana la síntesis de 3 fucosil-lactosa sería posible.

De igual modo, en la Tabla 9, se observa que la ΔG_b y la K_b son similares en los tres sitios de unión. Al comparar con los datos obtenidos del docking acumulativo de *TmFuc* en complejo con fucosa (Tabla 5), se puede observar que en el ciclo en el que se coloca la lactosa frente al sitio activo, tanto la ΔG_b como la K_b son mayores a las obtenidas en el docking acumulativo de *BiAfcB* en complejo con fucosa. Esto podría indicar una probable afinidad entre *BiAfcB* y este sustrato aceptor de fucosilo durante la reacción de transfucosilación.

6.4.2.2 *Interacción entre el complejo BiAfcB-fucosa y lactulosa*

Se encontró que la lactulosa se colocó con la fracción de galactosa orientada hacia el sitio de unión de galactosa en el tercer ciclo a una distancia de 10.5 Å entre el CC de la cadena lateral del GLU217 y el C2 de la galactosa. (Figura 12C). Como se observa en la Tabla 9, la ΔG_b y la K_b obtenidas en el tercer ciclo no son tan favorables como las obtenidas en el docking con apoenzima. Esto es debido a que la fracción de galactosa no se colocó en su sitio de unión, y al contrario la distancia a la que se encontró no le permitió hacer interacción con GLU217 y la fucosa, necesitando una mayor aproximación para llevar a cabo la reacción de transfucosilación.

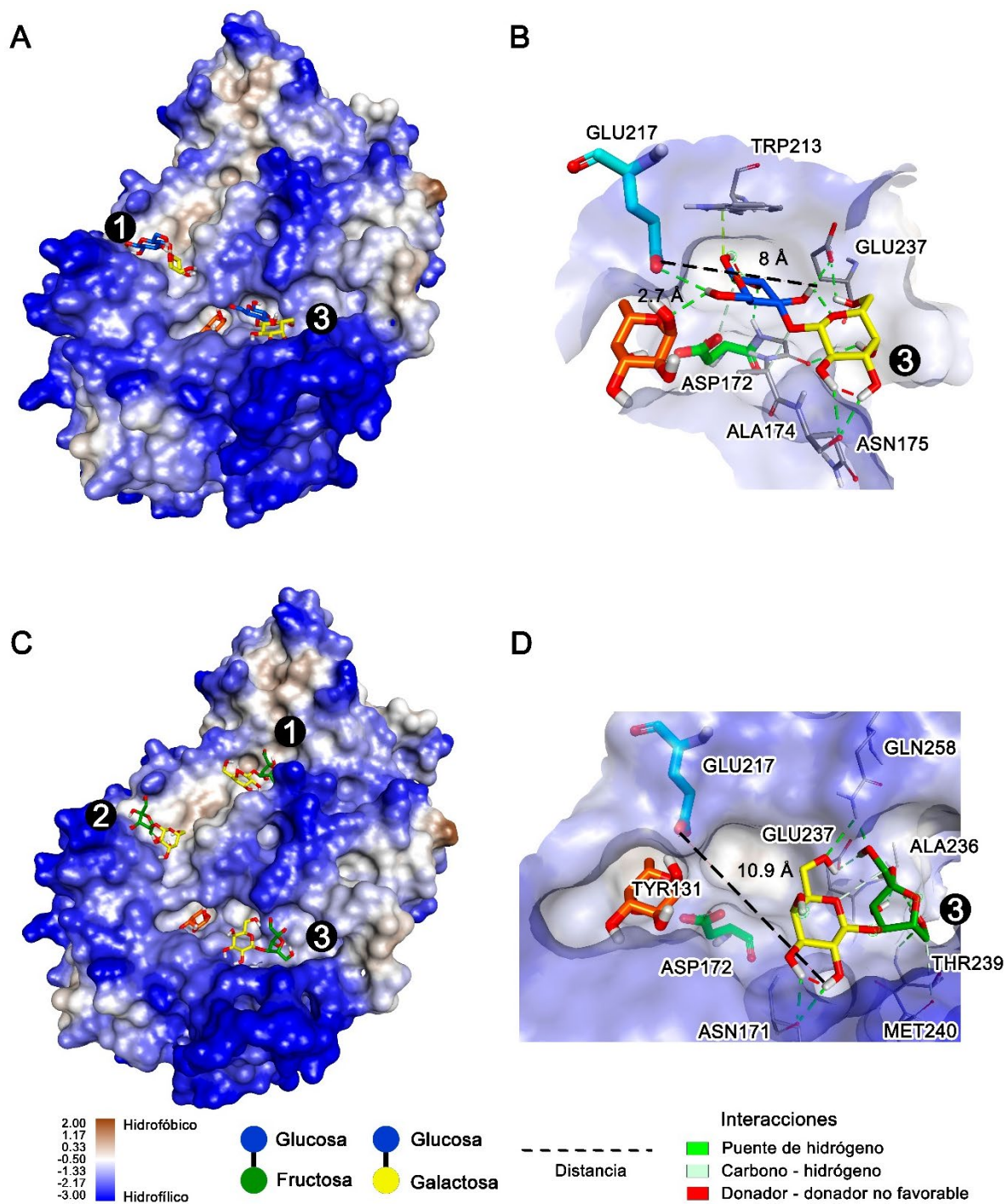


Figura 12 Docking acumulativo de lactosa y lactulosa con BiAfcB en complejo con fucosa. A: lactosa, C: lactulosa. Diagrama de interacciones entre enzima y ligando con las moléculas de lactosa más cercanas a los aminoácidos catalíticos, B: lactosa, C: lactulosa. Se indican las distancias entre átomos en color negro. Los números indican el ciclo en el que se obtuvo la posición del ligando. Los números faltantes en la secuencia corresponden a moléculas de lactosa que se colocaron en la parte posterior de la enzima.

Tabla 9. ΔG_b y K_b de docking acumulativo con *BiAfcB* en complejo con fucosa, lactosa y lactulosa

Ciclo	<i>BiAfcB</i> +fucosa - lactosa		<i>BiAfcB</i> +fucosa – lactulosa	
	K_b (μ M)	ΔG_b (kcal/mol)	K_b (μ M)	ΔG_b (kcal/mol)
1	1410	-3.89	797	-4.23
2	1200	-3.99	1898	-2.35
3	1650	-3.79	861.69	-4.18

K_b : constante de unión; ΔG_b : energía de unión

6.4.3 Acoplamiento molecular de *BiAfcB* con 2'-FL y 3-FL

El producto que generalmente se obtiene en la síntesis de OLH fucosilados cuando se emplean como sustratos *p*NP-Fuc y lactosa es el trisacárido fucosil lactosa (Tabla 2 Fucosidasas de *L. casei*, *B. longum*, *B. bifidum* y *T. maritima* utilizadas en la síntesis de OLH fucosilados.). Este trisacárido puede presentarse en forma de 2'-FL o de su isómero 3-FL, los cuales son susceptibles a la hidrólisis, por lo que pueden actuar como sustratos donadores de fucosilo. Como ha sido reportado por Sakurama *et al.* (2012), *BiAfcB* presenta baja actividad sobre *p*NP-Fuc y por su parte Sela *et al.* (2012), reportó baja actividad de esta enzima sobre *c*NP-fucosa (cloro-nitrofenil fucopiranosido). Sin embargo, en ambas investigaciones se reportó una buena actividad sobre 3-FL. Saumonneau *et al.* (2016) utilizó 3-FL como sustrato donador de fucosilo en conjunto con LNT como sustrato aceptor para sintetizar LNFP-II. Debido a que son productos de la reacción de transfucosilación propensos a la hidrólisis, así como poseer capacidad para ser usados como sustratos para la síntesis de OLH fucosilados más ramificados, se analizó la interacción de *BiAfcB* con 2'-FL y 3-FL mediante acoplamiento molecular.

6.4.3.1 Acoplamiento molecular de *BiAfcB* y 2'-FL

Como se muestra en la Figura 13A en el docking entre *BiAfcB* y 2'-FL, la porción de fucosa de la molécula se ubicó en el subsitio -1 dentro de la cavidad del sitio activo. Mientras tanto en la cavidad adyacente correspondiente al sitio de unión de galactosa se colocó la glucosa, proyectando hacia afuera la unidad de galactosa y formando interacciones principalmente con la fucosa. Este complejo contó con una K_b de 1.74 mM y una ΔG_b de -3.76 kcal/mol.

6.4.3.2 Acoplamiento molecular de *BiAfcB* y 3-FL

Como se muestra en la Figura 13B, en el docking entre *BiAfcB* y 3-FL, el ligando se colocó en ambas cavidades del sitio activo en una pose similar a la de la 2'-FL. Sin embargo, en este caso la glucosa quedó proyectada hacia afuera y la galactosa ocupó el sitio de unión

de galactosa, estableciéndose interacciones entre ambos monosacáridos y las dos cavidades del sitio activo, formando un complejo con una K_b de 78.15 μM y una ΔG_b de -5.6 kcal/mol.

