

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA**



Casa abierta al tiempo
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Síntesis de Oligosacáridos Fucosilados por vía enzimática
mediante reacciones de Fucosilación**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología

PRESENTA
I. en A. Yolanda Escamilla Lozano

Director
Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

6 de Septiembre del 2011

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465

México, D. F a 6 de septiembre del 2011.

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Síntesis de Oligosacáridos Fucosilados por vía enzimática mediante reacciones de Fucosilación

Que presentó

I. A. Yolanda Escamilla Lozano

Comité Tutorial:

Director: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero.

Asesor: M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz.

Asesor: Dr. Agustín López Munguía.

Jurado:

Presidente:

Dr. José Mariano García Garibay _____

Secretario:

Dr. Sergio Huerta Ochoa _____

Vocal:

Dr. Agustín López-Munguía Canales _____

Vocal:

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz _____

DEDICATORIA

A mí amada familia: Ludivina Lozano Salinas, Gelacio Escamilla Medina, María Guadalupe, Juan Carlos, Rocio y Luis Eduardo Escamilla Lozano

Sé firme en tus actitudes y perseverante en tu ideal. Pero sé paciente, no pretendiendo que todo te llegue de inmediato.

Haz tiempo para todo, y todo lo que es tuyo, vendrá a tus manos en el momento oportuno.

Aprende a esperar el momento exacto para recibir los beneficios que reclamas y con paciencia a que maduren los frutos para poder apreciar debidamente su dulzura.

No seas esclavo del pasado y los recuerdos tristes, no revuelvas una herida que está cicatrizada, no rememores dolores y sufrimientos antiguos.

De ahora en adelante procura construir una vida nueva, dirigida hacia lo alto y camina hacia delante, sin mirar hacia atrás. Haz como el sol que nace cada día, sin acordarse de la noche que pasó. Sólo contempla la meta y no veas que tan difícil es alcanzarla.

No te detengas en lo malo que has hecho, camina en lo bueno que puedes hacer. No te culpes por lo que hiciste, más bien decídate a cambiar.

No trates que otros cambien, sé tú el responsable de tu propia vida y trata de cambiar tú.

Deja que el amor te toque y no te defiendas de él. Vive cada día, aprovecha el pasado para bien y deja que el futuro llegue a su tiempo.

Busca a alguien con quien compartir tus luchas hacia la libertad, una persona que te entienda, te apoye y te acompañe en ella. Si tu felicidad y tu vida dependen de otra persona, despréndete de ella y ámala, sin pedirle nada a cambio.

Aprende a mirarte con amor y respeto, piensa en ti como en algo precioso. Desparrama en todas partes

la alegría que hay dentro de ti. Que tu alegría sea contagiosa y viva para expulsar la tristeza de todos los que te rodean. La alegría es un rayo de luz que debe permanecer siempre encendido, iluminando todos nuestros actos y sirviendo de guía a todos los que se acercan a nosotros.

Si en tu interior hay luz y dejas abiertas las ventanas de tu alma, por medio de la alegría, todos los que pasan por la calle en tinieblas, serán iluminados por tu luz.

Trabajo es sinónimo de nobleza. No desprecies el trabajo que te toca realizar en la vida. El trabajo ennoblece a aquellos que lo realizan con entusiasmo y amor. No existen trabajos humildes. Sólo se distinguen por ser bien o mal realizados. Da valor a tu trabajo, cumpliéndolo con amor y cariño y así te valorarás a ti mismo.

Dios nos ha creado para realizar un sueño. Vivamos por él, intentemos alcanzarlo. Pongamos la vida en ello y si nos damos cuenta que no podemos, quizás entonces necesitemos hacer un alto en el camino y experimentar un cambio radical en nuestras vidas.

No te des por vencido, piensa que si Dios te ha dado la vida, es porque sabe que tú puedes con ella. El éxito en la vida no se mide por lo que has logrado, sino por los obstáculos que has tenido que enfrentar en el camino.

Tú y sólo tú escoges la manera en que vas a afectar el corazón de otros y esas decisiones son de lo que se trata la vida.

"Que este día sea el mejor de tu vida para alcanzar tus sueños"



AGRADECIMIENTOS

Universidad Autónoma Metropolitana
 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
 Departamento de Biotecnología Alimentaria
 Miembros del comité Tutorial
 Miembros del Jurado



Gracias a todos los que me enseñaron, regañaron, aconsejaron, apoyaron, cuestionaron y compartieron momentos importantes en esta etapa, recordaré sus palabras han marcado mi vida.



GRACIAS POR SUS PALABRAS

Dra. Alma	“¡Yola!”, “Soy terrible”, “por si las recuachas”
Mtra. Lore	“Muy bien”, “Ya estas lista”
Dra. Gaby	“Que bueno”, “Hay lugar para hacer el servicio en la pp2”
Dr. Mariano	“Felicidades muy bien”
Dr. Ivonsita	“ Hay yola”, “No te ayudes”
Mtra. Claus	“Pero te queremos”, “Estas nominada”
Mtro. Alex	“No me queda la menor dura”, “estoy absolutamente convencido”, “chispiajos”
Mtra. Naty	“Te ves feliz”,
Lic. Lupita	“Esa es mi hermanita”
Lic. Carlos	“Pues a darle”
Ing. Eriko	“Uorale”, “No te pases”
Ludy	“Tu puede mamita”, “Yo te apoyo”
Papá	“la maestra Yolanda”
Chio	“Me haces ver mal”, “deja de comer gorditas en tu lab”
Luisillo	“Pus, me cais bien”, “ira ese buche”, “ira”
Juls	“Que bonito es admirar a tu pareja”
Chery	“Te quiero Yola”
Naye	“Tú puedes yola”

RESUMEN

La composición de la leche humana es muy compleja, posee una gran cantidad de componentes bioactivos entre ellos los oligosacáridos (OS), estos compuestos pueden estar en forma libre o conjugada. Los OS libres son el tercer componente de la leche materna tras la lactosa y los lípidos, en las últimas décadas, mas de 130 OS han sido aislados e identificados.

Los OS de la leche humana desempeñan un papel importante en la protección de enfermedades infecciosas, las investigaciones sugieren que son en parte, responsables de la reducción del riesgo de infecciones en los lactantes que son alimentados con leche materna al favorecer el crecimiento de determinada flora intestinal, además son potentes inhibidores de la adhesión de patógenos en la superficie epitelial del intestino.

En la actualidad existe un creciente interés en la capacidad de los OS de la leche humana, en especial los fucosil-oligosacáridos para proteger a los bebés de microorganismos patógenos entéricos durante el desarrollo temprano. Se sabe que los fucosil-oligosacáridos que poseen un enlace terminal α (1-2) tienen actividad protectora contra *Campylobacter jejuni* e inhiben la adhesión de la toxina de *Escherichia coli*.

La importancia biológica de estos compuestos ha generado el interés de producirlos y aplicarlos principalmente en la industria alimentaria como componentes bioactivos en fórmulas lácteas. Se han planteado dos alternativas principales para la síntesis de OS, la síntesis química y la síntesis enzimática. A pesar de los bajos rendimientos obtenidos empleando glicosidasas para la producción de OS, sigue siendo una alternativa estudiada, ya que la síntesis química emplea solventes y catalizadores tóxicos no permitidos en la reglamentación alimentaria y el uso de glicosil-transferasas está limitado por la baja disponibilidad de la enzima.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la síntesis de oligosacáridos fucosilados a partir de reacciones de fucosilación mediante el uso exclusivo de glicosil-hidrolasas. Se establecieron las condiciones de reacción para la síntesis de fucosil-lactosa por vía enzimática, empleando β -glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02 y la α -fucosidasa de *Bos taurus* utilizando al PNP-F

como sustrato donador y a la lactosa como sustrato aceptor. Se obtuvo un trisacárido que fue posteriormente hidrolizado para conocer los monosacáridos presentes en su estructura y comprobar la presencia de fucosa.

También se establecieron las condiciones de reacción para la síntesis de disacáridos fucosilados empleando α -galactosidasa del producto comercial “Beano”, α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la β -glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02. Se consiguió sintetizar ocho diferentes disacáridos: un disacárido α -galactosil-fucosa empleando α -galactosidasa del producto comercial “Beano”, melibiosa como sustrato donador y fucosa como aceptor, pero que no fue posible purificar para su estudio; cuatro disacáridos empleando α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando maltosa como sustrato donador y fucosa como aceptor, de estos el obtenido en mayor cantidad fue purificado e identificado mediante hidrólisis enzimática como α -glucosil-fucosa; por último se sintetizaron tres disacáridos fucosilados β -galactosil-fucosa, empleando β -glicosidasa hipertermofílica, utilizando lactosa como sustrato donador y fucosa como aceptor, con probable actividad prebiótica. Además la presencia de fucosa en estos OS es de gran interés para posteriores estudios de adhesión microbiana ya que este monosacárido es reconocido por las adhesinas de las bacterias patógenas.

Se logró sintetizar compuestos fucosilados mediante reacción de fucosilación exclusivamente con hidrolasas, empleando como sustrato donador PNP-F y como sustrato aceptor lactosa lo que demuestra la viabilidad de la reacción. No obstante, es necesario establecer estrategias más eficientes que resulten en mayores rendimientos como el uso de solventes orgánicos ó la síntesis bajo condiciones de saturación de los sustratos para disminuir la actividad de agua y favorecer la reacción de fucosilación. Los resultados obtenidos generan excelentes expectativas ya que hasta ahora los estudios realizados sobre prebióticos se han centrado en los fructo-oligosacáridos y los galacto-oligosacáridos, dejando de lado a los OS de la leche materna que se conoce bien su importancia en el desarrollo de la microbiota intestinal de los lactantes, además la alta concentración de oligosacáridos fucosilados en la leche materna sugiere que estos aportan un mayor beneficio a la salud.

SUMMARY

The composition of human milk is very complex, has a large number of bioactive compounds, including oligosaccharides (OS). These compounds can be free or conjugated. The free OS are the third component of human milk after lactose and lipids, in recent decades, more than 130 OS have been isolated and identified.

The OS of human milk play an important role in protection from infectious diseases, researches suggests that they are partly responsible for reducing the risk of infections in infants who are breastfed by favoring the growth of intestinal flora determined also are potent inhibitors of the adherence of pathogens on the epithelial surface of the intestine.

There is now a growing interest in the ability of human milk OS, especially fucosyl-oligosaccharides to protect babies from enteric pathogens during early development. It is known that fucosyl-oligosaccharides have a link terminal α (1-2) have protective activity against *Campylobacter jejuni* and inhibit adhesion of *Escherichia coli* toxin.

The biological importance of these compounds has generated interest, principally to produce and apply them in the food industry as a bioactive component in powder milk. There have been two main alternatives for the synthesis of OS, chemical synthesis and enzymatic synthesis. Despite the low yields obtained using glycosidases for the production of OS. An alternative is still studied as the chemical synthesis uses toxic solvents, and catalysts are not allowed in food regulation and the use of glycosyl-transferases is limited by low availability of the enzyme.

The aim of this study was the synthesis of fucosylated oligosaccharides by fucosylation reactions using glycosyl-hydrolase exclusively. Reaction conditions were established for the synthesis of fucosyl-lactose by an enzymatic way, using hyperthermophilic β -glycosidase GLY 001-02 and α -fucosidase of *Bos taurus* using the PNP-F as a substrate donor and lactose as an acceptor substrate. Trisaccharide was obtained, which was subsequently hydrolyzed to known monosaccharides present in its structure and verify the presence of fucose.

Furthermore, were established the reaction conditions for the synthesis of fucosylated disaccharides using α -galactosidase of "Beano", α -glucosidase of *Saccharomyces cerevisiae* and hyperthermophilic β -glycosidase GLY 001-02. We were synthesized eight different disaccharide: a disaccharide α -galactosyl-fucose using α -galactosidase of "Beano", melibiose and fucose as a donor and acceptor substrate, but it was impossible to purify for study; four disaccharides using α -glucosidase of *Saccharomyces cerevisiae*, using maltose as donor substrate and fucose as an acceptor substrate, these obtained in greater quantity was purified and identified by enzymatic hydrolysis as α -glucosyl-fucose; finally were synthesized three fucosylated disaccharides β -galactosyl-fucose, using hyperthermophilic β -glycosidase, using lactose as donor and fucose as an acceptor substrate, with probable prebiotic activity. Besides the presence of fucose in these OS is of great interest for further study microbial adhesion as this monosaccharide is recognized by adhesins of pathogenic bacteria.