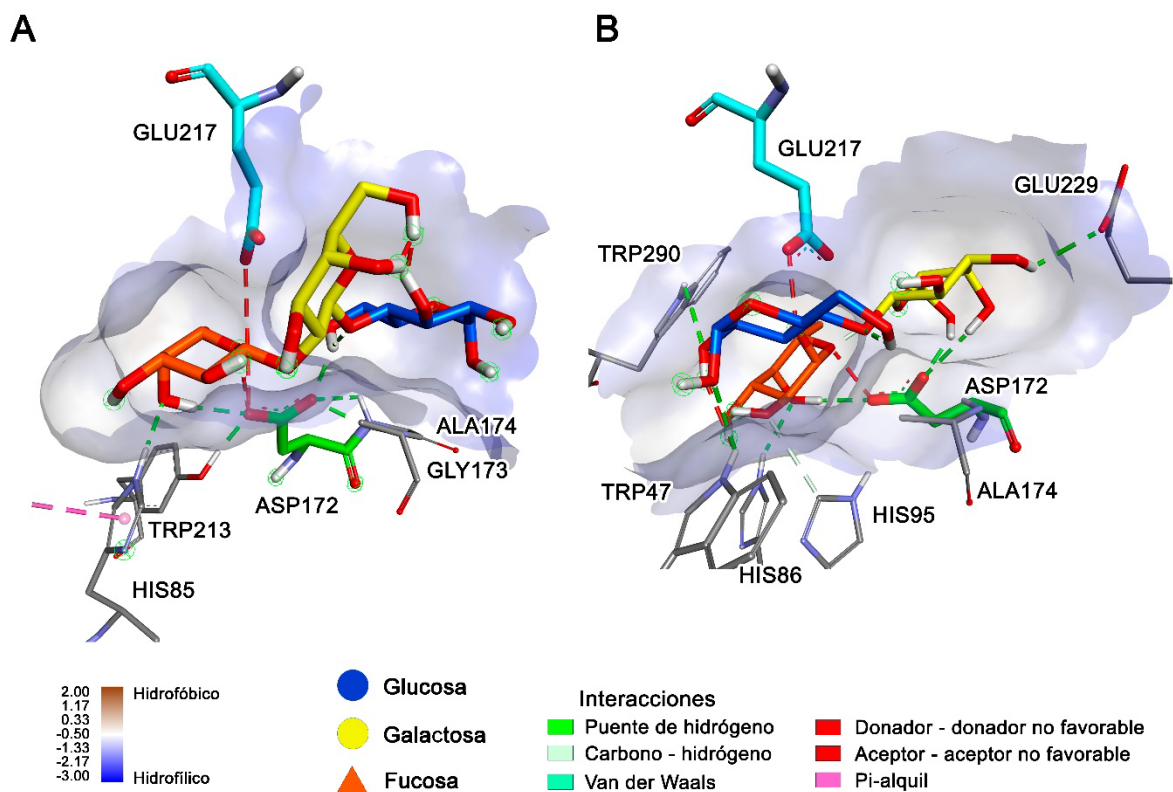


Figura 13 Acoplamiento molecular de BiAfcB con 2'-FL y 3-FL. A: 2'-FL; B: 3-FL.

BiAfcB formó interacciones con mayor estabilidad y mayor afinidad con 3-FL que con 2'-FL, demostrando mediante métodos *in silico* una mayor actividad de esta enzima sobre 3-FL reportada por Sela *et al.* (2012), lo que además produciría una mayor actividad hidrolítica sobre este sustrato en la reacción de transfucosilación, afectando el rendimiento. El sitio de unión de galactosa es importante para la interacción entre la enzima y el sustrato, porque a diferencia de 2'-FL y *pNP-Fuc*, tanto lactosa como lactulosa y 3-FL ocuparon por completo dicha cavidad adyacente al sitio activo con una molécula de galactosa y establecieron una interacción más estable, con valores de K_b y ΔG_b menores, como se observa en la Tabla 10.

Tabla 10 ΔG_b y K_b de docking con *BiAfcB*, sustratos y productos de la síntesis de OLH fucosilados

Sustrato	K_b (μM)	ΔG_b (kcal/mol)
<i>pNP-FUC</i>	1420	-3.88
<i>Lactosa</i>	424.53	-4.6
<i>Lactulosa</i>	36.99	-6.05
<i>2'-FL</i>	1740	-3.76
<i>3-FL</i>	78.15	-5.6

K_b : constante de unión; ΔG_b : energía de unión

6.5 SÍNTESIS DE OLIGOSACÁRIDOS FUCOSILADOS CON EXTRACTO ENZIMÁTICO DE *B. LONGUM*

Tras simular exitosamente la reacción de transfucosilación con *TmFuc* mediante acoplamiento molecular, al analizar la interacción tanto con el sustrato donador como con el sustrato aceptor cuando la enzima se encuentra en complejo con fucosa, también se realizó este análisis con *BiAfcB*, ya que se ha reportado que *TmFuc* puede realizar la síntesis de oligosacáridos fucosilados y cataliza la reacción de forma similar a *BiAfcB* al pertenecer a la misma familia. En este caso, se consideraron dos moléculas más para actuar como sustratos donadores, *2'-FL* y *3-FL*, mismas que pueden ser productos cuando se lleva a cabo la reacción utilizando *pNP-Fuc* como sustrato donador y lactosa como sustrato aceptor, encontrando que el sustrato donador más adecuado es la *3-FL*, coincidiendo con los reportes de la especificidad de esta enzima hacia sustratos α -1,3 aunque teóricamente no hay impedimento para utilizar *pNP-Fuc* como sustrato donador, así como advirtiendo la posibilidad de que los productos de la reacción sean hidrolizados. Además se estudió la interacción de *BiAfcB* con dos posibles sustratos aceptores, lactosa y lactulosa, obteniendo como resultado que estas dos moléculas pueden aproximarse más rápido al sitio activo cuando este está vacío respecto a la aproximación de la lactosa con *TmFuc*, y que cuando *BiAfcB* está en complejo con fucosa, también pueden aproximarse al sitio activo.

Por lo anterior, para realizar la síntesis de oligosacáridos fucosilados se decidió utilizar un extracto enzimático de *B. longum* que demostró tener actividad sobre *pNP-Fuc*, y se eligió esta molécula como sustrato donador porque es más accesible que *2'-FL* y *3-FL*, además de que no se ha reportado aún la síntesis de estos oligosacáridos fucosilados utilizando este donador en conjunto con una fucosidasa de bifidobacteria. También se seleccionaron

cuatro sustratos aceptores, lactosa y lactulosa, por haber demostrado en el acoplamiento molecular que tienen la capacidad de aproximarse al sitio activo, y galactosa y fructosa, porque aunque el objetivo es sintetizar oligosacáridos como los de la leche humana, es posible que la transferencia a otras moléculas pueda ser más exitosa, y el hecho de que estas moléculas cuenten con fucosa podría dotarlas de actividad biológica, porque la fucosa interviene en muchas funciones fisiológicas, así como en la selectividad en el crecimiento de algunos microorganismos cuando actúan como prebióticos. Como el uso de extractos enzimáticos implica algunos riesgos respecto al uso de enzimas purificadas como la interferencia de otras enzimas, se colectó el producto obtenido y se realizó una hidrólisis ácida para verificar que efectivamente se hubiera transferido la molécula de fucosa al aceptor por parte de la fucosidasa y que la síntesis del producto no fue realizada por otra enzima.

Se realizó la síntesis de oligosacáridos fucosilados utilizando la metodología descrita en la sección 5.2.7. Al realizar la reacción de transfucosilación empleando como sustrato donador *p*NP-Fuc y como sustrato aceptor la lactosa, se consiguió sintetizar un producto con un tiempo de retención de 16.05 min, una concentración de 2.4 μ M (Figura 14A) y un rendimiento de 0.046% respecto a la concentración del sustrato donador. Este producto puede tratarse de fucosil lactosa, como reportaron Guzmán Rodríguez *et al.* (2018b) tras identificar mediante espectrometría de masas al producto que obtuvieron después de realizar la reacción con estos mismos sustratos y empleando la fucosidasa de *TmFuc*. Mientras tanto, al emplear lactulosa como sustrato aceptor se sintetizó un producto con tiempo de retención de 16.79 min, una concentración de 7.73 μ M (Figura 14B) y un rendimiento de 0.16%. Estos tiempos de retención son similares al tiempo de retención de la rafinosa, (17 min) lo que sugiere que los productos que se observan en los cromatogramas se tratan de trisacáridos. Para la reacción utilizando lactosa como sustrato aceptor posiblemente puede ser 2'-FL o 3-FL, mientras que al utilizar lactulosa como aceptor, el producto podría ser lactulosa fucosilada, por lo que los tiempos de retención de los productos de ambas reacciones son ligeramente diferentes.

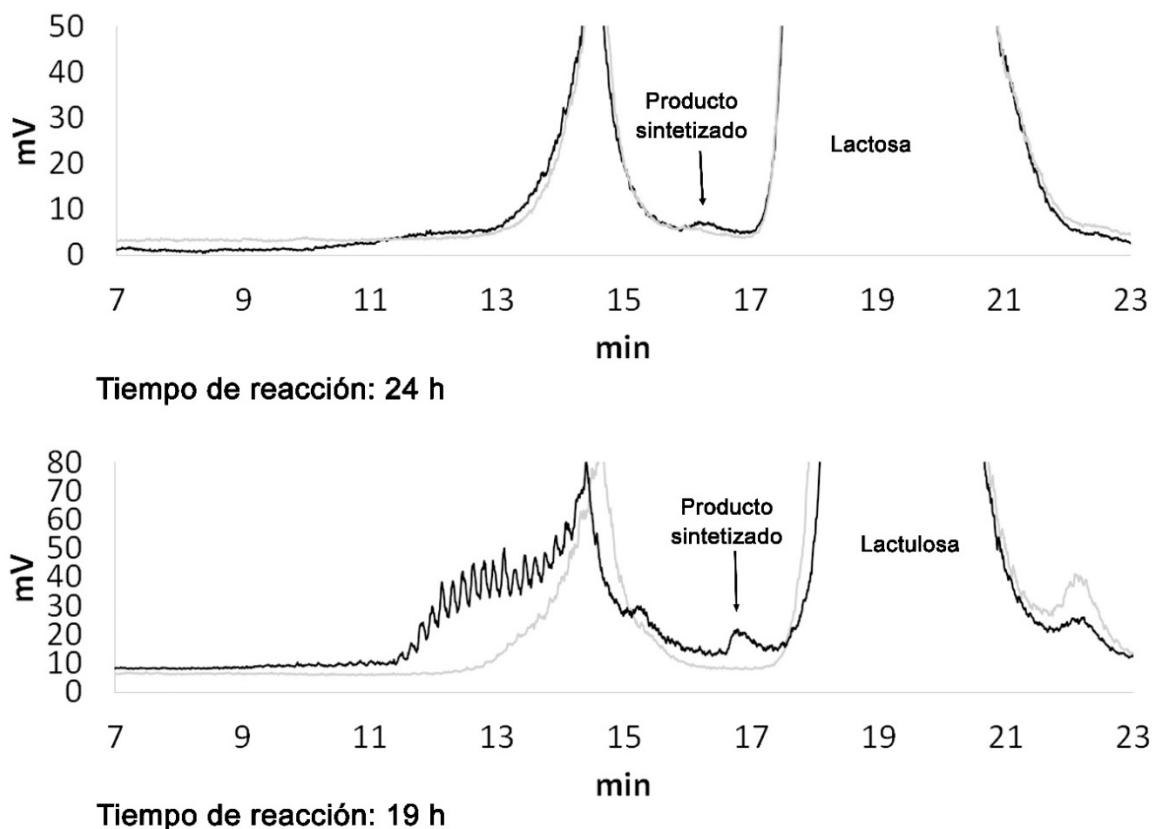
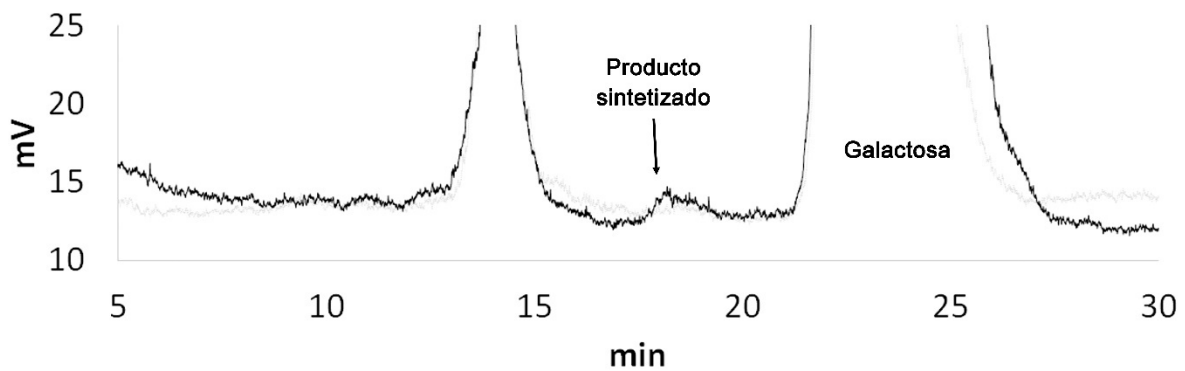
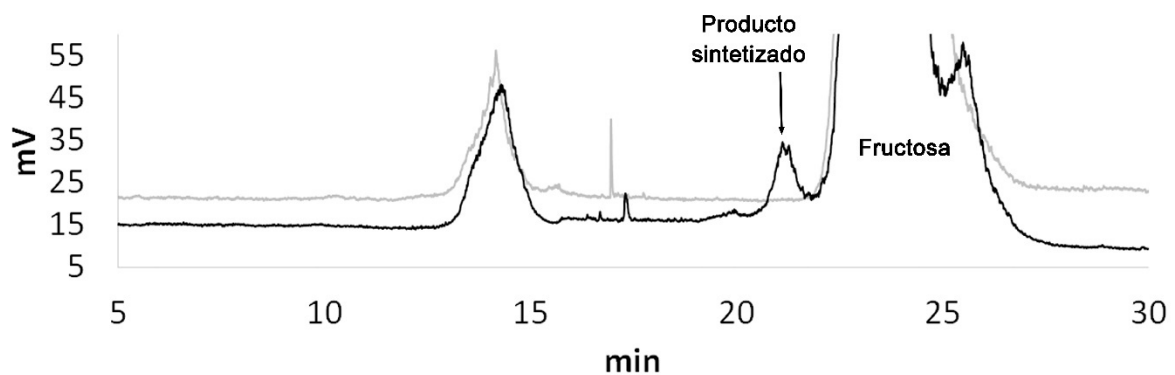


Figura 14 Cromatograma de la reacción de transfucosilación empleando disacáridos como sustratos aceptores. A: Reacción con pNP-Fuc y lactosa: B: Reacción con pNP-Fuc y lactulosa. El cromatograma en color gris corresponde al tiempo cero.

Por otra parte, al utilizar galactosa y fructosa como sustratos aceptores, se sintetizaron productos que tienen un tiempo de retención similar al de la lactosa (18 min), por lo que podría tratarse de disacáridos. En la reacción utilizando galactosa se obtuvo un producto con un tiempo de retención de 19.17 min (Figura 15A), una concentración de 12.8 μM y un rendimiento de 0.32%, mientras que al utilizar fructosa como aceptor, se obtuvo un producto con un tiempo de retención de 21.12 min (Figura 15B), una concentración de 101.8 μM y un rendimiento de 2.4%. Zhou *et al.* (2022) sintetizaron disacáridos de fucosa-galactosa y fucosa-fructosa empleando una fucosidasa de *Flavobacterium algicola*, así como una concentración de pNP-Fuc de 10 mM, así como Benešová *et al.* (2015) también sintetizó estos compuestos con una fucosidasa de *Paenibacillus thiaminolyticus*, explorando la capacidad de estas fucosidasas para transferir la fucosa a otras moléculas.



Tiempo de reacción: 13.3 h



Tiempo de reacción: 15 h

Figura 15 Cromatograma de la reacción de transfucosilación empleando monosacáridos como sustratos aceptores. A: Reacción con pNP-Fuc y galactosa: B: Reacción con pNP-Fuc y fructosa. El cromatograma en color gris corresponde al tiempo cero.

Cuando se utilizaron los disacáridos lactosa y lactulosa como sustratos aceptores se obtuvo la menor cantidad de producto acumulado, especialmente cuando el aceptor fue la lactosa, Figura 16A). En la figura se observa un producto sintetizado a las 6 h de reacción y acumulándose entre las 18 y las 24 h. Mientras tanto, cuando se utilizó lactulosa se logró sintetizar más producto (Figura 16B) el cual se acumuló entre las 18 y las 24 h.

Por otra lado, cuando se utilizaron monosacáridos como sustratos aceptores se obtuvo una mayor síntesis de producto. Además, la síntesis de producto se consiguió antes que en el caso de los disacáridos. De hecho, cuando se utilizó galactosa, el producto se detectó entre las 13.3 y las 18 h (Figura 16C) teniendo su máxima acumulación a las 13.3 h. En otro sentido, utilizando fructosa como sustrato aceptor se consiguió la mayor síntesis de producto. Se obtuvo una máxima concentración con un orden de magnitud superior a la obtenida con los otros tres sustratos donadores. Adicionalmente, se detectó producto

durante más tiempo desde las primeras 3 h de la reacción hasta las 24 h y con una acumulación máxima a las 15 h (Figura 16D).

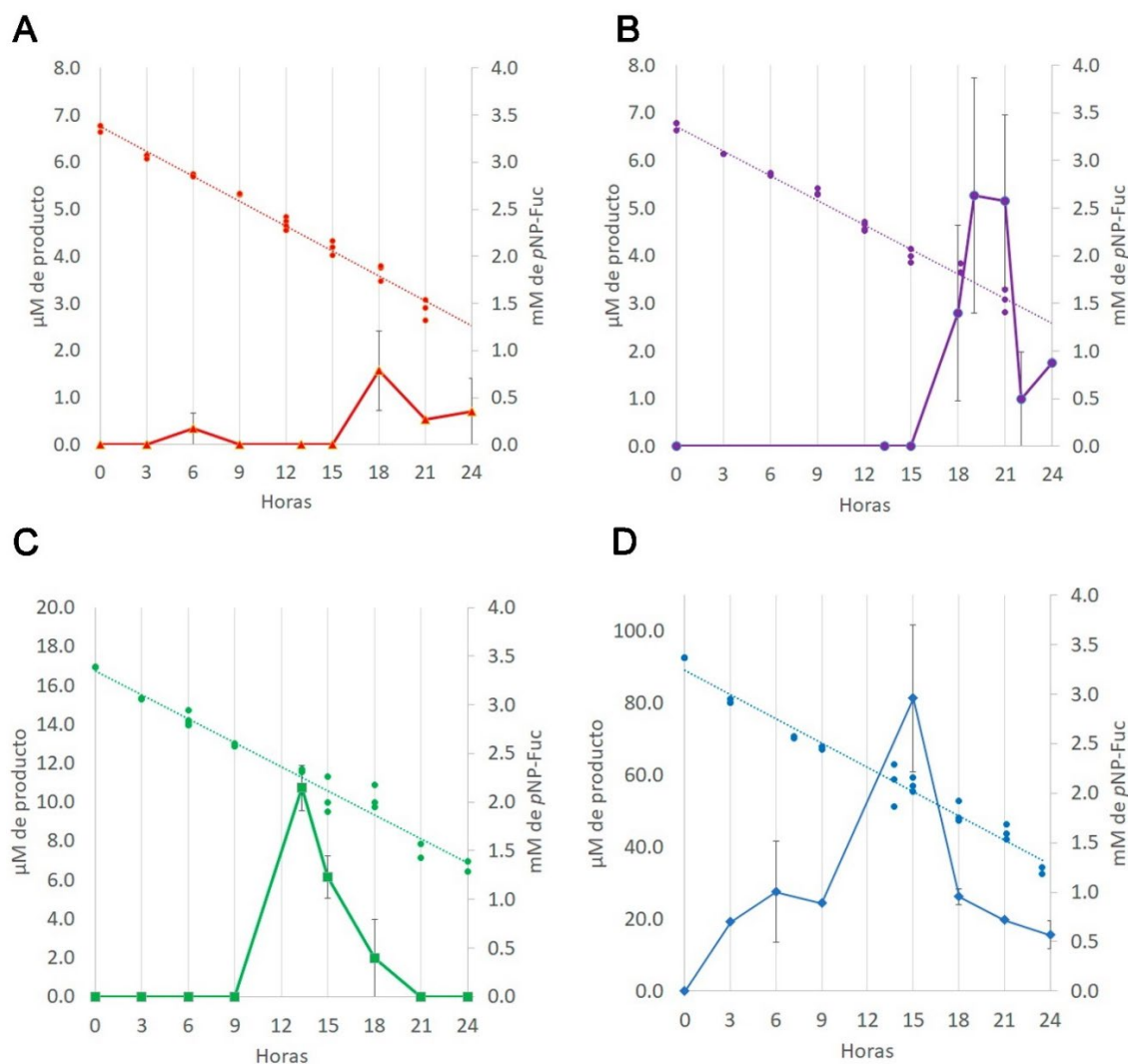


Figura 16 Cinética de síntesis de oligosacáridos fucosilados empleando pNP-Fuc como sustrato donador y diferentes sustratos aceptores. A: Lactosa; B: Lactulosa; C: Galactosa y D: Fructosa. La línea sólida corresponde al producto sintetizado y utiliza la escala de la izquierda, la línea punteada corresponde al pNP-Fuc disponible y su escala es la del lado derecho.