Synthesize fucosylated compounds was achieved by reaction fucosylation exclusively with hydrolases, using as donor substrate PNP-F as the acceptor substrate lactose, demonstrating the feasibility of the reaction. However, it is necessary to establish more efficient strategies that result in higher yields, as use of organic solvents or synthesis under saturated conditions of substrates to reduce the water activity and reaction fucosylation favor. The results generated great expectations and so far the studies on probiotics have focused on fructo-oligosaccharides and galacto-oligosaccharides, bypassing the OS of breast milk are known but its importance in the development of intestinal microbiota of infants, in addition to the high concentration of fucosylated oligosaccharides in breast milk suggests that they bring greater benefits to health.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	12
2. Antecedentes	14
2.1 Oligosacáridos de la Leche Humana	14
2.1.1 Efecto anti-infeccioso de los oligosacáridos de la leche humana	18
2.1.2 Efecto prebiótico de los oligosacáridos de la leche humana	19
2.1.3 Efecto sistémico de los oligosacáridos de la leche humana	22
2.2 Oligosacáridos fucosilados: Síntesis <i>in vivo</i> .	22
2.2.1 Síntesis de lactosa.	22
2.2.2 Síntesis de GDP-fucosa.	23
2.2.3 Síntesis de OS de la leche humana	25
2.3 Oligosacáridos fucosilados: Síntesis <i>in vitro</i>	26
2.3.1 Síntesis de OS mediante reacciones químicas	26
2.3.2 Síntesis de OS mediante reacciones enzimáticas	28
2.3.3 Síntesis de OS mediante combinación entre reacciones químicas y enzimáticas	30
2.4 Mecanismo de acción de las glicosil-transferasas	31
2.5 Mecanismo de acción de las glicosil-hidrolasas	32
2.6 Hidrolasas empleadas en este estudio	35
2.6.1 α -fucosidasa de riñón de bovino (<i>Bos taurus</i>)	35
2.6.2 α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.6.3 Glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02	36
2.6.4 β -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i>	37
2.6.5 β -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	38
3 Objetivo general	40
3.1. Objetivos específicos	40
4 Hipótesis	40
5. Metodología	41
5.1 Reactivos	41
5.2 Enzimas	42
5.3 Equipos	42
5.4 Curva patrón de 2-nitrofenil (ONP)	42
5.5 Cálculo de K_M y V_{max} para la fucosidasa de <i>Bos taurus</i>	43
5.6 Condiciones de trabajo para la determinación de la actividad enzimática	43
5.7 Determinación de la Temperatura de reacción para la fucosidasa de <i>Bos taurus</i>	44

5.8 Selección de la enzima para la síntesis de fucosil-lactosa _____	44
5.9 Síntesis de fucosil-lactosa _____	44
5.10 Síntesis de α y β galactosil-fucosa _____	44
5.11 Síntesis de α -glucosil-fucosa _____	45
5.12 Purificación de oligosacáridos sintetizados _____	45
5.13 Análisis de los compuestos fucosilados sintetizados enzimáticamente _____	46
6. Resultados y discusión _____	47
6.1 Selección de enzima para la síntesis de fucosil-lactosa. _____	47
6.1.1 Actividad enzimática de la β -glucosidasa hipertermofílica con diferentes sustratos _____	47
6.1.2 Actividad enzimática de la α -fucosidasa de <i>Bos taurus</i> con diferentes sustratos _____	49
6.2 Síntesis de fucosil-lactosa _____	51
6.2.1 Efecto de la concentración de α -fucosidasa en la síntesis de fucosil-lactosa _____	54
6.2.2 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática. _____	55
6.3 Síntesis de Disacáridos Fucosilado. _____	58
6.3.1 Síntesis de galactosil-fucosa empleando α -galactosidasa del producto comercial “Beano” _____	58
6.3.2 Síntesis de glucosil-fucosa empleando α -glucosidasa de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> _____	60
6.3.3 Síntesis de galactosil-fucosa empleando β -glucosidasa hipertermofílica _____	62
6.4 Estudio y análisis de los disacáridos sintetizados _____	65
6.4.1 Análisis de glucosil-fucosa sintetizado por la α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	66
6.4.2 Análisis de galactosil-fucosa sintetizado por la β -glucosidasa hipertermofílica _____	69
7 Conclusiones _____	75
8 Bibliografía _____	76

1. Introducción

La leche humana (LH) contiene más de 130 oligosacáridos (OS) distintos, que constituyen el tercer componente de ésta, de entre ellos, los componentes fucosilados son los que se encuentran en mayor proporción. La mayoría de los OS están constituidos por una molécula de lactosa en el extremo reductor, y una fucosa o ácido siálico en el extremo no reductor. De acuerdo a su configuración pueden ser clasificados como: neutros (fucosilados), ácidos (predominio de ácido siálico) y compuestos (fucosa y ácido siálico).

Los OS tienen un efecto anti-infeccioso debido a que su estructura es muy parecida a las estructuras carbonatadas de los receptores de bacterias, virus y toxinas, de este modo actúan como receptores competitivos evitando la primer fase del contagio al impedir la adhesión de patógenos a las células del huésped; Otro efecto benéfico, es su carácter prebiótico, ya que son usados como sustrato por las bacterias colónicas (*Bifidobacteria* y *Lactobacilos*) que generan protección frente a enfermedades entéricas. Los fucosil-oligosacáridos en particular, inhiben la adhesión de *Campylobacter jejuni* (una de las causas más comunes de diarrea) y *Escherichia coli*, de entre los OS fucosilados, la 2' fucosil-lactosa (2'FL) es el componente mayoritario.

La síntesis de OS se lleva a cabo dentro del aparato de Golgi, en las células mamarias. Mediante glicosiltransferasas se producen los tres oligosacáridos *core* (lactosa, lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neotetraosa (LNnT), que posteriormente por la acción de fucosiltransferasas ó sialil transferasas dan origen a una gran variedad de compuestos.

La síntesis *in vitro* de OS se ha realizado tanto por síntesis química como por síntesis enzimática. La síntesis química se basa en el bloqueo o protección de grupos químicos, es un método tardado que requiere un gran número de pasos que resultan en un procedimiento costoso y no apropiado para la síntesis a gran escala. La síntesis enzimática por su lado, propone el empleo de glicosiltransferasas para la síntesis de fucosil-oligosacáridos ya que poseen una alta selectividad y no se tiene la necesidad de protección química del sustrato necesaria en la síntesis química, sin embargo, una desventaja es la necesidad de usar un donador glicosil nucleótido lo que la hace poco viable en la producción a gran escala.

Recientemente se ha considerado el uso de glicohidrolasas para la síntesis de OS ya que son de bajo costo y no poseen las desventajas mencionadas, sin embargo la dificultad de separación y la poca especificidad han generado bajos rendimientos.

Desde hace algunos años el grupo de trabajo de investigación de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana, ha dedicado sus esfuerzos en el estudio de prebióticos como alimentos funcionales y han enfocado la atención a la síntesis de galacto-oligosacáridos mediante la transgalactosilación de lactosa en medios no convencionales, logrando demostrar la flexibilidad de la glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02, con lo que se propuso una reacción en cascada para la síntesis de galacto-oligosacáridos. Sin embargo, la constante búsqueda de nuevas alternativas de compuestos con potencial prebiótico, ha desembocado en el estudio de compuestos fucosilados. El empleo de un nuevo monosacárido (fucosa) para la síntesis de oligosacáridos ha generado buenas expectativas, así como la incertidumbre que acompaña el introducirse en un nuevo campo de investigación.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la síntesis de oligosacáridos fucosilados a partir de reacciones enzimáticas de fucosilación empleando exclusivamente glicosil-hidrolasas. El trabajo se dividió en dos etapas: en la primera etapa se comprobó la viabilidad de la síntesis por esta vía y se establecieron las condiciones de reacción y en la segunda etapa se estudió la síntesis de disacáridos fucosilados.

2. Antecedentes

2.1 Oligosacáridos de la Leche Humana

La leche humana contiene más de 130 OS distintos (Gugiel-Urbano y Goñi, 2001; Miñana, 2007) que son sintetizados en el aparato de Golgi de las células secretoras en los alvéolos de las glándulas mamarias. La α -lactoalbúmina regula a la galactosiltransferasa que cataliza la reacción entre uridina-5'-difosfato-galactosa y glucosa para producir lactosa, posteriormente otras transferasas (galactosil, N-acetilglucosaminil, fucosil o sialiltransferasas) adicionan monosacáridos sobre lactosa para formar los distintos OS (Gudiel-Urbano y Goñi, 2001). La composición de la leche materna es muy compleja contiene entre 7 y 12 g/L de oligosacáridos (Domínguez-Vergara y col., 2009). Estas moléculas contienen más de 3 monómeros unidos por enlaces glicosídicos, la mayoría tienen lactosa en su extremo reductor y fucosa (6-desoxigalactosa) en su extremo no reductor. Están constituidos por residuos de monosacáridos de (Figura 1): D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc) y ácido N-acetil neurámico (Sial) (Gudiel-Urbano y Goñi, 2001).

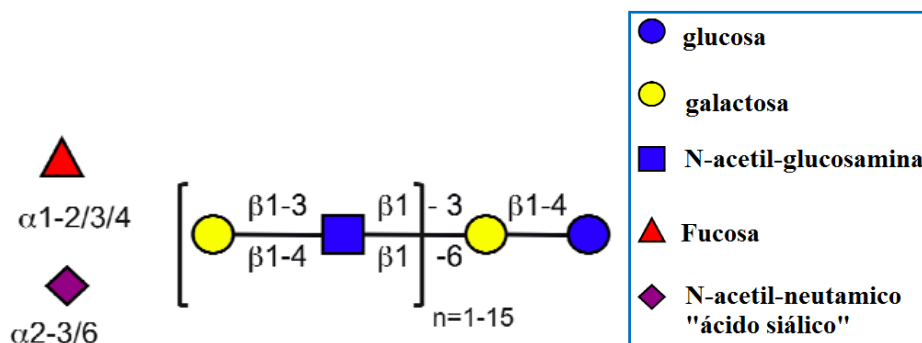


Figura 1: Residuos monosacáridos que forman parte de los OS

A partir de una molécula de lactosa se añaden residuos de Gal con enlace β (1-6) o residuos de GlcNAc unido en enlace β (1-3) por medio de glucosiltransferasas. Las moléculas van haciéndose más complejas a medida que se adicionan residuos de Fuc α (1-2/3) ó lactosamina en distintas posiciones (Kunz y col., 2000; Miñana, 2007). Su presencia está asociada a la disminución de incidencia de enfermedades alérgicas e infecciosas en bebés alimentados con

leche materna. Debido a su complejidad, los oligosacáridos con estructuras idénticas a los oligosacáridos de la leche humana aún no están disponibles como ingredientes alimentarios (Domínguez-Vergara y col., 2009).

Tabla 1: Clasificación de los oligosacáridos de la leche humana		
Oligosacáridos neutros	Oligosacáridos ácidos	Sialil-fucosilados
2' fucosil-lactosa	Sialil α (2-3)-lactosa	3' sialil-lactosa-3-fucosil-lactosa
3' fucosil-lactosa	Sialil α (2-6)-lactosa	Sialil-fucosil-lacto-N-tetraosa
Difucosil-lactosa	Sialil-lacto-N-tetraosa a	Monofucosil-monosialil-lacto-N-hexosa
3' sialil-lactosa	Sialil-lacto-N-tetraosa b	

(Gudiel-Urbano y Goñi, 2001; Kunz y col., 2000).

En la clasificación más sencilla, se considera que existen tres principales categorías: neutros, que incluyen a los OS fucosilados, los ácidos con predominio de ácido siálico y los sialil-fucosilados, que contienen fucosa y ácido siálico (Tabla 1) (Gudiel-Urbano y Goñi, 2001).

Otra manera de clasificar a los OS depende del momento en que son sintetizados durante el periodo de lactancia y los clasifica en *core* y complejos. Los *core* son aquellos OS que son sintetizados primero, se caracterizan porque en general, su estructura se usa como base para sintetizar a los OS complejos, que conforme pasa el periodo de lactancia, su estructura se hace más grande al añadirse los residuos monosacáridos (Tabla 2 y 3).

NOMBRE TRIVIAL	ESTRUCTURA
Lactosa	Galβ1-4Glc
Lacto-N-tetraosa tipo 1	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \text{---} \text{3GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \end{array}$
Lacto-N-neo- tetraosa tipo 2	$\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc}$
Lacto-N-hexaosa	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1 \text{---} \text{3GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \end{array}$
Lacto-N-octaosa	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1 \text{---} \text{3GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \end{array}$
Lacto-N-decaosa	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1 \text{---} \text{3GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1 \text{---} \text{3GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \end{array}$
Lacto-N-dodecaosa	$\begin{array}{c} (\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1)_{0/1} \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ (\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1)_{0/1} \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \text{3Gal}\beta 1\text{-4Glc} \\ \text{Gal}\beta 1\text{-3/4GlcNAc}\beta 1 \text{---} \end{array}$

Tabla 2: Estructura de oligosacáridos *core* (Kunz y col., 2000)

NOMBRE TRIVIAL		ESTRUCTURA
2'-fucosil-lactosa	2'-Fuc-lac	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc
3-fucosil-lactosa	3-Fuc-lac	Gal β 1-4Glc 3 1 Fuc α
3'-sialil-lactosa	3'NeuAc-3-Fuc-lac	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc 3 1 Fuc α
difucosil-lactosa	Fuc ₂ -lac	Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc 3 1 Fuc α
Lacto-N-tetraosa tipo 1	LNT	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Lacto-N-neo-tetraosa tipo 2	neo-LNT	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Lacto-N-fucopentaosa I	LNFP I	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc
Lacto-N-fucopentaosa II	LNFP II	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 4 1 Fuc α
Lacto-N-fucopentaosa III	LNFP III	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 3 1 Fuc α
Lacto-N-fucopentaosa V	LNFP V	Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 3 1 Fuc α
Lacto-N-difuco-hexaosa I	LNDFH I	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc 4 1 Fuc α

Tabla 3: Estructura de los oligosacáridos complejos (Kunz y col., 2000)

2.1.1 Efecto anti-infeccioso de los oligosacáridos de la leche humana

Los OS de la leche humana ejercen un efecto anti-infeccioso a través de dos mecanismos: inhibiendo la colonización y el crecimiento de patógenos, y ejerciendo un efecto prebiótico (Gudiel-Urbano y Goñi, 2001).

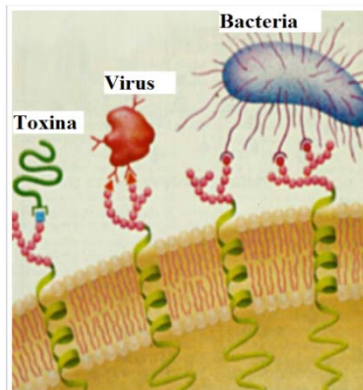


Figura 2: Efecto anti-infeccioso de los oligosacáridos (Bode, 2009).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que los OS de la leche humana tienen una estructura semejante a la de los receptores específicos carbonatados de bacterias, toxinas y virus, de modo que actúan como receptores competitivos en las células del epitelio intestinal del huésped (Miñana, 2007), son potentes inhibidores de la adherencia impidiendo la etapa inicial de los procesos infecciosos y colonización (Figura 2) (Kunz y col., 2000; Gudiel-Urbano y Goñi, 2001).

El principio se basa en el reconocimiento proteína-carbohidrato que se establece entre las lectinas microbianas y los glicoconjugados de la superficie celular. Lo anterior permite a la bacteria adherirse y posteriormente colonizar e invadir al epitelio intestinal (Heithoff y col., 1997). Este es el mecanismo que emplea *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, algunas especies de *Salmonella* y cepas de *Shigella*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (Ofek y Sharon., 1990; Sharon, 2006)

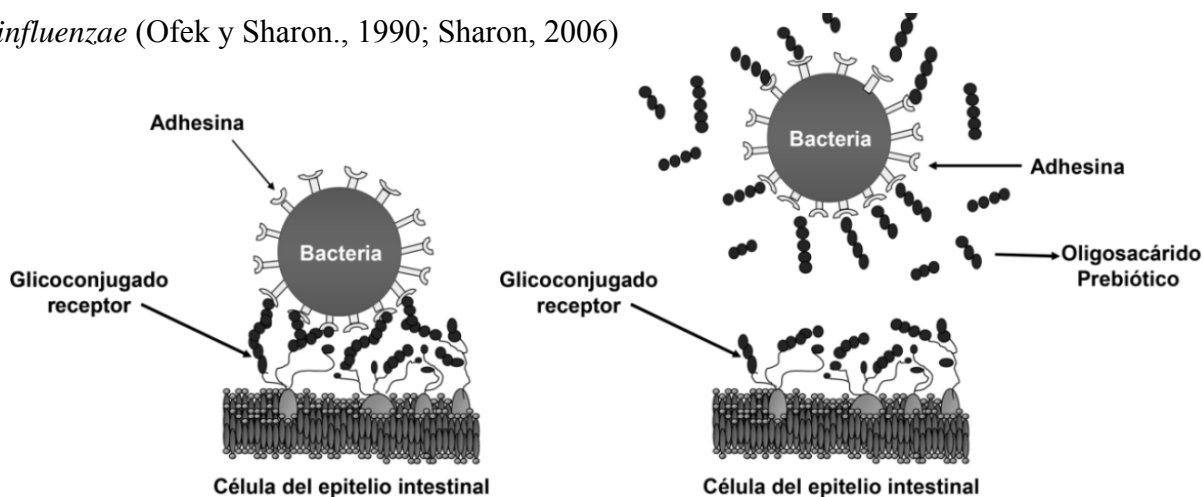


Figura 3: Modelo de acción directa de los oligosacáridos como prebióticos en la prevención de infecciones (Domínguez y col., 2007).

En la figura 3 se muestra la forma en que participan los OS ejerciendo su efecto prebiótico. Las adhesinas bacterianas reconocen a los receptores oligosacáridos en las células del epitelio intestinal. La inhibición de la adhesión bacteriana se da por los prebióticos con estructuras similares a los glicanos receptores (Domínguez-Vergara y col., 2009).

La tabla 4 muestra algunos agentes enteropatógenos que son inhibidos por la acción de los OS, como son bacterias, virus y toxinas.

Tabla 4: Oligosacáridos de leche humana que inhiben agentes enteropatógenos		
Estructura	Agente patógeno	Referencia
Oligosacáridos no fucosilados	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (adhesión <i>in vitro</i>) <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (adhesión <i>in vitro</i>) <i>Listeria monocytogenes</i>	Andersson y col., 1986; Gudiel-Urbano y Goñi, 2001; Miñana, 2007) Cravioto y col., 1991 Coppa y col., 2003
Oligosacáridos fucosilados	<i>Campylobacter jejuni</i> (adhesión <i>in vitro</i> , infección <i>in vivo</i>) <i>Vibrio cholerae</i> Enterotoxina termoestable de <i>E. coli</i> (unión al receptor <i>in vitro</i> , diarrea inducida <i>in vivo</i> y unión al receptor de la toxina) Calicivirus	Ruiz-Palacios y col., 2003 Ruiz y col., 2003 Newburg y col., 1999 Miñana, 2007

2.1.2 Efecto prebiótico de los oligosacáridos de la leche humana

Los prebióticos son compuestos no digeribles que muestran algunos efectos biológicos positivos en humanos, tales como estimulación selectiva del crecimiento o bioactividad de un número limitado de microorganismos benéficos presentes o terapéuticamente introducidos en el intestino, estos compuestos deben ser resistentes hasta su llegada al colon y no ser fermentados por la microflora no benéfica a lo largo del intestino (Gibson y col., 2004, Boehm y Stahl, 2007). Los primeros oligosacáridos reconocidos como prebióticos fueron los de la leche humana al demostrarse su efecto bifidogénico en el intestino de los infantes (Domínguez-Vergara y col., 2009).

Dentro de las numerosas bacterias anaerobias presentes en el intestino, las Bifidobacterias y Lactobacilos son las que consumen prebióticos, estos microorganismos pueden inhibir el

crecimiento de bacterias putrefactivas (*Clostridium perfringens*) y patogénicas (*E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* y *Shigella*) causantes de un gran número de enfermedades gastrointestinales (Iwasaki y col., 1996, Mussatto y Mancilha, 2007). Para que los OS de la leche humana sean considerados prebióticos deben cumplir las siguientes características:

1. Ser resistentes a los ácidos gástricos, a la hidrólisis por enzimas presentes en el tracto gastrointestinal y a la absorción.
2. Ser fermentables por la microflora intestinal benéfica.
3. Estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de las bacterias intestinales asociado a la salud y el bienestar tales como Bifidobacterias y Lactobacilos (Gibson y col., 2004). Los OS de la leche humana pueden ser factores de crecimiento para la llamada flora bífidus en leche materna (Figura 4) (Kunz y col., 2000).

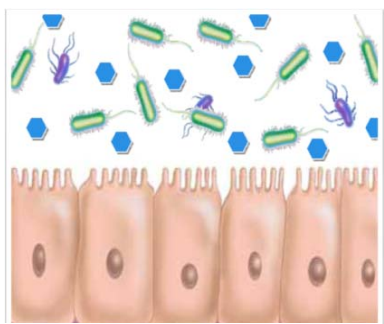


Figura 4: Efecto prebiótico de los oligosacáridos de la leche humana (Bode, 2009).

La mayor parte de los efectos fisiológicos de los OS están relacionados con su capacidad para ser digeridos en el intestino delgado. Aquellos que no son degradados por las enzimas digestivas son considerados como fibra dietética de la leche materna, ya que ejercen un efecto fisiológico similar a la fracción soluble de dicha fibra. Aproximadamente el 60% son utilizados parcial o totalmente por la microflora, se estima que el 40 % restante se excreta en las heces y un 1% es absorbido y excretado en la orina (Gudiel-Urbano y Goñi, 2001)

Las principales acciones benéficas derivadas de la presencia de una flora con predominio de bacterias benéficas son:

1. Metabólicos. La fermentación de los OS con formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como propiónico, butírico y acético.
2. Nutricional. El género de *Bifidobacterium* favorece la síntesis de vitaminas B6 y B12, tiamina, ácido fólico y ácido nicotínico. Así mismo, los AGCC favorecen la adsorción de

calcio, hierro y zinc, debido a que el bajo pH produce un aumento de solubilidad y una mayor absorción por difusión pasiva.

3. Trófica. El butirato supone una importante fuente de energía (60-70%) del colonocito. Además los AGCC producidos por fermentación de los OS (propiónico, butírico y acético) favorecen el crecimiento y diferenciación de células epiteliales *in vivo*.
4. Protectora e inmunomoduladora. La barrera intestinal inmadura puede favorecer una transferencia aumentada de antígenos, lo que produce inflamación y el consiguiente aumento de permeabilidad y riesgo de enfermedades alérgicas (Miñana, 2007).

En la figura 5 se engloban los efectos anti-infeccioso y prebiótico de los OS de leche humana. El efecto anti-infeccioso se relaciona con su acción sobre la microflora benéfica del hospedador, es decir, con el crecimiento de los lactobacilos y bifidobacterias que permite excluir a los patógenos del tracto gastrointestinal a través de la competencia por los sitios de adhesión en la mucosa. El efecto prebiótico se genera por la disminución del pH, debida a la fermentación de los OS en el colon, dando lugar a la producción de AGCC (Dominguez y col., 2009) y la producción de sustancias inhibidoras como las bacteriocinas (Morrow y Rangel, 2004, Wang y Brand, 2003). Por otro lado, hay evidencia de que las bifidobacterias y lactobacilos pueden modular el sistema inmune de su hospedero desencadenando una respuesta de defensa contra la infección (Figura 5) (Fanaro y Vigi, 2008).

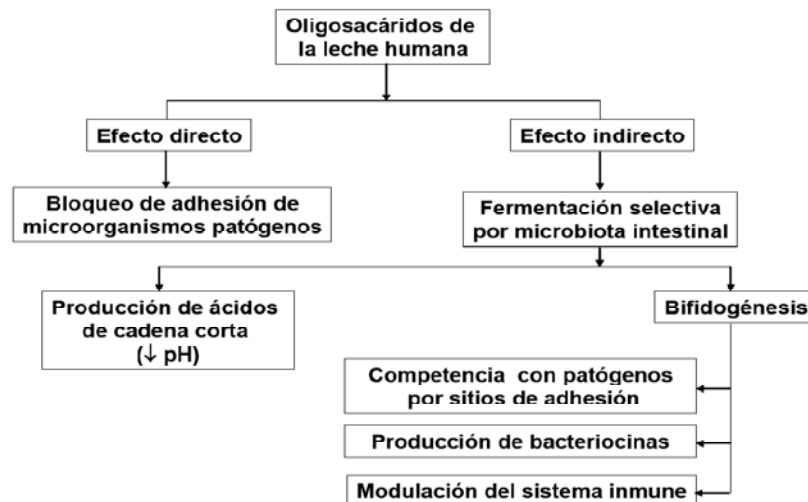


Figura 5: Efecto protector de los OS de la leche humana contra infecciones microbianas (Dominguez y col., 2009).

2.1.3 Efecto sistémico de los oligosacáridos de la leche humana

Existe evidencia de que los OS de la leche humana pueden absorberse parcialmente, permaneciendo en el torrente sanguíneo e induciendo algunos efectos sistémicos (Engfer y col., 2000; Gnoth y col., 2000). Algunos de estos carbohidratos pueden ser reconocidos por selectinas relacionadas con procesos inflamatorios, mediante este reconocimiento del tipo lectina-carbohidrato son capaces de modular la adhesión de leucocitos, monocitos, linfocitos y neutrófilos, ejerciendo un efecto anti-inflamatorio que posiblemente contribuya a la disminución de la incidencia de enfermedades inflamatorias en el infante (Kannagi, 2002; Bode y col., 2004b).

2.2 Oligosacáridos fucosilados: Síntesis *in vivo*.

Los OS más abundantes en la leche humana son los neutros o fucosilados, que en su estructura poseen enlaces α (1-2) fucosa ó α (1-3) fucosa y su composición varía según la etnia de la madre y la etapa de lactancia (Chaturvedi y col., 2001; Miñana, 2007).

La síntesis de OS fucosilados se da mediante reacciones de fucosilación (que es un proceso crítico en la síntesis *in vivo* de muchas cadenas de interés biológico como los glicoconjugados) catalizadas por la acción de distintas enzimas en un proceso de varias etapas, por un lado, la lactosa es sintetizada en una reacción donde interviene glucosa y UDP-gal (uridina-5-difosfato-galactosa) y por otro se genera la GDP-fucosa (guanosina-5'-difosfato-fucosa) a partir de GDP-manosa (guanosina-5'-difosfato-manosa) ambos compuestos posteriormente deberán encontrarse en el aparato de Golgi donde se lleva a cabo las síntesis de una gran variedad de fucosil-oligosacáridos . La adición de Fuc depende de las acciones de al menos tres diferentes fucosil-transferasas (FucT) en un proceso determinado genéticamente (Morrow y col., 2005).

2.2.1 Síntesis de lactosa.

La lactosa (β -galactosil (1-4) glucosa) es un disacárido típico de los mamíferos de cuya síntesis se encarga la lactosa sintetasa en la glándula mamaria. El azúcar donante es la UDP-

galactosa que se forma mediante epimerización de la UDP-glucosa. El azúcar aceptor es la glucosa.

La lactosa sintetasa presenta dos subunidades:

- 1) Galactosiltransferasa: es la subunidad catalítica que realiza la reacción de UDP-galactosa y NAcGlc para sintetizar N-acetil-lactosamina, un constituyente de muchos OS complejos.
- 2) α -lactoalbúmina, una proteína de la glándula mamaria sin actividad catalítica que altera la especificidad de la galactosiltransferasa, de manera que ésta utiliza glucosa como aceptor para formar lactosa en vez de lactosamina (Voet y Voet, 2006).

2.2.2 Síntesis de GDP-fucosa.

La síntesis de GDP-fucosa se puede realizar mediante dos rutas: la vía de “*novo*” a partir de GDP-manosa y la ruta de salvamento a partir de fucosa extracelular o proveniente de los lisosomas celulares generada por una α -fucosidasa (Figura 6).

La producción de fucosil-oligosacáridos implica la formación de enlaces glucosídicos (con unión entre el C1, el carbono anomérico de una de las unidades y un OH de la segunda unidad). Se conocen alrededor de 80 clases diferentes de enlaces glucosídicos que se forman de manera natural en la célula. Bajo condiciones fisiológicas naturales, la formación de enlaces glucosídicos requiere el aporte de energía libre ($\Delta G^{\circ} = 16 \text{KJmol}^{-1}$) que se adquiere mediante la conversión de unidades de monosacáridos a nucleótidos azúcares, ya que un nucleótido en un átomo de carbono anomérico es un buen donador de grupo azúcar que facilita la formación de enlace glucosídico con una segunda unidad azúcar mediante reacciones catalizadas por glicosiltransferasas (Voet y Voet, 2006).