La mayor síntesis de producto cuando se utilizó fructosa como sustrato acepto, coincide con el estudio de mapeo funcional de α -L-fucosidasas realizado por Perna *et al.* (2023). En este estudio los autores reportaron que la mayoría de las α -L-fucosidasas de la subfamilia GH29B son claramente activas en sustratos que cuentan con una unidad de galactosa ramificada en su estructura. Este es el caso de la 3-FL y el antígeno de Lewis, así como de los compuestos de los estudios de acoplamiento molecular descritos anteriormente (Tabla

4 y Tabla 10), en los cuales se encontró que la enzima *BiAfcB* tiene mayor afinidad con la 3-FL, por lo que los productos obtenidos utilizando disacáridos como sustratos aceptores son más propensos a ser hidrolizados por la enzima al contar con una unidad de galactosa ramificada.

En el caso de los disacáridos sintetizados, se encontró que al transferirse la fucosa a la galactosa lo hace de una forma similar a la estructura de la 2'-FL, la cual mostró una menor afinidad con la enzima en el acoplamiento molecular realizado anteriormente (Tabla 10) respecto a 3-FL, lo que además se da cuando se utilizan monosacáridos como sustratos aceptores. Respecto a la mayor cantidad de producto presente en tiempos de reacción superiores a 18 h cuando se utilizan disacáridos como sustratos aceptores, puede deberse a que en la reacción de transfucosilación, la fucosa puede ser transferida a cualquiera de los componentes de la molécula formando isómeros, como se describe en la sección 6.3.2. Además de que la formación de isómeros está influenciada por las condiciones de reacción como demostraron Shi *et al.* (2023), al sintetizar oligosacáridos fucosilados con una fucosidasa de *Pedobacter sp.* perteneciente a la familia GH29, utilizando *p*NP-Fuc como donador y lactosa como aceptor, donde sintetizaron principalmente 2'-FL cuando realizaron la reacción a 40 °C, mientras que a 38 °C obtuvieron además otros productos y cuando realizaron la reacción a 35 °C no obtuvieron algún producto que dominara sobre los demás. Estos isómeros tienen diferente afinidad con la enzima, permitiendo que alguno de ellos se acumulen en mayor cantidad al ser menos susceptibles a la hidrólisis. En el caso de los disacáridos sintetizados cuando se utiliza un monosacárido como aceptor, estos se detectan antes que los productos en los que se transfiere fucosa hacia disacáridos aceptores y comienza a disminuir su concentración cuando se ha hidrolizado aproximadamente una tercera parte del sustrato donador, por lo que podrían ser hidrolizados al haber menos sustrato donador disponible.

Además, una vez colectado el producto sintetizado en la reacción de transfucosilación con *p*NP-Fuc y fructosa, se liofilizó. El producto colectado y rehidratado a un menor volumen se observa en la Figura 17 (columna RNO). La señal del producto sintetizado coincide con el tiempo de retención de la señal de lactosa (9.4 min), lo cual indica que se trata de un disacárido. Al calcular la concentración se determinó que esta fue de 91 µM. Esta colecta fue sometida a hidrólisis ácida durante 4 h y se produjo la hidrólisis parcial del producto, el cual se mantuvo con una concentración de 33 µM mientras que tras la hidrólisis se liberaron

31 μM de fructosa y 36 μM de fucosa, con una proporción equimolar de fructosa y fucosa de 0.9:1, indicando que con el extracto enzimático de *B. longum* fue posible transferir fucosa del pNP-Fuc hacia la fructosa, obteniendo el disacárido fucosil-fructosa.

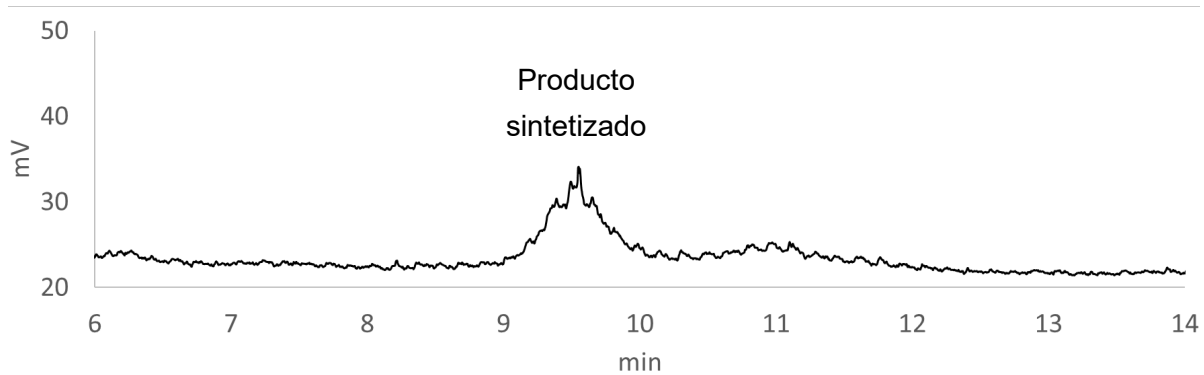


Figura 17 Producto colectado de la reacción de transfucosilación entre pNP-Fuc y fructosa.

7. Conclusiones

En la presente investigación, se comprobó que las diferencias en las secuencias de aminoácidos entre las fucosidasas de las subfamilias GH29A y GH29B ejercen diferencias estructurales que pueden influir en la interacción que tienen hacia el sustrato donador de fucosilo, por lo que las fucosidasas GH29A muestran una mayor afinidad hacia *p*NP-Fuc que las fucosidasas GH29B.

Además, se demostró mediante acoplamiento molecular que existe una interacción entre *Tm*Fuc y la lactosa en sitios de unión favorables distintos al sitio activo, y es uno de los motivos que puede explicar por qué incrementa el rendimiento de la reacción de transfucosilación al aumentar la concentración del sustrato aceptor.

Adicionalmente se comprobó que al utilizar lactosa y lactulosa como sustratos aceptores de fucosilo en la reacción de transfucosilación catalizada por *Bi*AfcB no se produce inhibición competitiva, aunque en el análisis *in silico* muestran mayor afinidad con el sitio activo de la enzima que el sustrato donador *p*NP-Fuc.

Asimismo, en este trabajo se evidenció que algunos de los productos de la reacción de transfucosilación catalizada por *Bi*AfcB son más propensos a sufrir hidrólisis, particularmente en el caso de 3-FL, gracias a su mayor afinidad con el sitio activo.

De forma complementaria, tras comprobar mediante métodos *in silico* que *p*NP-Fuc puede actuar como sustrato donador en la síntesis de oligosacáridos fucosilados catalizada por *Bi*AfcB y además que los sustratos aceptores lactosa y lactulosa pueden aproximarse al sitio activo, se procedió a realizar la síntesis *in vitro* de oligosacáridos fucosilados empleando un extracto enzimático de *B. longum*, logrando sintetizar productos cuando se utilizaron lactosa, lactulosa, galactosa y fructosa como aceptores. Obteniendo un rendimiento de 0.046%, 0.16%, 0.32% y 2.4% respectivamente, confirmando la transferencia de fucosa a fructosa mediante hidrólisis ácida, obteniendo una proporción equimolar de estos monosacáridos.

Finalmente, se demostró mediante métodos *in vitro* e *in silico* que la acumulación de producto en la reacción de transfucosilación catalizada por *Bi*AfcB está influenciada por la presencia de galactosa en la molécula sintetizada.

8. Perspectivas

- Probar la actividad biológica del disacárido de fucosa-fructosa.
- Analizar el disacárido de fucosa-fructosa mediante resonancia magnética nuclear.
- Identificar la o las fucosidasas presentes en el extracto enzimático de *B. longum*.
- Realizar la reacción de síntesis de oligosacáridos fucosilados con otros sustratos aceptores como *N*-acetil glucosamina.
- Realizar una dinámica molecular con los complejos *BiAfcB*-fucosa-lactosa y *BiAfcB*-fucosa-lactulosa obtenidos para evaluar su estabilidad a lo largo del tiempo.
- Realizar un acoplamiento molecular con *BiAfcB* y un oligosacárido de fucoideano para analizar su viabilidad como sustrato donador de fucosilo.

9. Bibliografía

- Agoston, K., Hederos, M. J., Bajza, I., & Dekany, G. (2019). Kilogram scale chemical synthesis of 2'-fucosyllactose. *Carbohydrate Research*, 476, 71-77.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.03.006>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Arboleya, S., Bottacini, F., O'Connell-Motherway, M., Ryan, C. A., Ross, R. P., van Sinderen, D., & Stanton, C. (2018). Gene-trait matching across the *Bifidobacterium longum* pan-genome reveals considerable diversity in carbohydrate catabolism among human infant strains. *BMC Genomics*, 19(1), 33.
<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4388-9>
- Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J., & Kitaoka, M. (2011). Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated *Bifidobacteria*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 34583-34592.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248138>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>

- Benešová, E., Lipovová, P., Krejzová, J., Kovařová, T., Buchtová, P., Spiwok, V., & Králová, B. (2015). Alpha-L-Fucosidase isoenzyme iso2 from *Paenibacillus thiaminolyticus*. *BMC Biotechnology*, *15*(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0160-x>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Biavati, B., & Mattarelli, P. (2006). The family Bifidobacteriaceae. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (pp. 322-382). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_17
- Biel-Nielsen, T. L., Li, K., Sørensen, S. O., Sejberg, J. J. P., Meyer, A. S., & Holck, J. (2022). Utilization of industrial citrus pectin side streams for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, *519*, 108627. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108627>
- Binder, C., Baumgartner-Parzer, S., Gard, L.-I., Berger, A., & Thajer, A. (2023). Maternal diet influences human milk protein concentration and adipose tissue marker. *Nutrients*, *15*(2), 433. <https://doi.org/10.3390/nu15020433>
- Bitencourt-Ferreira, G., & de Azevedo, W. F. (2019). Molecular docking simulations with ArgusLab. En W. F. de Azevedo (Ed.), *Docking Screens for Drug Discovery* (Vol. 2053, pp. 203-220). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_13
- Blanco, G., Ruiz, L., Tamés, H., Ruas-Madiedo, P., Fdez-Riverola, F., Sánchez, B., Lourenço, A., & Margolles, A. (2020). Revisiting the metabolic capabilities of *Bifidobacterium longum* subsp. *Longum* and *Bifidobacterium longum* subsp.