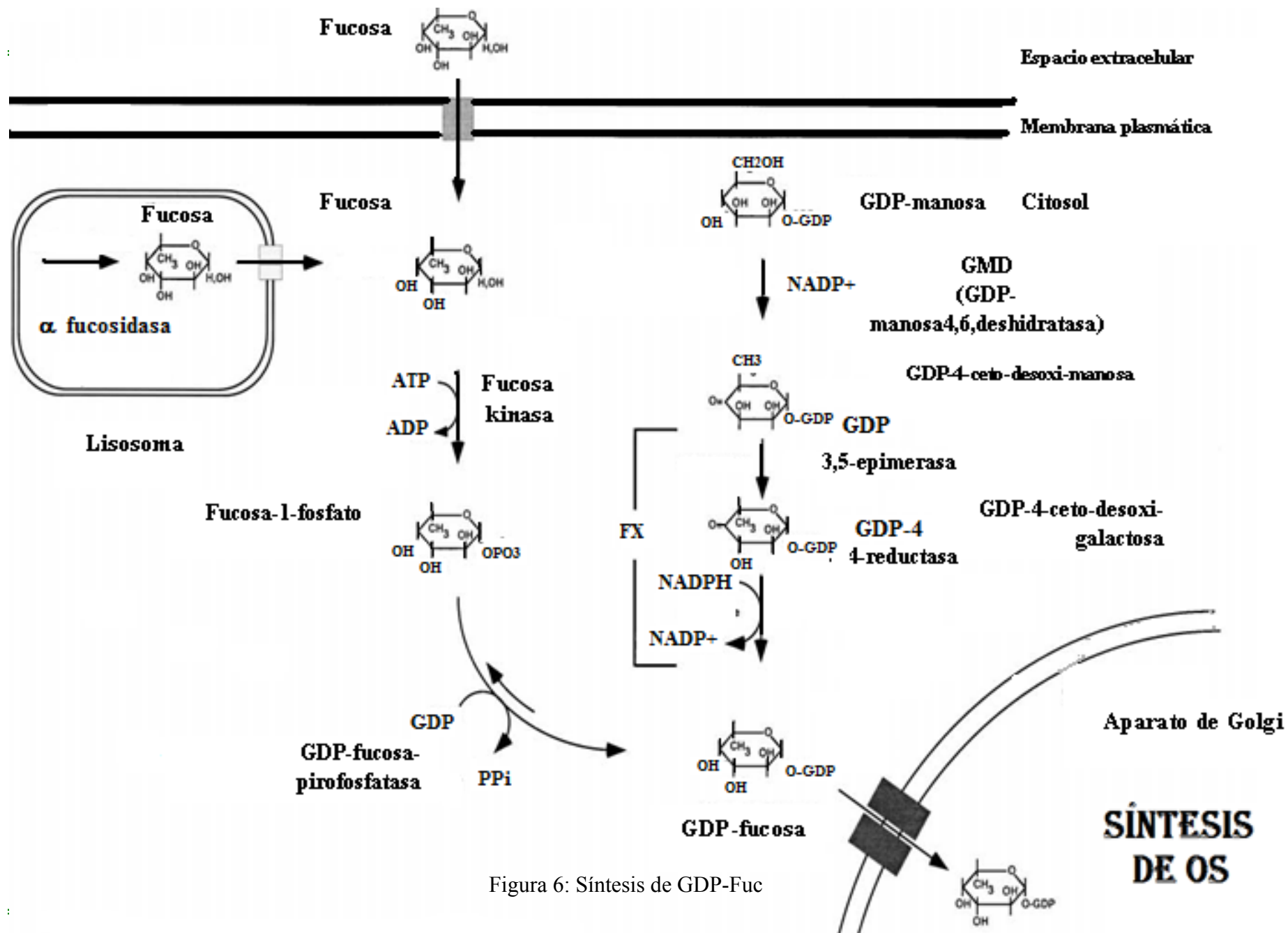


Figura 6: Síntesis de GDP-Fuc

2.2.3 Síntesis de OS de la leche humana

Los OS se forman a partir de lactosa por medio de glicosiltransferasas (GT), de modo que se generan los tres OS centrales o *core*: lactosa, lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neo-tetraosa (LNnT).

Estas tres moléculas darán distintos compuestos por medio de fucosilación mediante la acción de las FucT, de modo que el enlace fucosa se realiza en la posición α (1-2) o α (1-3/4) (Miñana, 2007). La adición de fucosa es dependiente de distintas FucT:

FucT-2: esta enzima está determinada por el gen *Se*. Da lugar a OS con enlaces α (1-2) de fucosa. Los más importantes son: Lacto-N-fuco-pentaosa I (LNF-I) o antígeno H1 que se forma al actuar la FucT-2 sobre la LNT, 2' fucosil-lactosa (2'FL) o antígeno H2, sintetizada al actuar la FucT-2 sobre la lactosa.

FucT-3: Enzima controlada por determinantes genéticos del gen *Le* (Lewis). Da lugar a OS con enlaces α (1-3/4) oligosacáridos 3-fucosa. Los más importantes son: Lacto-N-fucopentaosa II (LNF-II) o antígeno Lewis a, que se forma al actuar la FucT-3 sobre la LNT, 3fucosil-lactosa (3'FL) o antígeno Lewis x, al actuar la FucT-3 sobre la lactosa y Lacto-N-fucopentaosa III (LNF-III) o Lewis x al actuar la FucT-3 sobre la LNnT.

Cuando están presentes ambas enzimas se puede formar la Lacto-N-difucohexaosa (LDFH-I), o antígeno Lewis b y Lacto-difucosil-tetraosa (LDFT), o antígeno Lewis y. La FucT-2 está presente en el 77% de la población caucásica (Albermann y col, 2001).

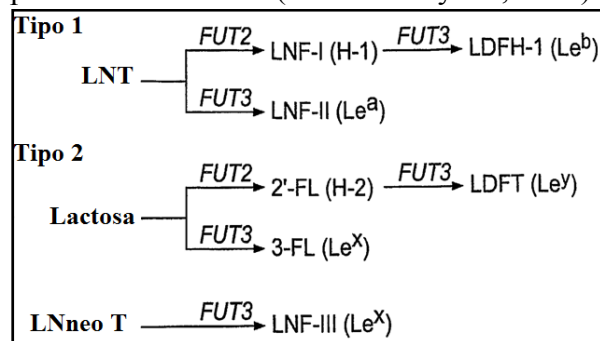


Figura 7: Estructuras de los OS sintetizados por FucT que están determinadas por el gen *Se* ó *Le* (Morrow y col., 2005).

2.3 Oligosacáridos fucosilados: Síntesis *in vitro*

En los últimos años se ha despertado un gran interés en el estudio de los OS por su importancia y participación en múltiples funciones biológicas como parte de glicoconjugados: glicoproteínas y glicolípidos (Nilsson y col., 1995). Los procedimientos para su obtención son mediante la purificación de fuente natural o recombinante que es un proceso muy complejo y costoso y la obtención mediante síntesis química o enzimática (Bing y col., 2006).

2.3.1 Síntesis de OS mediante reacciones químicas

Las técnicas de química orgánica usadas para la síntesis de las estructuras de los carbohidratos se realizan mediante protección de grupos químicos, que es un procedimiento complicado que implica muchos pasos y el uso de reactivos costosos que lo hace un procedimiento desfavorable para la síntesis a gran escala (Nilsson, 1993; Nilsson y col., 1995).

La Ferla y col. (2002) estudiaron la síntesis de OS fucosilados con grupos protegidos derivados de lactosamina, ya que estudios de las estructuras de OS complejos revelaron que un gran número de ellos contienen Gal $\beta(1-3)$ GlcNAc (número 1 en la figura 8) y Gal $\beta(1-4)$ GlcNAc (lactosamina) (número 2 en la figura 8) como estructura base, la primera estructura unida a una o dos molécula de fucosa en la posición 2-Gal ó 4 de lactosamina y la segunda unida a una o dos moléculas de fucosa en posición 3 GlcNAc y 2-Gal (La Ferla y col., 2002).

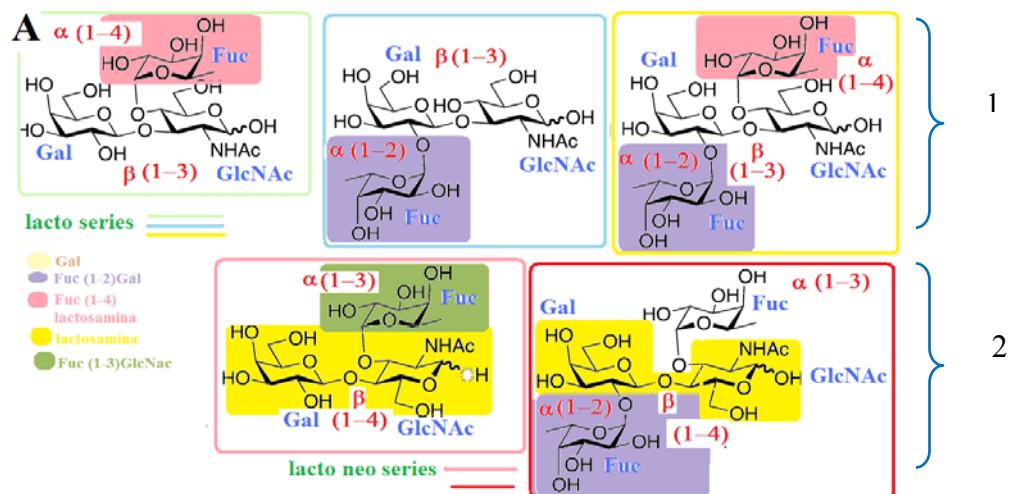


Figura 8: Derivados fucosilados de lactosamina que forman parte como estructura base de muchos OS complejos.

La estrategia empleada para la producción de sacáridos con grupos protegidos se basa en la fucosilación de un disacárido precursor obtenido mediante el método descrito por Toepfer y Schmidt, 1993 (Figura 9).

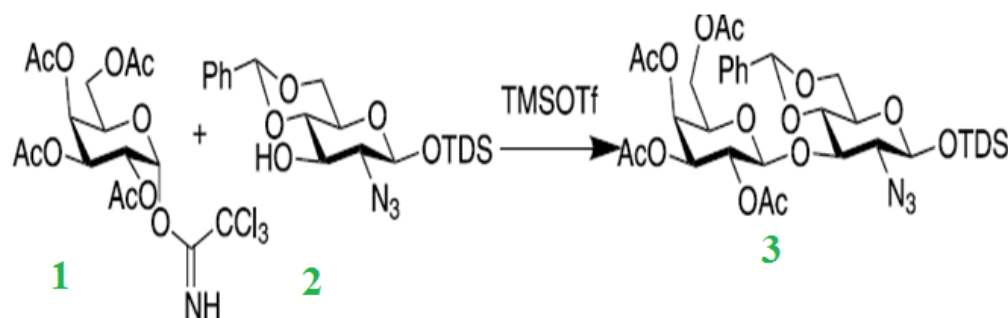


Figura 9: Disacárido precursor para la síntesis de derivados fucosilados de lactosamina descrito por Toepfer y Schmidt, 1993

TMSOTf= Trimetil silil trifluorometano sulfonato; Ac= acetilo; Ph PhCH(R)₂= bencilideno

3=Thexyldimethylsilyl 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil-(1-3)-2-acido-4,6-O-bencilideno-2-desoxi-β-D-glucopiranosido

El disacárido precursor (número 3 en figura 9) se manipuló por métodos químicos con el fin de obtener diferentes aceptores glicosil para las reacciones de fucosilación. En la figura 10 se muestra el proceso de obtención de una de las estructuras de los derivados de lactosamina (letra A de figura 8) después de que la estructura ha sido protegida por procesos químicos (número 7 en figura 10).

El procedimiento consiste en la remoción del grupo bencilideno del compuesto 3 seguido de una acetilación selectiva a baja temperatura con cloruro de acetilo generándose el aceptor 5, el aceptor 5 es fucosilado con el donador 6 usando como promotor TMSOTf generándose la estructura protegida 7 (Figura 10).

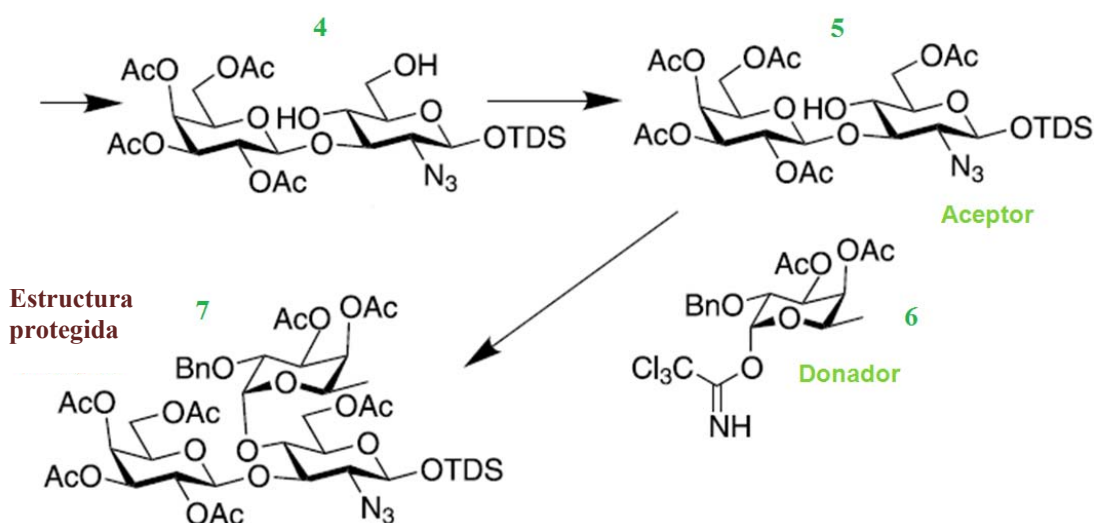


Figura 10: Síntesis química de OS protegidos empleados como bloques de construcción para la síntesis de OS complejos.

5= 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil-(1-3)-6-acetil-2-acido-2-desoxy-β-D-glucopiranosido

6= 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil-(1-3)-2-acido-2-desoxy-β-D-glucopiranosido

Las estructuras con grupos protegidos sintetizados por La Ferla y col. (2002) son útiles como bloques de construcción para sintetizar OS complejos.

2.3.2 Síntesis de OS mediante reacciones enzimáticas

El empleo de enzimas para la síntesis selectiva de OS parece ser una buena alternativa debido a que estos biocatalizadores poseen una alta selectividad de sustrato y regioselectividad. Por tanto, las glicosidasas y las glicosiltransferasas (FucT) han sido empleadas para este fin. Ambas enzimas presentan algunas desventajas. Las glicosidasas son enzimas abundantes en la naturaleza y pueden ser utilizadas purificadas ya que son ampliamente disponibles, sin embargo, el uso como biocatalizadores para la síntesis, poseen con frecuencia baja regioselectividad dando como resultado una complicada mezcla de productos y por lo tanto problemas en la purificación, por tal motivo, no son adecuadas para la síntesis de OS con mayor grado de polimerización.