- Infantis from a glycoside hydrolase perspective. *Microorganisms*, 8(5), 723.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050723>
- Bode, L. (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development*, 91(11), 619-622. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
- Bode, L., Contractor, N., Barile, D., Pohl, N., Prudden, A. R., Boons, G.-J., Jin, Y.-S., & Jennewein, S. (2016). Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: Challenges and opportunities for research and application. *Nutrition Reviews*, 74(10), 635-644. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw025>
- Bottacini, F., Ventura, M., Sinderen, D. van, & Motherway, M. O. (2014). Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. *Microbial Cell Factories*, 13(S1), S4.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S4>
- Breastfeeding*. (s. f.). Recuperado 26 de marzo de 2023, de <https://www.who.int/health-topics/breastfeeding>
- Brunser Tesarschü, O. (2019). Hidratos de carbono complejos en la leche materna: Los oligosacáridos (Parte 1). *Revista chilena de nutrición*, 46(5), 626-632.
<https://doi.org/10.4067/S0717-75182019000500626>
- Champion, E., Vogel, A., Bartsch, S., & Dekany, G. (2016). *Mutated fucosidase* (World Intellectual Property Organization Patent WO2016063261A1).
<https://patents.google.com/patent/WO2016063261A1/en>
- Cheng, L., Akkerman, R., Kong, C., Walvoort, M. T. C., & de Vos, P. (2021). More than sugar in the milk: Human milk oligosaccharides as essential bioactive molecules in breast milk and current insight in beneficial effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), 1184-1200.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754756>

- Cimmino, F., Catapano, A., Petrella, L., Villano, I., Tudisco, R., & Cavaliere, G. (2023). Role of milk micronutrients in human health. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28(2), 41. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2802041>
- Curiel, J. A., Peirotén, Á., Landete, J. M., Ruiz de la Bastida, A., Langa, S., & Arqués, J. L. (2021). Architecture insight of Bifidobacterial α -L-Fucosidases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8462. <https://doi.org/10.3390/ijms22168462>
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)
- Deng, J., Gu, L., Chen, T., Huang, H., Yin, X., Lv, X., Liu, Y., Li, N., Liu, Z., Li, J., Du, G., & Liu, L. (2019). Engineering the substrate transport and cofactor regeneration systems for enhancing 2'-Fucosyllactose synthesis in *Bacillus subtilis*. *ACS Synthetic Biology*, 8(10), 2418-2427. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00314>
- Discovery Studio (Versión 2021). (s. f.). [Software]. BIOVIA, Dassault Systèmes.
- Enam, F., & Mansell, T. J. (2019). Prebiotics: Tools to manipulate the gut microbiome and metabolome. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02203-4>
- Engels, L., & Elling, L. (2014). Wbgl: A novel bacterial α 1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Glycobiology*, 24(2), 170-178. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt096>
- Erney, R. M., Malone, W. T., Skelding, M. B., Marcon, A. A., Kleman-Leyer, K. M., O'Ryan, M. L., Ruiz-Palacios, G., Hilty, M. D., Pickering, L. K., & Prieto, P. A. (2000). Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(2), 181.
- Escamilla-Lozano, Y., Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Synthesis

- of fucosyl-oligosaccharides using α -L-Fucosidase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Molecules*, 24(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules24132402>
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83-89. <https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Fu, J., Guo, Q., Feng, Y., Cheng, P., & Wu, A. (2022). Dual role of fucosidase in cancers and its clinical potential. *Journal of Cancer*, 13(10), 3121-3132. <https://doi.org/10.7150/jca.75840>
- George, A. D., Gay, M. C. L., Wlodek, M. E., Murray, K., & Geddes, D. T. (2021). The fatty acid species and quantity consumed by the breastfed infant are important for growth and development. *Nutrients*, 13(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/nu13114183>
- GRAS Notices. (s. f.). Recuperado 26 de septiembre de 2021, de <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>
- Gromiha, M. M., Nagarajan, R., & Selvaraj, S. (2019). Protein structural bioinformatics: An overview. En *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 445-459). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20278-1>
- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018a). Improvement of the transfucosylation activity of α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* for the synthesis of fucosylated oligosaccharides in the presence of calcium and sodium. *Extremophiles*, 22(6), 889-894. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1045-4>

- Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018b). Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by α -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(3), 681-691.
<https://doi.org/10.1007/s12010-018-2771-x>
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17.
<https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
- Heinze, S., Mechelke, M., Kornberger, P., Liebl, W., Schwarz, W. H., & Zverlov, V. V. (2017). Identification of endoxylanase XynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. *Scientific Reports*, 7, 11178.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11598-y>
- Hemrissat, B., & Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 316(2), 695-696.
<https://doi.org/10.1042/bj3160695>
- Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637-644.
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80072-3)
- Hollands, K., Baron, C. M., Gibson, K. J., Kelly, K. J., Krasley, E. A., Laffend, L. A., Lauchli, R. M., Maggio-Hall, L. A., Nelson, M. J., Prasad, J. C., Ren, Y., Rice, B. A., Rice, G. H., & Rothman, S. C. (2019). Engineering two species of yeast as cell factories for 2'-fucosyllactose. *Metabolic Engineering*, 52, 232-242.
<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.12.005>

- Huang, Y.-T., Su, Y.-C., Wu, H.-R., Huang, H.-H., Lin, E. C., Tsai, T.-W., Tseng, H.-W., Fang, J.-L., & Yu, C.-C. (2021). Sulfo-fluorous agging strategy for site-selective enzymatic glycosylation of para-human milk oligosaccharides. *ACS Catalysis*, *11*(5), 2631-2643. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c04934>
- Jiménez-Pérez, C., Guzmán-Rodríguez, F., Cruz-Guerrero, A. E., & Alatorre-Santamaría, S. (2023). The dual role of fucosidases: Tool or target. *Biologia*, *78*(7), 1773-1788. <https://doi.org/10.1007/s11756-023-01351-4>
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2015). Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutrition Reviews*, *73*(7), 426-437. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu016>
- Karbasi, S., Mohamadian, M., Naseri, M., Yahya Hanafi-Bojd, M., Khorasanchi, Z., Morovatdar, N., Zarban, A., Bahrami, A., & Ferns, G. A. (2023). The association of maternal food quality score (FQS) with breast milk nutrient content and antioxidant content of infant urine: A cross-sectional study. *BMC Pregnancy and Childbirth*, *23*(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12884-023-05400-3>
- Klontz, E. H., Li, C., Kihn, K., Fields, J. K., Beckett, D., Snyder, G. A., Wintrobe, P. L., Deredge, D., Wang, L.-X., & Sundberg, E. J. (2020). Structure and dynamics of an α -fucosidase reveal a mechanism for highly efficient IgG transfucosylation. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20044-z>
- Koval'ová, T., Koval', T., Stránský, J., Kolenko, P., Dušková, J., Švecová, L., Vodičková, P., Spiwok, V., Benešová, E., Lipovová, P., & Dohnálek, J. (2022). The first structure–function study of GH151 α -L-fucosidase uncovers new oligomerization pattern, active site complementation, and selective substrate specificity. *The FEBS Journal*, *289*(16), 4998-5020. <https://doi.org/10.1111/febs.16387>

- Lagström, H., Rautava, S., Ollila, H., Kaljonen, A., Turta, O., Mäkelä, J., Yonemitsu, C., Gupta, J., & Bode, L. (2020). Associations between human milk oligosaccharides and growth in infancy and early childhood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *111*(4), 769-778. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa010>
- Lee, J. M., Oh, S. Y., Johnston, T. V., Ku, S., & Ji, G. E. (2019). Biocatalysis of fucodian in *Undaria pinnatifida* sporophyll using *Bifidobacterium longum* RD47 for production of prebiotic fucosylated oligosaccharide. *Marine Drugs*, *17*(2), 117. <https://doi.org/10.3390/md17020117>
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. (2021). SMART: Recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D458-D460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
- Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulff, L., Gottfredsen, C. H., Mikkelsen, M. D., & Mikkelsen, J. D. (2016). Novel α -L-Fucosidases from a soil metagenome for production of fucosylated human milk oligosaccharides. *PLOS ONE*, *11*(1), e0147438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147438>
- Li, C., Wu, M., Gao, X., Zhu, Z., Li, Y., Lu, F., & Qin, H.-M. (2020). Efficient biosynthesis of 2'-fucosyllactose using an in vitro multienzyme cascade. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(39), 10763-10771. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04221>
- Martínez-Rosell, G., Giorgino, T., & De Fabritiis, G. (2017). PlayMolecule ProteinPrepare: A web application for protein preparation for molecular dynamics simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *57*(7), 1511-1516. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00190>
- McCarter, J. D., & Stephen Withers, G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, *4*(6), 885-892. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90271-2](https://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90271-2)

- McGuire, M. K., Meehan, C. L., McGuire, M. A., Williams, J. E., Foster, J., Sellen, D. W., Kamau-Mbuthia, E. W., Kamundia, E. W., Mbugua, S., Moore, S. E., Prentice, A. M., Kvist, L. J., Otoo, G. E., Brooker, S. L., Price, W. J., Shafii, B., Placek, C., Lackey, K. A., Robertson, B., ... Bode, L. (2017). What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *105*(5), 1086-1100. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.139980>
- Meng, E. C., Pettersen, E. F., Couch, G. S., Huang, C. C., & Ferrin, T. E. (2006). Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics*, *7*(1), 339. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-339>
- Meng, J., Zhu, Y., Chen, R., Liu, Y., Zhang, W., & Mu, W. (2023). Microbial Synthesis of L-fucose with high productivity by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(5), 2464-2471. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08906>
- Mészáros, Z., Nekvasilová, P., Bojarová, P., Křen, V., & Slámová, K. (2021). Advanced glycosidases as ingenious biosynthetic instruments. *Biotechnology Advances*, *49*, 107733. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107733>
- Miura, K., Tsukagoshi, T., Hirano, T., Nishio, T., & Hakamata, W. (2019). Development of fluorogenic substrates of α -L-fucosidase useful for inhibitor screening and gene-expression profiling. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *10*(9), 1309-1313. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00259>
- Moreno-Clavijo, E., T. Carmona, A., J. Moreno-Vargas, A., Molina, L., & Robina, I. (2011). Syntheses and biological activities of iminosugars as α -L-fucosidase inhibitors. *Current Organic Synthesis*, *8*(1), 102-133. <https://doi.org/10.2174/157017911794407700>

- Ndeh, D., Rogowski, A., Cartmell, A., Luis, A. S., Baslé, A., Gray, J., Venditto, I., Briggs, J., Zhang, X., Labourel, A., Terrapon, N., Buffetto, F., Nepogodiev, S., Xiao, Y., Field, R. A., Zhu, Y., O'Neill, M. A., Urbanowicz, B. R., York, W. S., ... Gilbert, H. J. (2017). Complex pectin metabolism by gut bacteria reveals novel catalytic functions. *Nature*, 544(7648), 65-70. <https://doi.org/10.1038/nature21725>
- Okburan, G., & Kızıler, S. (2023). Human milk oligosaccharides as prebiotics. *Pediatrics & Neonatology*, S187595722200273X. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2022.09.017>
- Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C., & Tellier, C. (2007). Directed evolution of the α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an α -L-transfucosidase. *Biochemistry*, 46(4), 1022-1033. <https://doi.org/10.1021/bi061444w>
- Pérez-Escalante, E., González-Olivares, L. G., Castañeda-Ovando, A., Cruz-Guerrero, A. E., Trant, J. F., López-Orozco, W., Mendoza-Huizar, L. H., & Alatorre-Santamaría, S. (2021). An in silico approach to enzymatic synthesis of fucooligosaccharides using α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Chemistry Proceedings*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-24-08303>
- Perna, V. N., Barrett, K., Meyer, A. S., & Zeuner, B. (2023). Substrate specificity and transglycosylation capacity of α -L-fucosidases across GH29 assessed by bioinformatics-assisted selection of functional diversity. *Glycobiology*, 33(5), 396-410. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad029>
- Perna, V. N., Meier, S., & Meyer, A. S. (2023). Enzymatic production of a suite of human milk oligosaccharides directly in milk. *Enzyme and Microbial Technology*, 165, 110196. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110196>

- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., & van Sinderen, D. (2011). Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes & Nutrition*, 6(3), 285-306. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0206-6>
- Qiao, M., Li, B., Ji, Y., Lin, L., Linhardt, R., & Zhang, X. (2021). Synthesis of selected unnatural sugar nucleotides for biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(1), 47-62. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1844623>
- Ramiro-Cortijo, D., Singh, P., Liu, Y., Medina-Morales, E., Yakah, W., Freedman, S. D., & Martin, C. R. (2020). Breast milk lipids and fatty acids in regulating neonatal intestinal development and protecting against intestinal injury. *Nutrients*, 12(2), 534. <https://doi.org/10.3390/nu12020534>
- Robles-Arias, M. A., García-Garibay, M., Alatorre-Santamaría, S., Tello-Solís, S. R., Guzmán-Rodríguez, F., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. E. (2021). Improvement of fucosylated oligosaccharides synthesis by α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* in water-organic cosolvent reaction system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(11), 3553-3569. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03628-3>
- Rodríguez-Díaz, J., Carbajo, R. J., Pineda-Lucena, A., Monedero, V., & Yebra, M. J. (2013). Synthesis of Fucosyl-N-Acetylglucosamine disaccharides by trans-fucosylation using -L-fucosidases from *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), 3847-3850. <https://doi.org/10.1128/AEM.00229-13>
- Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Díaz, J., Morales, J., Álvarez-Calatayud, G., Climent, E., Silva, Á., Martínez-Blanch, J. F., Enrique, M., Tortajada, M., Ramon, D., Alvarez, B., Chenoll, E., & Gil, Á. (2023). Effects of a novel infant formula on the fecal microbiota in the

- first six months of life: The INNOVA 2020 study. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 3034. <https://doi.org/10.3390/ijms24033034>
- Sakurama, H., Fushinobu, S., Hidaka, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H., Kitaoka, M., Kumagai, H., Yamamoto, K., & Katayama, T. (2012). 1,3-1,4- α -L-fucosynthase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16709-16719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333781>
- Saumonneau, A., Champion, E., Peltier-Pain, P., Molnar-Gabor, D., Hendrickx, J., Tran, V., Hederos, M., Dekany, G., & Tellier, C. (2016). Design of an α -L-transfucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs. *Glycobiology*, 26(3), 261-269. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv099>
- Sela, D. A., Garrido, D., Lerno, L., Wu, S., Tan, K., Eom, H.-J., Joachimiak, A., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2012). *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* ATCC 15697 α -fucosidases are active on fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(3), 795-803. <https://doi.org/10.1128/AEM.06762-11>
- Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K., & Alvala, M. (2020). Molecular docking in modern drug discovery: Principles and recent applications. En V. Gaitonde, P. Karmakar, & A. Trivedi (Eds.), *Drug Discovery and Development—New Advances*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85991>
- Shaikh, F. A., Lammerts van Bueren, A., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2013). Identifying the catalytic acid/base in GH29 α -L-fucosidase subfamilies. *Biochemistry*, 52(34), 5857-5864. <https://doi.org/10.1021/bi400183q>
- Shi, R., Yang, S., Wang, N., Yan, Q., Yan, X., & Jiang, Z. (2023). Synthesis of 2'-fucosyllactose from apple pomace-derived xyloglucan oligosaccharides by an α -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. CAU209. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(11), 3579-3591. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12533-0>

- Silverman, J. A., Balakrishnan, R., & Harbury, P. B. (2001). From the Cover: Reverse engineering the (β/α)₈ barrel fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(6), 3092.
<https://doi.org/10.1073/pnas.041613598>
- Singh, R. P. (2019). Glycan utilisation system in Bacteroides and Bifidobacteria and their roles in gut stability and health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(18), 7287-7315. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10012-z>
- Stütz, A. E., & Wrodnigg, T. M. (2016). Chapter four - Carbohydrate-processing enzymes of the lysosome: Diseases caused by misfolded mutants and sugar mimetics as correcting pharmacological chaperones. En D. C. Baker (Ed.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Vol. 73, pp. 225-302). Academic Press.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006523181630004X>
- Sugiyama, Y., Gotoh, A., Katoh, T., Honda, Y., Yoshida, E., Kurihara, S., Ashida, H., Kumagai, H., Yamamoto, K., Kitaoka, M., & Katayama, T. (2016). Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2- α -L-fucosyltransferase. *Glycobiology*, *26*(11), 1235-1247.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cww085>
- Sugiyama, Y., Katoh, T., Honda, Y., Gotoh, A., Ashida, H., Kurihara, S., Yamamoto, K., & Katayama, T. (2017). Application study of 1,2- α -L-fucosyltransferase: Introduction of Fuca1-2Gal disaccharide structures on N-glycan, ganglioside, and xyloglucan oligosaccharide. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*(2), 283-291.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1254532>
- Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B., & Bourne, Y. (2004). Crystal structure of *Thermotoga maritima* α -L-Fucosidase: Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis.

Journal of Biological Chemistry, 279(13), 13119-13128.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M313783200>

Surabhi, S., & Singh, B. (2018). Computer aided drug design: An overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(5), 504-509.

<https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5.1894>

Tarling, C. A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Bourne, Y., Henrissat, B., & Withers, S. G. (2003). Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47394-47399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306610200>

Thum, C., Wall, C. R., Weiss, G. A., Wang, W., Szeto, I. M.-Y., & Day, L. (2021). Changes in HMO concentrations throughout lactation: Influencing factors, health effects and opportunities. *Nutrients*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/nu13072272>

Tsai, T.-W., Fang, J.-L., Liang, C.-Y., Wang, C.-J., Huang, Y.-T., Wang, Y.-J., Li, J.-Y., & Yu, C.-C. (2019). Exploring the synthetic application of *Helicobacter pylori* α 1,3/4-fucosyltransferase FucTIII toward the syntheses of fucosylated human milk glycans and Lewis antigens. *ACS Catalysis*, 9(12), 10712-10720.