Las glicosiltransferasas, en cambio, muestran una alta regioselectividad pero se encuentran frecuentemente en pequeñas cantidades en células vivas y por tanto son de baja disponibilidad,

además de ser dependientes de un cofactor (Nilsson, 1993, Nilsson y col, 1995). *In vitro* se ha estudiado el empleo de glicosiltransferasas (Scheppokat y col., 2003) para la síntesis de fucosil-oligosacáridos ya que no se tiene la necesidad de protección química del sustrato como sería necesario en la síntesis química. De este modo se ha logrado sintetizar 2'fucosil-lactosa (2'FL) empleando enzimas recombinantes para la formación de GDP-fucosa y la posterior fucosilación con FucT clonadas y sobreproducidas en el laboratorio, simulando la vía de síntesis que se sigue en las células de glándulas mamarias para la síntesis de OS de leche humana (Albermann y col., 2001).

El primer paso para la síntesis de 2'fucosil-lactosa por esta vía es la síntesis de GDP-fucosa a partir de GDP-manosa mediante enzimas recombinantes de bacterias (la GDP-D-manosa 4,6-deshidratasa y la GDP-4-ceto-6-desoxy-D-manosa 3,5-epimerasa-4-reductasa de *Escherichia coli* K-12). Es una reacción de tres pasos, el primer paso es la oxidación en C4 del anillo de manosa y la consiguiente reducción del C6. Esto se lleva a cabo por una enzima dependiente de NADP, GDP-manosa 4,6 deshidratasa (GMD). Los siguientes dos pasos de la reacción es la epimerización y reducción que se llevan a cabo por una sola enzima con una doble función GDP-fucosa sintetasa (GFS) (Figura 11)

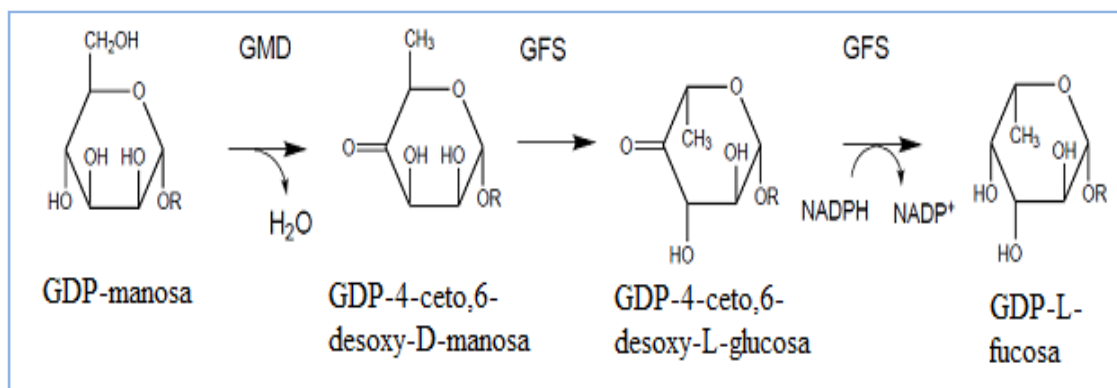


Figura 11: Síntesis de GDP-L-fucosa: GDP-D-manosa, GMD (GDP-manosa 4,6 deshidratasa, GFS GDP-fucosa sintetasa. (Albermann y col., 2001)

Una vez sintetizado el GDP- α -L-fucosa, la fucosa del fucósido se transfiere a lactosa, mediante una FucT previamente clonada de *Helicobacter pylori* para generar la 2'FL que es aislada por cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel con un alto rendimiento (Figura12) (Albermann y col., 2001).

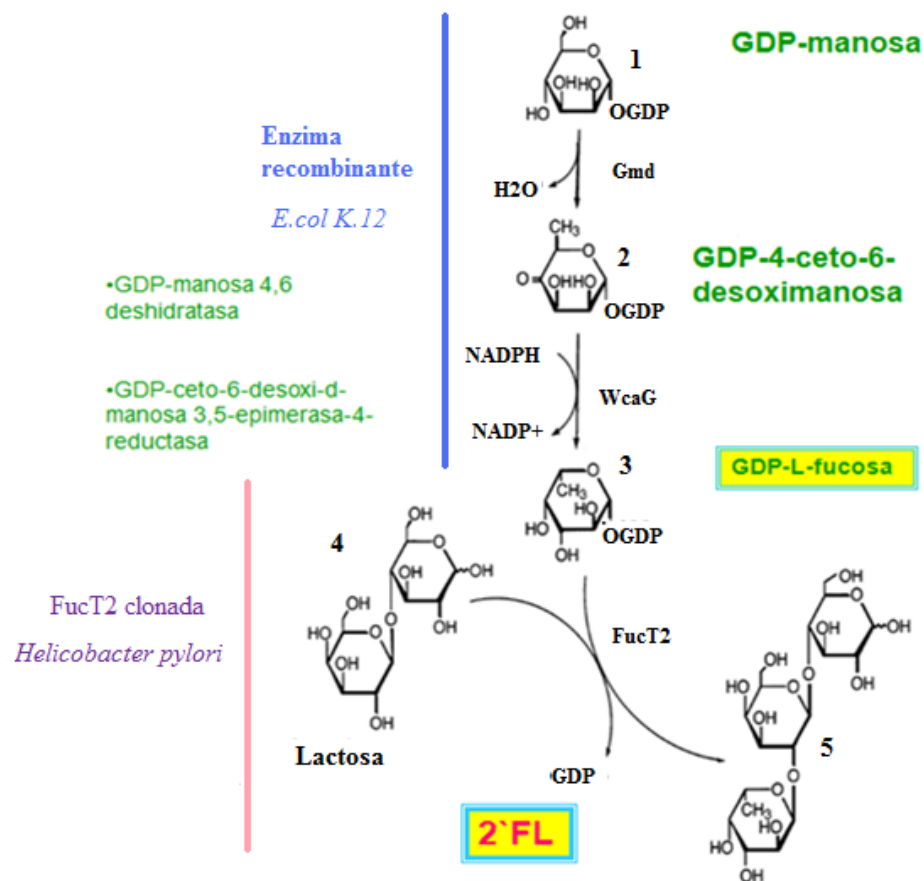


Figura 12: Síntesis de 2' fucosil-lactosa mediante el empleo de FucT2 (Albermann y col., 2001).

2.3.3 Síntesis de OS mediante combinación entre reacciones químicas y enzimáticas

Una alternativa más para la síntesis de OS es una combinación de ambos métodos tanto químico como enzimático (Figura 13). Nilsson y col. (1995) lograron sintetizar homólogos a las estructuras de Lewis *a* (Galβ 1-3(Fuc α1-4)GlcNAc) y Lewis *x* (Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAc). Estas estructuras son OS fucosilados y son de importancia biológica, ya que pueden actuar como inhibidores de selectinas (moléculas involucradas en la unión de linfocitos en los sitios de inflamación). Para la síntesis químico-enzimática se usó la α-L-fucosidasa, como sustratos donadores emplearon p-nitrofenil-α-L-fucopiranosido (PNP-α-Fuc) y como sustrato aceptor glucosamina previamente sustituida con dos grupos químicos: un grupo tioetil que ocupa la posición 1 y un grupo bencil que se encuentra en la posición 6 de la

glucosamina, de este modo la α -fucosidasa únicamente genera enlaces en las posiciones 3 y 4, dirigiendo la reacción a la formación de los enlaces presentes en las estructuras de Lewis, una vez obtenido el disacárido, se adiciona galactosa mediante transgalactosilación (Nilsson y col., 1995).

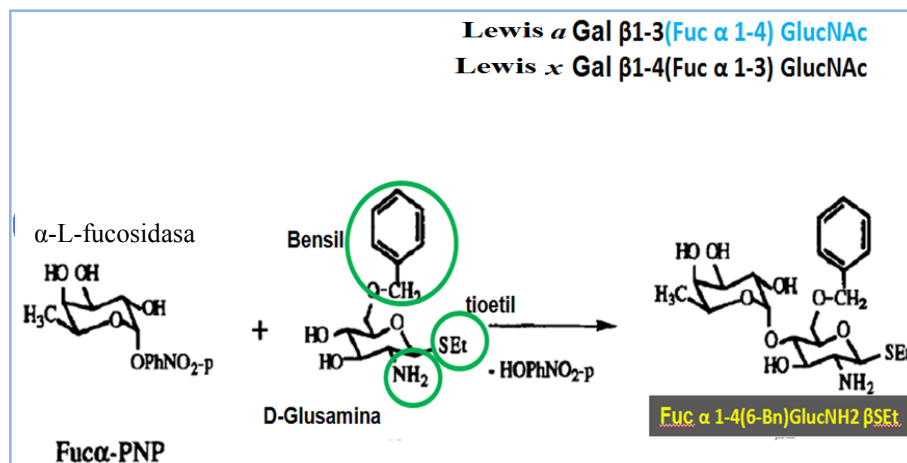


Figura 13: Síntesis de homólogos a las estructuras de Lewis a/x mediante el empleo de glicosidasas

2.4 Mecanismo de acción de las glicosil-transferasas

La biosíntesis de OS en las células de las glándulas mamarias implica la acción de cientos de diferentes GT que catalizan la transferencia de unidades de azúcar a partir de moléculas donadoras activadas a moléculas aceptoras específicas y la formación de enlaces glicosídicos. Las GT se pueden agrupar por su mecanismo de reacción ya sea de conservación o inversión del OH del carbono anomérico (Figura 14) (Ichikawa y col., 1992).

El mecanismo de inversión para las GT es probable que siga un desplazamiento único en el que el aceptante realiza un ataque nucleofílico en el carbono C-1 del donante de azúcar (análogo al mecanismo de inversión de GH). Por otra parte, el mecanismo de retención no parece funcionar a través de un mecanismo de dos pasos, en su lugar se propuso un mecanismo de retorno interno, en la que la salida del grupo y el ataque nucleofílico se producen de forma concertada, pero asincrónica en la misma cara del glucósido (Lairson y col., 2008)

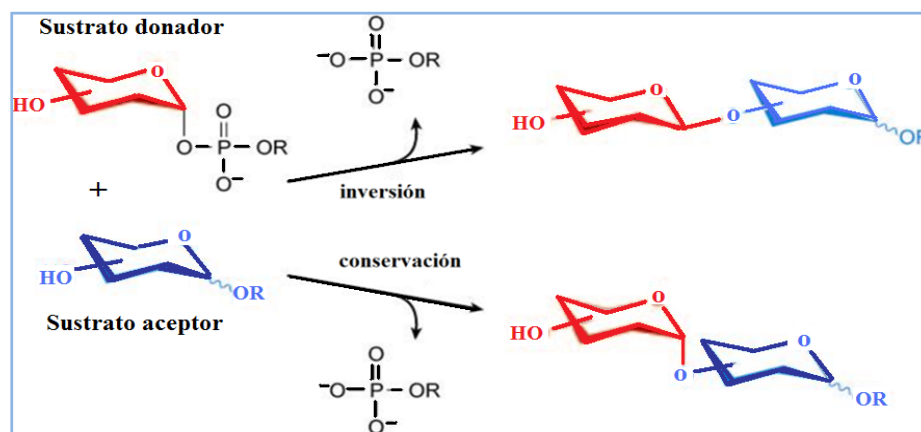


Figura 14: Mecanismos de acción de las glicosiltransferasas.

Dependiendo de la naturaleza de la molécula donadora, las glicosiltransferasas se clasifican en: glicosiltransferasas tipo Leloir (que requieren de un azúcar nucleótido por ejemplo, la UDP-glicosiltransferasas), glicosiltransferasas tipo no Leloir (utilizan azúcar-1-fosfato por ejemplo fosforilasas), y transglicosidasas que no requieren un grupo glucosil activado.

Una característica distintiva de las transglicosidasas, en comparación con las glicosiltransferasas tipo Leloir y no Leloir, es que también muestran cierta actividad hidrolítica que puede considerarse como una transferencia de un grupo glicosil desde el donante al agua (similar a las glicosidasas).

Los principales problemas asociados con la síntesis con glicosiltransferasas son: la necesidad de nucleótidos de azúcar o azúcares fosfato como sustrato, el efecto inhibitorio del nucleótido fosfato en libertad, y la disponibilidad limitada de estas enzimas. Sin embargo, el progreso continuo en el estudio de estas enzimas, la clonación de nuevas variantes, y la aplicación de la evolución molecular y mutagénesis dirigida para un mejor rendimiento está mejorando su potencial para su uso en la síntesis de oligosacáridos (Planas y Faijes, 2002).

2.5 Mecanismo de acción de las glicosil-hidrolasas

Las GH (también llamadas glicosidasas) son un amplio grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glucosídico entre dos o más hidratos de carbono o entre un carbohidrato y una fracción que no sea un hidrato de carbono, junto con glicosiltransferasas, forma la maquinaria para la síntesis e hidrólisis de enlaces glucosídicos. Las GH pueden ser clasificadas de acuerdo al

esquema EC (EC 3.2.1 como enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces O/S-glucósidos), de acuerdo con su mecanismo molecular (conservación o inversión) y recientemente en la similitud de secuencia de aminoácidos (familias y clanes: secuencias relacionadas con más de una familia) (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>)

Además de las glicosiltransferasas, las glicosidasas también puede ser utilizadas para la síntesis *in vitro* de oligosacáridos ya que, en condiciones adecuadas, la reacción hidrolítica normal puede revertirse hacia síntesis de enlace glucosídico (Ajisaka y Yamamoto, 2002; Scigelova y col., 1999). Las glicosidasas catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos en oligo-y polisacáridos con un alto grado de estereoespecificidad.

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

En el mecanismo de inversión, las enzimas utilizan dos residuos enzimáticos (normalmente residuos carboxílicos) que actúan como un ácido y una base respectivamente, como se muestra en la figura 15 para la β -glucosidasa.

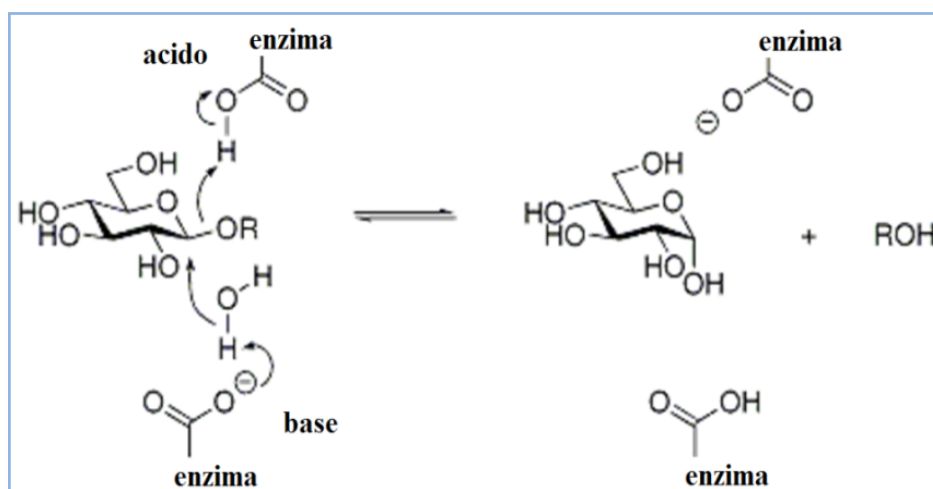


Figura 15: Mecanismo de inversión para la β -glucosidasas

En el mecanismo de conservación (Figura 16), las enzimas actúan mediante un mecanismo de dos etapas. Dos residuos se ven involucrados, uno actúa como nucleófilo y el otro como un ácido o base. En el primer paso el nucleófilo ataca el centro anómero, dando como resultado la formación de una enzima glucosídica intermedia con un carácter ácido provisto por el carboxilato ácido. En el segundo paso el ahora desprotonado carboxilato ácido actúa como base y se une a una molécula de agua nucleofílica para hidrolizar la enzima intermedia, dando el producto hidrolizado.

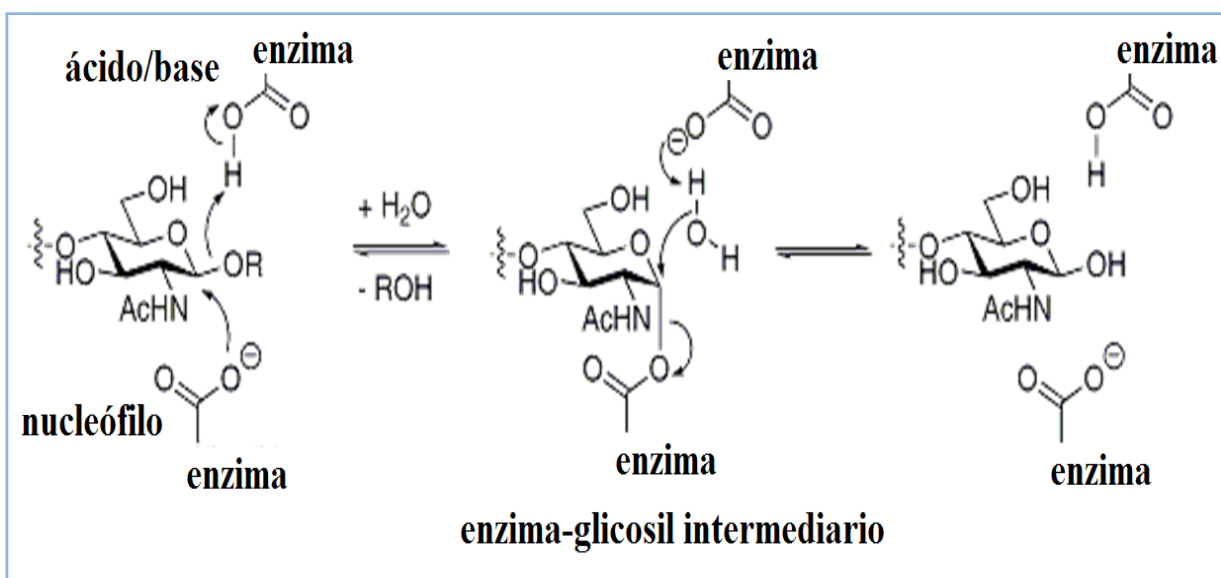


Figura 16: Mecanismo de conservación para la β -glucosidasas.

Los factores que determinan el rendimiento para la síntesis de OS son: la concentración inicial de sustrato, el pH, temperatura, fuerza iónica, composición de disolvente, etc. Para desplazar el equilibrio hacia la síntesis se han seguido algunas estrategias como el uso de altas concentraciones de sustrato, uso de disolventes orgánicos para reducir la actividad de agua, la utilización del aceptor en el medio de reacción, uso de altas temperaturas (glucosidasas termoestables e hipertermofílicas) (Bhatia y col., 2002). Sin embargo, los rendimientos obtenidos son generalmente bajos (≤ 20) (Plou y col., 2007).

2.6 Hidrolasas empleadas en este estudio

Las hidrolasas (EC 3.2.1) son un amplio grupo de enzimas que hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o más hidratos de carbono o entre un carbohidrato y una porción no hidratos de carbono. son enzimas catabólicas cuya actividad óptima tiene lugar a un pH cercano a 5. Dichas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces éster, éter, peptídicos, C-C. (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>)

2.6.1 α -fucosidasa de riñón de bovino (*Bos taurus*)

La alfa-fucosidasa (α -L-fucosida hidrolasa) es una enzima lisosomal responsable de la hidrólisis de la fucosa en enlaces α (1-2/3/4/6) unida al extremo no reductor de N-acetilglucosamina de los carbohidratos de las glicoproteínas. (<http://www.ebi.ac>, <http://www.expasy.org>). Esta enzima cataliza la reacción de un α -L-fucósido mas agua para generar un alcohol mas L-fucosa (<http://www.biochem.ucl.ac>, <http://www.expasy.org>) se ha empleado para el análisis de N y O glicanos fucosilados, glicoconjugados, glicolípido y OS determinantes de grupos sanguíneos (sigma-aldrich.com). Algunas características reportadas en la base de datos para enzimas “Brenda” se muestran a continuación (<http://www.brenda-enzymes.info/>).

Tabla 5: Características de la α -fucosidasa de *Bos taurus*

K_M [mM]	0.75	Estabilidad de la temperatura	50°C
Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	0.37	Estabilidad en solventes	Desconocida
Estabilidad del pH	4.5-6	Estabilidad a la oxidación	Desconocida
pH óptimo	5.3	Clonación	No conocida
pH máximo	5.5	Purificación	Técnicas cromatográficas
Longitud de secuencia (aa)	468	Masa (Da)	54,089
Gen	FUC1	Localización celular	Lisosomal
http://www.brenda-enzymes.org			

Una unidad de fucosidasa hidroliza 1 μmol de p-nitrofenil- α -L fucósido en p-nitrofenol y L-fucosa por minuto a pH 5.5 a 25 ° C.

2.6.2 α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Esta enzima hidroliza el extremo terminal no reductor α (1-4) de un α -D-glucósido liberando α -D-glucosa. Una unidad de glucosidasa libera 1 μ mol de D-glucosa a partir de p-nitrofenil α -D-glucósido por minuto a pH 6.8 a 37 °C. Algunos parámetros cinéticos reportados en la base de datos para enzimas “Brenda” se muestran a continuación (<http://www.brenda-enzymes.info/>)

Tabla 6: Características de la α -glucosidasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
K_M [mM] (maltosa)	14.3
Actividad específica (μ mol/min/mg) (maltosa)	70
Estabilidad del pH	4.2-7
pH óptimo	6.8
pH máximo	7.5

2.6.3 Glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02

La glicosidasa hipertermofílica es una enzima recombinante producida como resultado de la manipulación genética por la compañía Recombinant Biocatalysis Inc., creada en 1994, y que posteriormente cambiaría su razón social a Diversa. La metodología usada se basa en el aislamiento de ácidos nucleicos directamente de muestras ambientales de hábitat extremos.

La librería de GLY 001 de glicosidasas contiene 10 enzimas termoestables, estas enzimas tienen la disposición para realizar actividades de glucosidasas, galactosidasas y fucosidasa.

Li y Wang (1997), determinaron la actividad de las β -galactosidasas recombinantes de este catálogo para la síntesis de N-acetil-lactosamina mediante reacciones de transgalactosilación a 70° C empleando O-nitrofenil-galactopiranosas y N-acetil-glucosamina.

Reportan que la GLY 001-01 tiene alto porcentaje de hidrólisis, sin haberse sintetizado lactosamina (Li y Wang, 1997). Un estudio comparativo entre las 10 β -galactosidasas del catálogo CloneZymes (GLY 001-01 a -10) analizó la especificidad para la formación de

enlaces. Se realizaron reacciones de transgalactosilación para la síntesis de lactosamina, empleando lactosa y glucosamina hidrociorada. Los resultados mostraron que la GLY 001-02 presentó una regioselectividad de 35/65 para la formación de enlaces (1-4)/ (1-6) (Fang y col., 1998).

La compañía ofrece algunos parámetros para esta enzima como: la determinación de la actividad enzimática en un espectro de 19 sustratos diferentes en su estructura y configuración anomérica, un rango de pH de 3-10 en el que la enzima hidroliza los β -glucósidos, un rango de temperatura en que la enzima está activa de 50-90°C y la estabilidad de la enzima, reportada es de 145 horas a 90°C.

Cruz-Hernández (1999) caracterizó la enzima Clonezyme GLY001-02 y reportó la K_M y V_{max} (Tabla 7) usando lactosa como sustrato a 90°C, fueron 234.41 mM y 5138.5 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ proteína, respectivamente. La actividad fue inhibida por los cationes Ca^{2+} y Na^{2+} , sin tener ninguna influencia en la adición de K^+ y Mg^{2+} (5mM) y fue activada significativamente por Mn^{2+} (5mM).

Tabla 7: Características de la β -glucosidasa hipertermofílica GLY 001-02	
K_M [mM] (lactosa)	234.41
Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	3121/ 5138*
Estabilidad del temperatura después de 145 h a 90°C	92%
Temperatura óptima	90°C
pH óptimo	4.5
(*Cruz-Hernandez, 1999;www. biocat.com)	

2.6.4 β -galactosidasa de *Escherichia coli*

La β -galactosidasa de *Escherichia coli* hidroliza el extremo terminal no reductor de β -galactósidos liberando galactosa. Una unidad de galactosidasa hidroliza 1 μmol de o-nitrofenil β -D-galactósido en o-nitrofenol y D-galactosa por minuto a un pH de 7,3 a 37 ° C (Sigma-aldrich.com).

Esta enzima se ha empleado para la síntesis de GOS a partir de lactosa mediante transgalactosilación generando un enlaces β (1-6) en los productos obtenidos. (Rabiu y col., 2001). Algunas características reportadas en la base de datos para enzimas “Brenda” se muestran a continuación (<http://www.brenda-enzymes.info/>).

Tabla 8: Características de la β -galactosidasa de <i>Escherichia coli</i>	
K_M [mM] (ONP-G)	0.122
Estabilidad del pH	5-7.5
pH óptimo	7.2
pH máximo	7.5
Temperatura óptima (°C)	37
Solventes: acetona, acetonitrilo, trimetil fosfato	
http://www.brenda-enzymes.org	

2.6.5 β -galactosidasa de *Asperguillus oryzae*

La β -galactosidasa de *Asperguillus oryzae* hidroliza los residuos terminales no reductores β -D-galactosa de los β -D-galactósidos. Una unidad de galactosidasa hidroliza 1 μ mol de lactosa por minuto a un pH de 4,5 a 30 ° C. (Sigma-aldrich.com)

Esta enzima se ha empleado para la síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS) a partir de lactosa con un rendimiento máximo de 26%, de los GOS obtenidos el 81% fueron trisacáridos (Neri y col., 2009). Se han reportado 20 diferentes tipos de GOS sintetizados entre tri, tetra, penta y hexa-GOS (Albayrak y Yang 2002), de las estructuras identificadas Deya (1990) reportó que el 6' galactosil-lactosa (β -Gal-(1-6)- β -Gal-(1-4)-Glc) constituye ~70% de los GOS obtenidos.

Algunas características reportadas en la base de datos para enzimas “Brenda” se muestran a continuación (<http://www.brenda-enzymes.info/>)

Tabla 9: Características de la β -galactosidasa de <i>Aspergillus oryzae</i>	
K_M [mM] (ONP-G)	1.64
Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	87.5
Estabilidad del pH	3.6-5.5
pH óptimo	4.5
pH máximo	5.5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30-55
Solventes: acetona, acetonitrilo	
http://www.brenda-enzymes.org	

3 Objetivo general

Estudiar la síntesis de oligosacáridos fucosilados a partir de reacciones de fucosilación mediante el uso exclusivo de glicosil-hidrolasas.

3.1. Objetivos específicos

Establecer las condiciones de reacción para la síntesis de fucosil-lactosa por vía enzimática, empleando β -glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02 y la α -fucosidasa de *Bos taurus*.

Establecer las condiciones de reacción para la síntesis de disacáridos fucosilados empleando α -galactosidasa del producto comercial “Beano”, α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* y la β -glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02.

4 Hipótesis

Es posible sintetizar fucosil-oligosacáridos mediante reacciones enzimáticas de fucosilación, empleando glicosidasas que presenten actividad de transferasas bajo condiciones específicas de reacción.

5. Metodología

Para cumplir los objetivos planteados en esta tesis se siguió el plan de trabajo que a continuación se esquematiza para el estudio de la síntesis compuestos fucosilados.