<https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03752>

Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (Eds.). (2011). *Stress responses of lactic acid bacteria*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92771-8>

Turroni, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., Cagnasso, P., Bizzarri, B., de'Angelis, G. L., Shanahan, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2009). Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1534-1545.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02216-08>

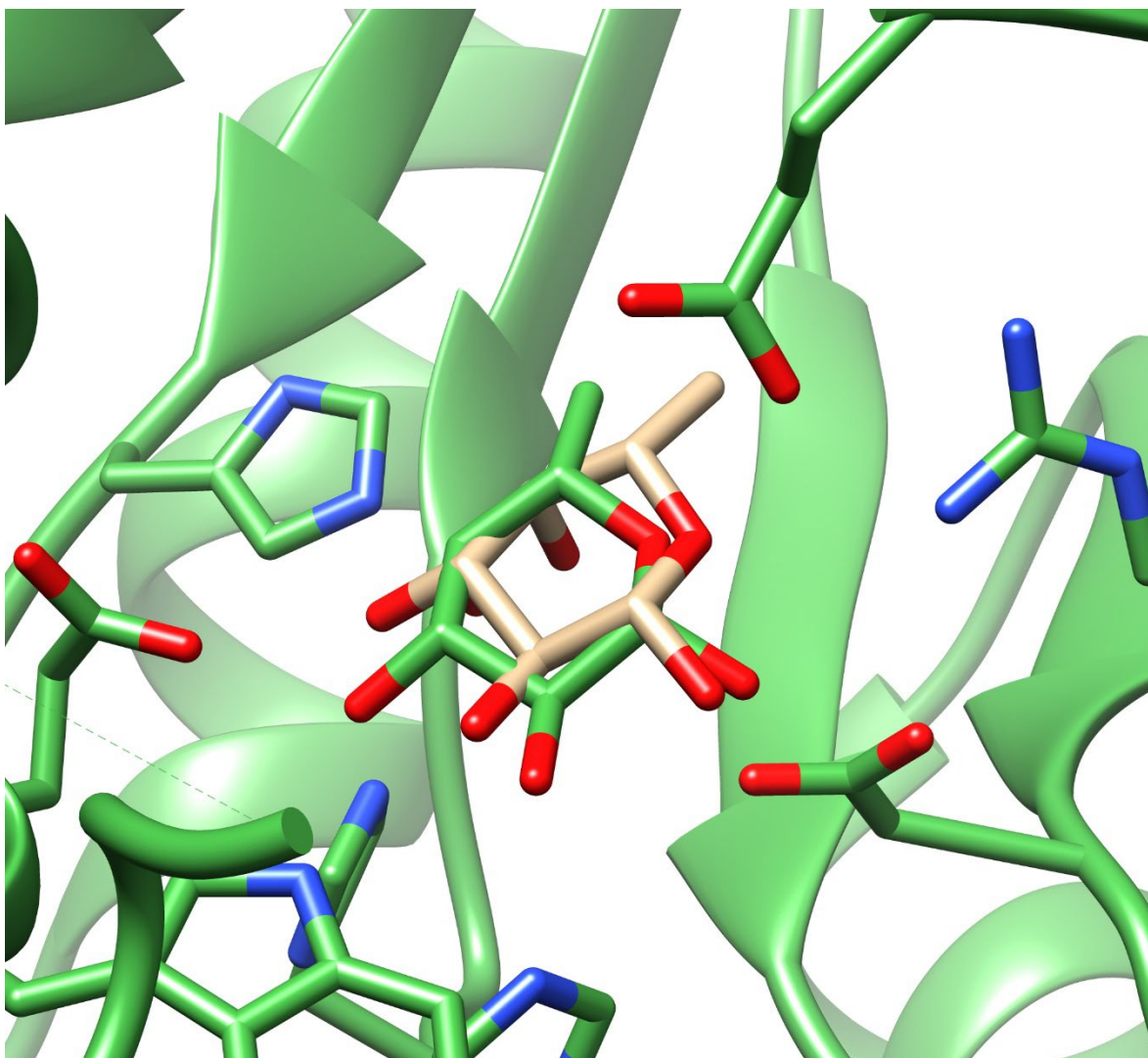
- Urashima, T., Hirabayashi, J., Sato, S., & Kobata, A. (2018). Human milk oligosaccharides as essential tools for basic and application studies on galectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, *30*(172), SE51-SE65.
<https://doi.org/10.4052/tigg.1734.1SE>
- Urashima, T., Katayama, T., Sakanaka, M., Fukuda, K., & Messer, M. (2022). Evolution of milk oligosaccharides: Origin and selectivity of the ratio of milk oligosaccharides to lactose among mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1866*(1), 130012. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.130012>
- Vaughan, E. E., Heilig, H. G. H. J., Ben-Amor, K., & de Vos, W. M. (2005). Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews*, *29*(3), 477-490.
<https://doi.org/10.1016/j.fmre.2005.04.009>
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G. F., Gupta, R. S., & van Sinderen, D. (2007). Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: The case of bifidobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *91*(4), 351-372.
<https://doi.org/10.1007/s10482-006-9122-6>
- Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., & Yamamoto, K. (2008). 1,2- α -L-Fucosynthase: A glycosynthase derived from an inverting α -glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS Letters*, *582*(27), 3739-3743.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.054>
- Walsh, C., Lane, J. A., van Sinderen, D., & Hickey, R. M. (2020). Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *Journal of Functional Foods*, *72*, 104074. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104074>

- Wiciński, M., Sawicka, E., Gębalski, J., Kubiak, K., & Malinowski, B. (2020). Human milk oligosaccharides: Health benefits, potential applications in infant formulas, and pharmacology. *Nutrients*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/nu12010266>
- Wu, H., Ho, C., Ko, T., Popat, S. D., Lin, C., & Wang, A. H. -J. (2010). Structural basis of α -fucosidase inhibition by iminocyclitols with K_i values in the micro- to picomolar range. *Angewandte Chemie International Edition*, *49*(2), 337-340. <https://doi.org/10.1002/anie.200905597>
- Xi, Q., Liu, W., Zeng, T., Chen, X., Luo, T., & Deng, Z. (2023). Effect of different dietary patterns on macronutrient composition in human breast milk: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, *15*(3), 485. <https://doi.org/10.3390/nu15030485>
- Yu, S., Liu, J.-J., Yun, E. J., Kwak, S., Kim, K. H., & Jin, Y.-S. (2018). Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0947-2>
- Yu, Z.-T., Chen, C., & Newburg, D. S. (2013). Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*, *23*(11), 1281-1292. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt065>
- Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2014). Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(40), 9615-9631. <https://doi.org/10.1021/jf502619p>
- 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 α -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, *41*, 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.002>

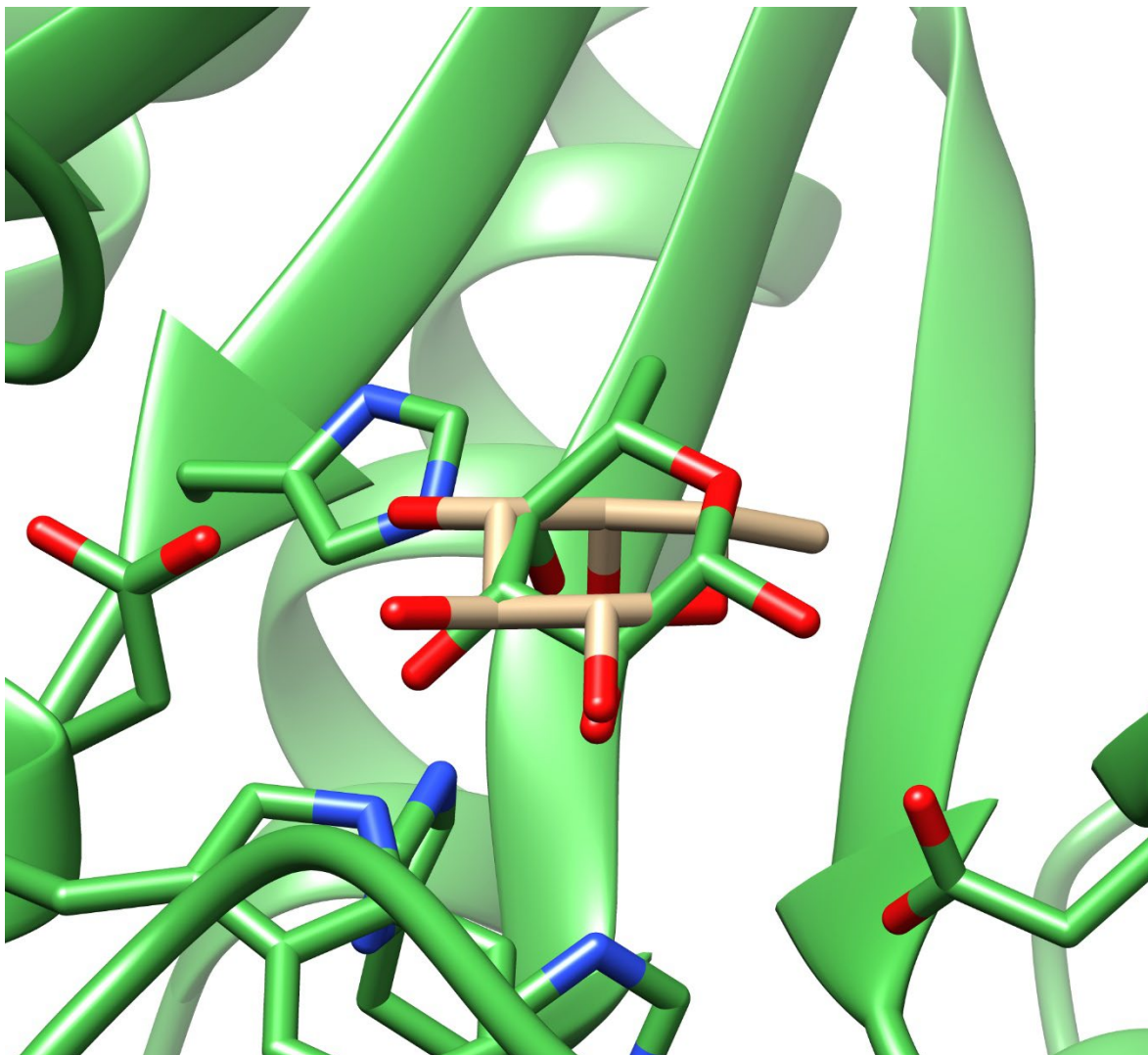
- Zeuner, B., Teze, D., Muschiol, J., & Meyer, A. S. (2019). Synthesis of human milk oligosaccharides: Protein engineering strategies for improved enzymatic transglycosylation. *Molecules*, *24*(11), 2033.
<https://doi.org/10.3390/molecules24112033>
- Zeuner, B., Vuillemin, M., Holck, J., Muschiol, J., & Meyer, A. S. (2018). Loop engineering of an α -1,3/4-L-fucosidase for improved synthesis of human milk oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, *115*, 37-44.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.04.008>
- Zhao, C., Wu, Y., Yu, H., Shah, I. M., Li, Y., Zeng, J., Liu, B., Mills, D. A., & Chen, X. (2016). One-pot multienzyme (OPME) synthesis of human blood group H antigens and a human milk oligosaccharide (HMOS) with highly active *Thermosynechococcus elongatus* α 1–2-fucosyltransferase. *Chemical communications (Cambridge, England)*, *52*(20), 3899-3902.
<https://doi.org/10.1039/c5cc10646j>
- Zheng, J., Xu, H., Fang, J., & Zhang, X. (2022). Enzymatic and chemoenzymatic synthesis of human milk oligosaccharides and derivatives. *Carbohydrate Polymers*, *291*, 119564. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119564>
- Zhou, J., Negi, A., Mirallai, S. I., Warta, R., Herold-Mende, C., Carty, M. P., Ye, X.-S., & Murphy, P. V. (2019). N-Alkyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-L-fucitols as fucosidase inhibitors: Synthesis, molecular modelling and activity against cancer cell lines. *Bioorganic Chemistry*, *84*, 418-433. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.12.003>
- Zhou, W., Jiang, H., Liang, X., Qiu, Y., Wang, L., & Mao, X. (2022). Discovery and characterization of a novel α -L-fucosidase from the marine-derived *Flavobacterium algicola* and its application in 2'-fucosyllactose production. *Food Chemistry*, *369*, 130942. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130942>

Zhu, Y., Cao, H., Wang, H., & Mu, W. (2022). Biosynthesis of human milk oligosaccharides via metabolic engineering approaches: Current advances and challenges. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102841.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102841>

Anexo 1. Redocking con las estructuras 3D 1ODU y 6O1A



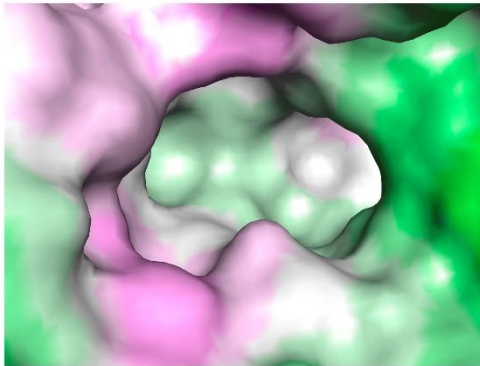
Redocking de fucosa de la estructura 3D 1ODU, RMSD de 1.050 Å. Verde: estructura 3D 1ODU, Café: redocking de fucosa



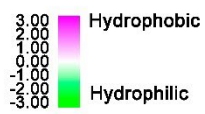
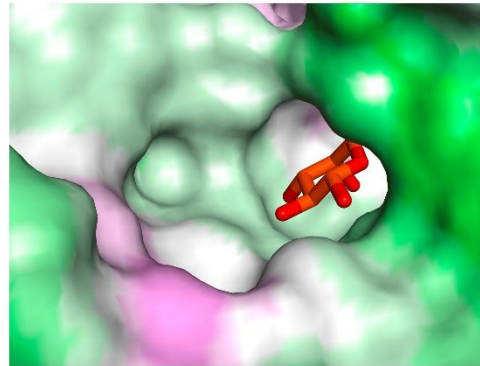
Redocking de fucosa de la estructura 3D 6O1A, RMSD de 1.937 Å. Verde: estructura 3D 6O1A, Café: redocking de fucosa.

Anexo 2. Hidrofobicidad del bolsillo catalítico de *TmFuc*

A

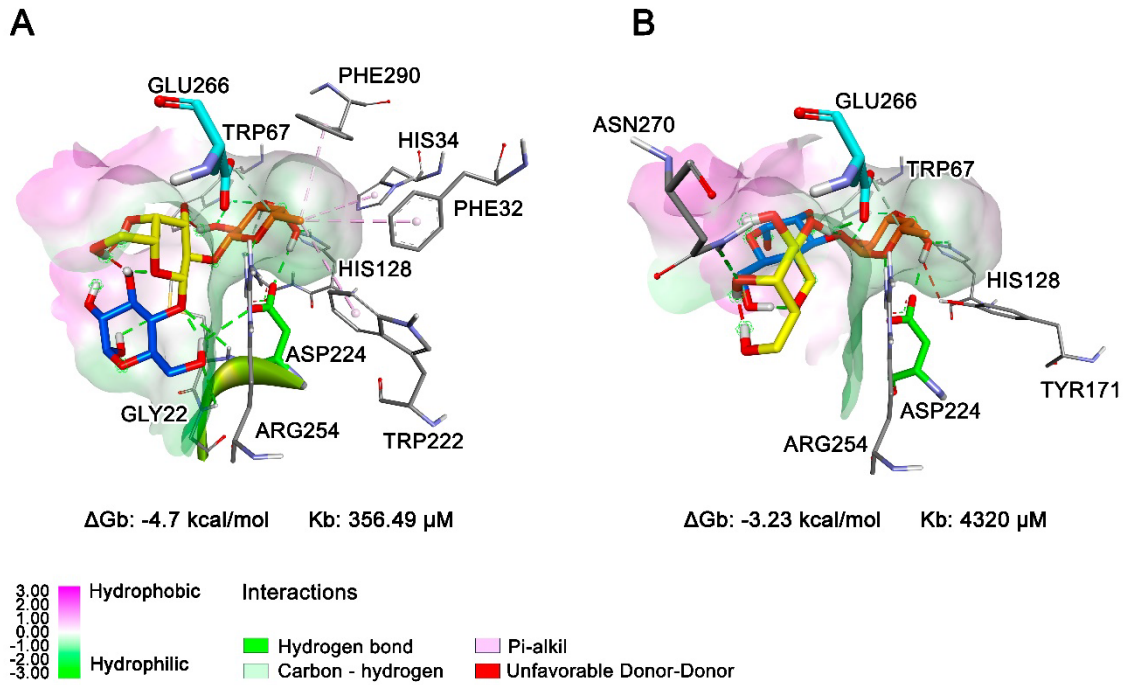


B



Hidrofobicidad del bolsillo catalítico de *TmFuc*. A: Apoenzima (2ZWY). B: Complejo α -L-fucosidasa-fucosa (1ODU); fucosa en rojo.

Anexo 3. Acoplamiento molecular de *TmFuc* como apoenzima con 2'FL y 3FL



Acoplamiento molecular de *TmFuc* como apoenzima y A: 2'FL; B: 3FL.

Anexo 4. Prueba de t de Student

	Pendiente	Varianza
ρ NP Fuc	1.465	0.049
ρ NP Fuc + lactosa	1.47	0.03
ρ NP Fuc + lactulosa	1.433	0.041

ρ NP Fuc y ρ NP Fuc + lactosa

Prueba F	F de tablas	¿Homogénea?	Prueba t	t calculada	
2.6678	2.151	No	0.0870	2.049	No hay diferencia significativa

ρ NP Fuc y ρ NP Fuc + lactosa

Prueba F	F de tablas	¿Homogénea?	Prueba t	t de tablas	
1.4283	2.151	Si	0.5009	2.006	No hay diferencia significativa

ρ NP Fuc y ρ NP Fuc + lactosa

Prueba F	F de tablas	¿Homogénea?	Prueba t	t de tablas	
1.8678	2.161	Si	0.7283	2.007	No hay diferencia significativa

Anexo 5. Lista de productos obtenidos de la Tesis

Biologia

<https://doi.org/10.1007/s11756-022-01296-0>

ORIGINAL ARTICLE



Mechanistic insight into the synthesis of fucooligosaccharides by α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* belonging to the GH29 family: in silico study

Mauricio E. Pavón-Chimal¹ · Carlos Jiménez-Pérez¹ · Francisco Guzmán-Rodríguez¹ · Sergio Alatorre-Santamaría¹ · Luis G. González-Olivares² · Mariano García-Garibay^{1,3} · Lorena Gómez-Ruiz¹ · Gabriela Rodríguez-Serrano¹ · Alma E. Cruz-Guerrero¹

Received: 28 July 2022 / Accepted: 9 December 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Plant Science and Biodiversity Centre, Slovak Academy of Sciences (SAS), Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences (SAS), Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences (SAS) 2022

Biointerface Research in Applied Chemistry

Open-Access Journal (ISSN: 2069-5837)

Article

Volume 13, Issue 5, 2023, 404

<https://doi.org/10.33263/BRIAC135.404>

An *In silico* Analysis of Enzyme-Substrate Interaction in α -L-Fucosidases Belonging to the GH29 Family

Mauricio E. Pavón-Chimal ¹, Carlos Jiménez-Pérez ¹, Francisco Guzmán-Rodríguez ¹, Sergio Alatorre-Santamaría ^{1*}, Luis G. González-Olivares ², Mariano García-Garibay ^{1,3}, Lorena Gómez-Ruiz ¹, Gabriela Rodríguez-Serrano ¹, Alma Cruz-Guerrero ^{1,*}

¹ Department of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Mexico City, 09340, Mexico

² Academic Area of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo, Mexico

³ Department of Food Science, Universidad Autónoma Metropolitana, Lerma. De las Garzas 10, Lerma de Villada, 52005, State of Mexico, Mexico

* Correspondence: aec@xanum.uam.mx (A.C.G.); salatorre@xanum.uam.mx (S.A.S);

Scopus Author ID 6506493418

Received: 9.08.2022; Accepted: 20.09.2022; Published: 16.11.2022



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00282

Matrícula: 2173801844

Síntesis de fucooligosacáridos empleando α -L-fucosidasas microbianas: estudio *in vitro* e *in silico*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 13 del mes de diciembre del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA
DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA CANALES
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES
DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN RODRIGUEZ

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

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: MAURICIO EDUARDO PAVON CHIMAL

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

Aprobar

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



Mauricio Chimal

MAURICIO EDUARDO PAVON CHIMAL
ALUMNO

REVISÓ

[Signature]
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

[Signature]
DR. SERGIO ANDRES ALATORRE
SANTAMARIA

VOCAL

[Signature]
DR. AGUSTIN LOPEZ MUNGUIA CANALES

VOCAL

[Signature]
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

SECRETARIO

[Signature]
DR. FRANCISCO JAVIER GUZMAN
RODRIGUEZ