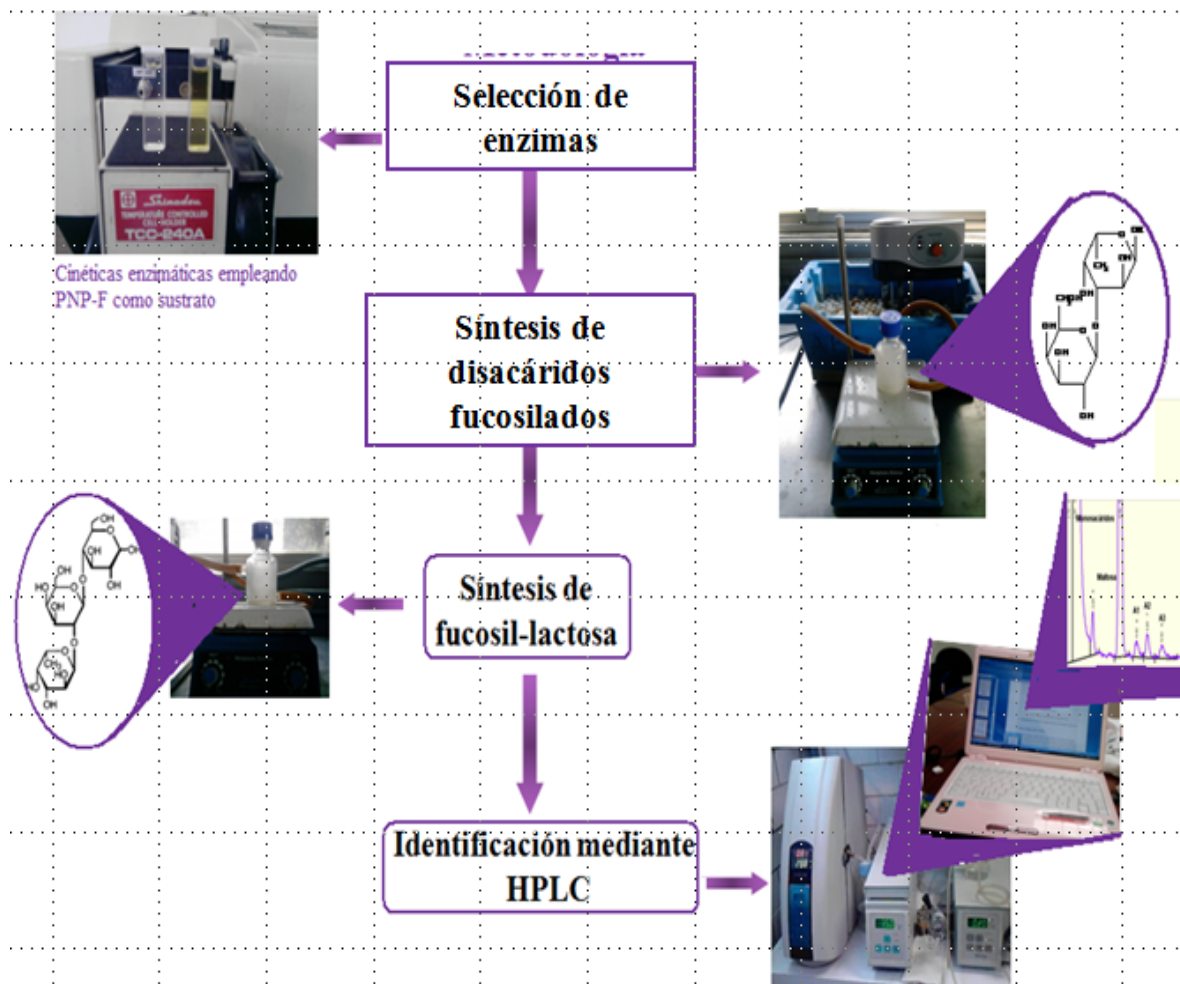


Imagen 1: Plan de trabajo seguido para el estudio de compuestos fucosilados

5.1 Reactivos

2-Nitrofenil (ONP), 2-Nitrofenil β -D-galactopiranosido (ONP-G), 4-Nitrofenil α -L-fucopiranosido (PNP-F), rafinosa (Galactosa- α (1-6)-Glucosa- α (1-2)-Fructosa), lactosa (Galactosa- β (1-4)-Glucosa), melibiosa (Galactosa- α (1-6)-Glucosa), maltosa (Glucosa- α (1-4)-

Glucosa), D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, L-fucosa, hidróxido de amonio, acetonitrilo, metanol (solventes grado HPLC) todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich.

5.2 Enzimas

α -L-fucosidasa de riñón de bovino (*Bos taurus*), α -glucosidasa de *Sacharomyces cerevisiae*, β -galactosidasa de *Escherichia coli*, β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* todas estas enzimas fueron adquiridas en Sigma Aldrich, glicosidasa hipertermofílica de la compañía Diversa y α -Galactosidasa del producto comercial “Beano”.

5.3 Equipos

Espectrofotómetro UV-visible-160A (Shimadzu) con celda de temperatura controlada TCC-240A, liofilizadora Freezone 4.5 (Labconco), equipo de Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con una bomba LAB Alliance y detector Light Scattering PL-ELS1000.



Imagen 2: Equipos usados para el estudio de compuestos fucosilados

5.4 Curva patrón de 2-nitrofenil (ONP)

Se prepararon soluciones de ONP a diferentes concentraciones en un rango de 0.005 a 0.35 $\mu\text{mol/ml}$ en solución amortiguador de fosfatos 0.1M y pH de 4.5 por triplicado. Se leyó a una longitud de onda de 410 nm.

5.5 Cálculo de K_M y V_{max} para la fucosidasa de *Bos taurus*

Se determinó la velocidad inicial (V_o) a diferentes concentraciones de PNP-F (0.136, 0.265, 0.531, 2.0, 8.5 $\mu\text{mol/mL}$) ya que a concentraciones mayores de PNP-F se generan problemas de solubilidad y reactividad. Las reacciones enzimáticas se efectuaron directamente en celdas espectrofotométricas de 1 mL a temperatura de 27°C por tres minutos y se registró la lectura de absorbancia cada 10 segundos a una longitud de onda de 410 nm, se empleó una solución amortiguadora de fosfatos 0.5M y pH 5.5 para realizar las reacciones enzimáticas y además como blanco. Se adicionó 0.0208 unidades enzimáticas por mililitro de mezcla de reacción.

Con los resultados obtenidos se elaboró una gráfica de Michaelis-Menten y los valores de K_M y V_{max} se calcularon por el método de Lineweaver-Burk.

5.6 Condiciones de trabajo para la determinación de la actividad enzimática

A lo largo del trabajo experimental se emplearon diferentes enzimas cuyas condiciones de trabajo se describen a continuación.

- Glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02: solución amortiguadora de fosfatos (0.1 y 0.05 M) y acetatos (0.05M), pH de 4.5 y 5.5, temperatura de 50 y 90°C.
- Galactosidasa de *Aspergillus oryzae*: solución amortiguadora de fosfatos y acetatos 0.05M, pH de 4.5 y temperatura de 30°C.
- Galactosidasa de *Escherichia coli*: solución amortiguadora de fosfatos y acetatos 0.05M, pH de 7.3 y temperatura de 37°C.
- Glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*: solución amortiguadora de acetatos 0.05M, pH de 6.8 y temperatura de 37°C.

5.7 Determinación de la temperatura de reacción para la fucosidasa de *Bos taurus*

Se estableció la temperatura óptima de trabajo para la fucosidasa de *Bos taurus* empleando PNP-F como sustrato y se cuantificó la concentración de PNP liberado mediante espectrofotometría (410 nm) a cuatro temperaturas (27, 32, 37 y 42 °C) de reacción, como blancos se emplearon soluciones de PNP-F.

5.8 Selección de la enzima para la síntesis de fucosil-lactosa

Se determinó la actividad de las diferentes enzimas (α -L-fucosidasa de *Bos taurus* y glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02 en las condiciones antes mencionadas empleando PNP-F como sustrato donador de fucosa para la reacción de fucosilación.



Imagen 3: Selección de enzima.

5.9 Síntesis de fucosil-lactosa

Se efectuaron reacciones enzimáticas usando PNP-F como sustrato donador de fucosa (1mg/mL) y lactosa (1 y 5 mg/mL) como grupo aceptor, las temperatura de reacción empleadas fueron de 27 y 37°C a distintas concentraciones de enzima (0.0208, 0.0416 y 0.208 UE/mL) . Se detuvo la reacción por disminución drástica de temperatura y congelación a distintos tiempos de reacción (0.33, 0.66, 1, 2, 3 h). La síntesis de oligosacáridos sintetizados fue cuantificada mediante HPLC.



Imagen 4: Metodología para la síntesis de fucosil-lactosa.

5.10 Síntesis de α y β galactosil-fucosa

Para la síntesis del disacárido α -galactosil-fucosa se utilizó como biocatalizador la α -galactosidasa de *Aspergillus niger* del producto comercial “Beano” en solución y en polvo (0.8, 2.1 y 4.3 UE/mL), como sustratos donadores: melibiosa (10 mg/mL), como sustrato aceptor fucosa (10 mg/mL), la reacción fue llevada a cabo a 37°C y 50°C en un baño de temperatura controlada y

recirculación de agua con agitación constante mediante un agitador magnético, el tiempo de reacción fue 1, 2 y 3 h deteniéndose mediante una disminución de temperatura en un baño de agua a 0°C, la reacción se efectuó en solución amortiguadora de acetatos 0.05M a pH de 4.5 y 7

Para la síntesis del disacárido β -galactosil-fucosa se utilizó como biocatalizador la glicosidasa hipertermofílica (0.00367 UE/mL), como sustratos donadores: galactosa (5mg/mL) y lactosa (1, 5 10 mg/mL), como sustrato aceptor fucosa (5 y 10 mg/mL), la reacción fue llevada a cabo a 90°C en un baño de temperatura controlada y recirculación de agua con agitación constante mediante un agitador magnético, el tiempo de reacción fue de 0.33, 0.66, 1, 2 y 3 h deteniéndose mediante una disminución drástica de temperatura en un baño de agua a 0°C. La síntesis se efectuó en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M y pH 4.5 y de acetatos 0.05M y pH de 5.5 y los productos obtenidos fueron cuantificados mediante HPLC.

5.11 Síntesis de α -glucosil-fucosa

Para la síntesis del disacárido α -glucosil-fucosa se utilizó como biocatalizador la glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (0.01, 0.1, 1 y 10 UE/mL), como sustratos donadores: glucosa (10mg/ml) y maltosa (10 mg/mL) y como sustrato aceptor fucosa (10, 30 y 50 mg/mL), la reacción fue llevada a cabo a 37 y 42°C en un baño de temperatura controlada y recirculación de agua con agitación constante mediante un agitador magnético, el tiempo de reacción fue de 0.5, 1 y 2 h. La síntesis se efectuó en solución amortiguadora de acetatos 0.05M y pH de 5.5 y 6.8 y los productos obtenidos fueron identificados y cuantificados mediante HPLC.

5.12 Purificación de oligosacáridos sintetizados

La mezcla de reacción que contienen los oligosacáridos identificados y cuantificados por HPLC fueron congeladas a -20°C por 24 h y liofilizada hasta un volumen de 400- 600 μ L en una liofilizadora Labconco Freezone 4.5 a temperatura de -40°C y 133×10^{-3} mBar. Las muestras liofilizadas se hicieron pasar por HPLC (inyecciones de 20 μ L) para su separación e identificación. Para ello se empleó una columna de exclusión molecular (Rezex RHM-monosacáridos 300 x 7.8, 8 μ , temperatura de columna: 75° C, fase móvil: agua a flujo de 0.3

ml/min, tiempo de corrida: 30 min) y otra columna para la identificación de isómeros por configuración espacial (HiperCab® 100 x 4.6, 5 μ , temperatura de columna: 60°C, fase móvil: amoníaco- acetonitrilo (96-4) a flujo de 1 mL/min, tiempo de corrida de 20 min) como gas acarreador se empleó nitrógeno y un detector Light Scattering (PL-ELS1000) y el programa “Clarity” para analizar los cromatogramas. Las fracciones de interés fueron colectadas, congeladas y liofilizadas nuevamente, obteniéndose así el disacárido purificado.

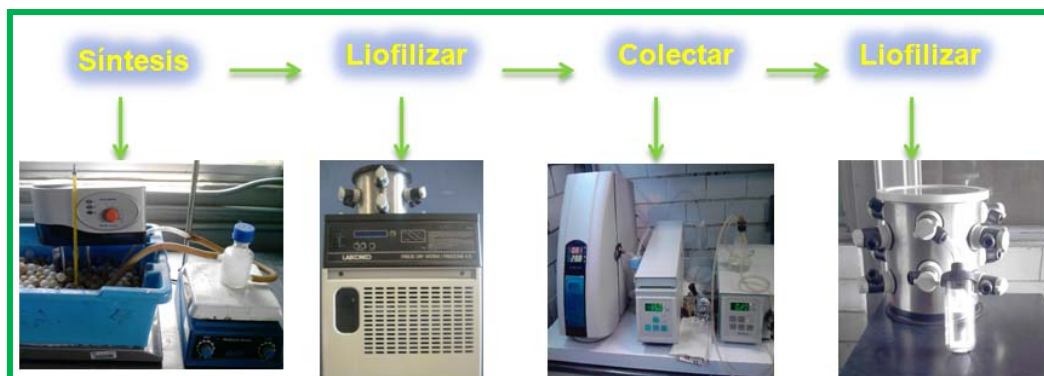


Imagen 5: Método para la purificación de oligosacáridos sintetizados.

5.13 Análisis de los compuestos fucosilados sintetizados enzimáticamente

Los compuestos fucosilados sintetizados y purificados fueron sometidos a diferentes reacciones enzimáticas con glico-hidrolasas, las condiciones de reacción son las óptimas descritas para cada enzima en la sección número 5.6. El cambio en la concentración de los sacáridos fue cuantificado mediante HPLC.

6. Resultados y discusión

6.1 Selección de enzima para la síntesis de fucosil-lactosa.

La glicosidasas son de gran interés para la industria alimentaria en la preparación de glúcidos ya que la preparación química no cumple la normatividad alimentaria (De Rode y col., 2003). El uso de hidrolasa para la síntesis enzimática de fucosil-oligosacáridos ha sido recientemente explorado, debido a que estas enzimas, tienen la ventaja de no requerir un donador glucosil-activado como es el caso de las glicosil-transferasas (Nilsson, 2001). En este trabajo se planteó el uso de glicosil-hidrolasas de diversas fuentes para la síntesis de compuestos fucosilados así como los sustratos donadores y aceptores para llegar al oligosacárido de interés. En el caso de la síntesis de fucosil-lactosa se propusieron dos enzimas: glicosidasa hipertermofílica y fucosidasa de *Bos taurus*.

La glicosidasa hipertermofílica GLY 001-02 es un extremo-enzima que tiene afinidad por diversos sustratos como: β -D-celobiosa, β -D-galactosa, β -D-glucosa, β -D-fucosa, β -D-manosa y α -L-arabinosa (www.biocat.com) por tal motivo se consideró como candidata para las reacciones de fucosilación. La α -fucosidasa es una enzima que ha sido empleada para la síntesis de estructuras homólogas a las estructuras de Lewis que son OS fucosilados.

El proceso de selección se realizó empleando como sustratos para ambas enzimas ONP-G y PNP-F mediante espectrofotometría.

6.1.1 Actividad enzimática de la β -glicosidasa hipertermofílica con diferentes sustratos

Se confirmó la actividad de la β -glicosidasa hipertermofílica usando como sustrato ONP-G que es una sustancia muy empleada para esta determinación, la aplicación del método está asociada a la gran facilidad de seguir la reacción por espectrofotometría, esta molécula en solución es incolora y al ser liberado el galactopiranosido del ONP, la solución torna a una coloración amarilla. El ONP-G es una molécula muy inestable en solución y puede hidrolizarse con la temperatura, por lo tanto, el tiempo de preparación de las soluciones de ONP-G (tiempo para solubilizar) es una fuente de error, que fue eliminada colocando en la

celda del espectrofotómetro asignada para el “blanco” una solución de ONP-G, de este modo, el espectrofotómetro al comparar la celda que contiene la mezcla de reacción con la celda que contiene el blanco determinó únicamente la absorbancia generada por la liberación del ONP como producto de la hidrólisis enzimática.

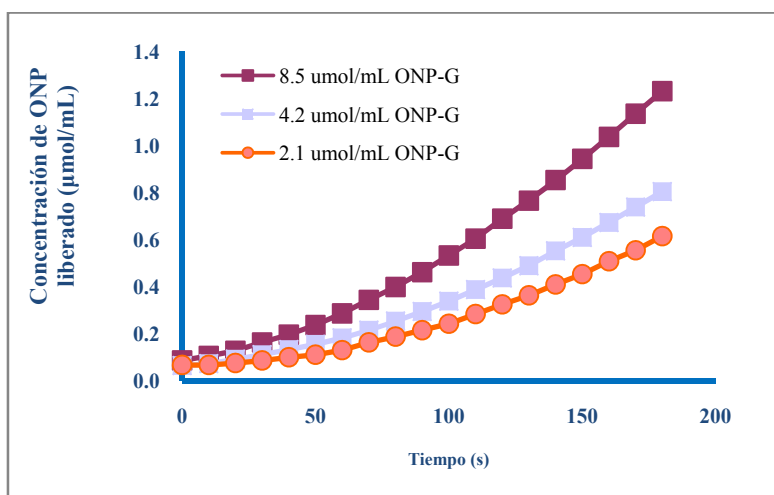
Los resultados mostraron que la enzima se encuentra activa ya que fue capaz de hidrolizar la solución de ONP-G, generando la coloración amarilla que se observó en la celda de la reacción enzimática.

El rango de temperatura que la compañía Diversa reporta para esta enzima es de 10-90°C (www.biocat.com), sin embargo, Cruz-Hernández (1999) reportó como temperatura óptima 93.5°C para la síntesis de GOS y una disminución en la actividad enzimática al descender la temperatura así como una disminución en la velocidad inicial (V_0).

No obstante, para este análisis se trabajó a 50°C para disminuir la hidrólisis del ONP-G que se genera como producto de la temperatura.

La concentración de ONP liberado mediante la hidrólisis enzimática (Gráfica 1) fue cuantificada con la siguiente ecuación calculada con una curva patrón de ONP.

$$\text{Concentración ONP } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\text{Absorbancia } a_{410} + 0.0007}{0.3648}$$



Gráfica 1: Cinética enzimática de la β -glicosidasa hipertermofílica, usando como sustrato ONP-G. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M y pH 4.5, 10 μ L de enzima/mL (0.00183 UE/mL), T= 50° C.

En la gráfica 1 se observó que la β -glicosidasa hipertermofílica si presentó actividad sobre el ONP-G y además se ve incrementada al aumentar la concentración de este sustrato, eso se ve reflejado en el incremento de la concentración de ONP liberado. Sin embargo, el comportamiento de esta cinética no es lo esperado teóricamente debido a que el sustrato de la reacción (ONP-G) no fue atemperado para evitar la hidrólisis del compuesto por efecto de la temperatura.

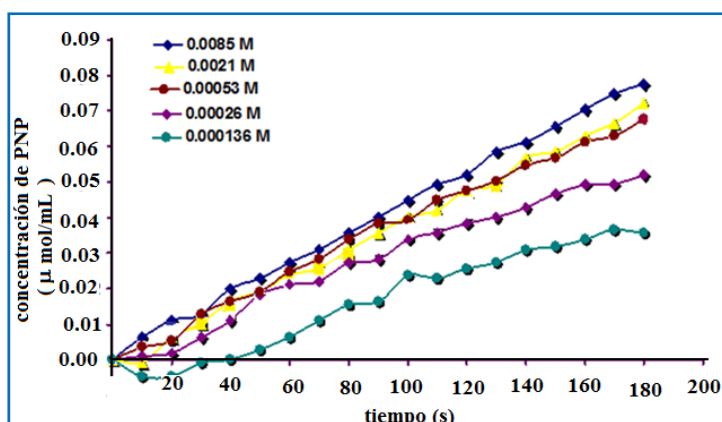
De la misma manera en que se realizó la actividad enzimática con el ONP-G, se hizo con el PNP-F, con la finalidad de conocer si el PNP-F es un sustrato para la β -glicosidasa hipertermofílica y así utilizar esta enzima para la síntesis de compuestos fucosilados. Los resultados no fueron positivos, el análisis mediante espectrofotometría reveló que la enzima no es capaz de hidrolizar el PNP-F (sustrato donador) así que esta enzima se descartó para ser usada en la síntesis del fucosil-lactosa.

6.1.2 Actividad enzimática de la α -fucosidasa de *Bos taurus* con diferentes sustratos

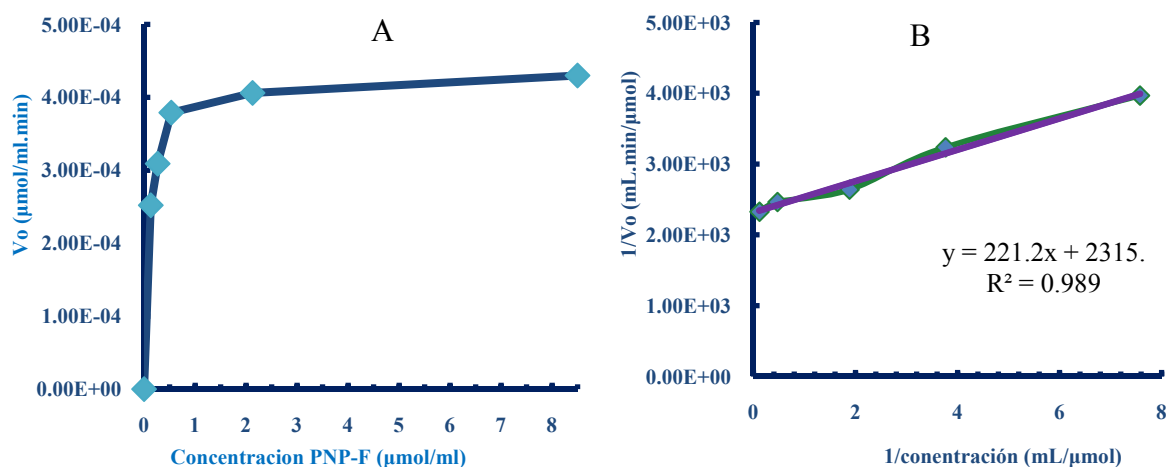
Se realizó la determinación de actividad de la α -fucosidasa de *Bos taurus* a 27°C, empleando PNP-F como sustrato, el cambio de color en la mezcla de reacción indica que la α -fucosidasa tiene afinidad por el sustrato.

Como se puede observar en la gráfica 2, la enzima si presentó actividad sobre PNP-F, es decir, si tiene afinidad por el sustrato por lo que esta enzima fue seleccionada para la síntesis de compuestos fucosilados.

Se determinó la V_o de la α -fucosidasa a diferentes concentraciones de PNP-F (Gráfica 3) y se calculó mediante el modelo de linearización por Lineaweaver_Burk que la K_M tiene un valor de $9.5 \times 10^{-2} \mu\text{mol/mL}$ y la V_{max} de $4.319 \times 10^{-4} \mu\text{mol/mL min}$



Gráfica 2: Cinética enzimática de la α -fucosidasa, usando como sustrato PNP-F. Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M y pH 5.5, 10 μ L de enzima/mL (0.0208 UE/mL), T= 27°C.



Gráfica 3: Efecto de la concentración de sustrato en la reacción para la α -fucosidasa
A: Modelo de Michaelis-Menten
B: Modelo de Lineaweaver-Burk

El ONP-G es un sustrato similar a la lactosa (contiene galactosa), este sacárido es el sustrato aceptor en las reacciones de fucosilación para la síntesis del fucosil-lactosa, por esto fue necesario comprobar que la fucosidasa no lo hidrolice. Al igual que en los casos anteriores se determinó la actividad de la enzima por el sustrato mediante espectrofotometría. Se observó mediante cinéticas con ONP-G que la fucosidasa no presentó actividad por este sustrato, estos resultados son positivos al confirmar que el sustrato aceptor no sufrirá hidrólisis durante el proceso de síntesis, permaneciendo disponible para la transferencia de fucosa a un hidroxilo libre en su estructura.

La tabla 10 resume los resultados obtenidos en el proceso de selección de la enzima para la síntesis de fucosil-lactosa.

Tabla 10: Selección de la enzima		
Enzima	ONP-G *	PNP-F
β -glucosidasa hipertermofílica	✓	X
α -fucosidasa	X	✓

ONP-G: orto-nitro-fenil-galactósido.

PNP-F: para-nitro-fenil-fucósido.

*Sustrato similar a la lactosa

6.2 Síntesis de fucosil-lactosa

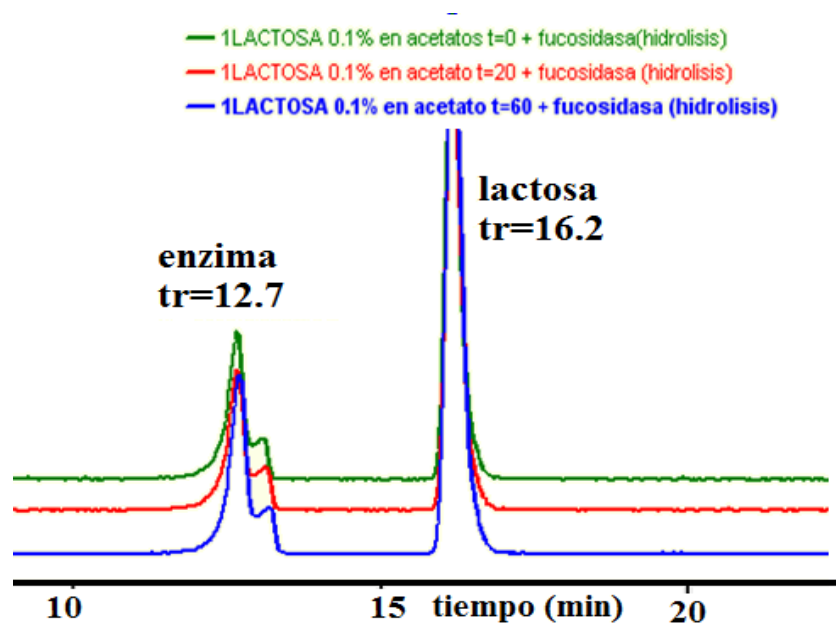
Para llevar a cabo la síntesis de fucosil-lactosa utilizando la α -fucosidasa fue necesario evaluar diferentes parámetros que favorecieran la reacción enzimática, tales como: relación donador: aceptor, concentración de enzima, temperatura y tiempo de reacción.

Las reacciones de fucosilación se analizaron mediante el empleo de HPLC, por lo que fue necesario inyectar soluciones estándares de lactosa, glucosa, galactosa y fucosa con el fin de conocer los tiempos de retención de cada sacárido y se realizó una curva patrón de lactosa para cuantificar los compuestos sintetizados. (Tabla 11).

$$\text{Concentración lactosa } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{\text{Área del pico} + 240.84}{560.21}$$

Tabla 11: Tiempo de retención (tr) de los estándares	
Sustancia	tr (min)
Enzima	12.7
Lactosa	16.2
Glucosa	19.1
Galactosa	20.2
Fucosa	23

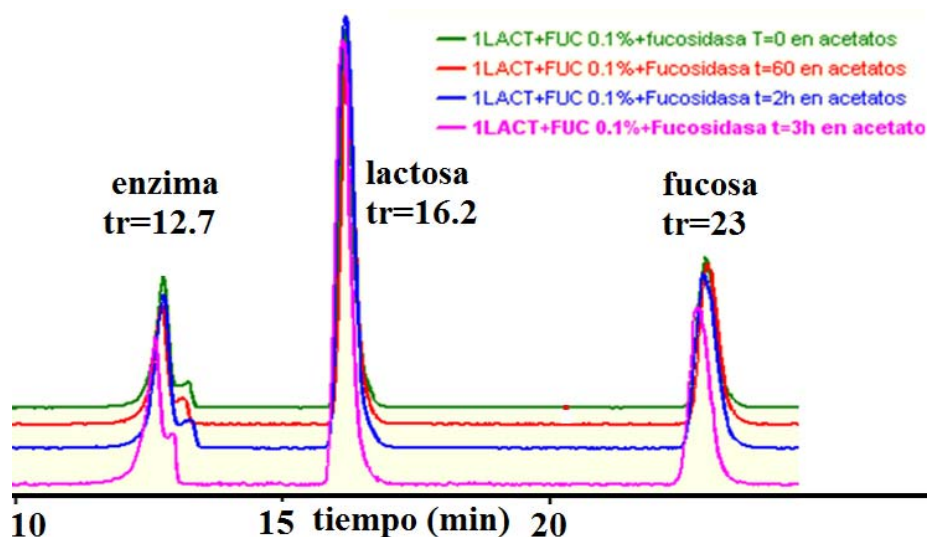
Mediante el análisis por HPLC (cromatograma 1) se observó que la α -fucosidasa no presenta actividad sobre la lactosa, este resultado coincide con el análisis realizado con ONP-G mediante espectrofotometría.



Cromatograma 1: Actividad de la α -fucosidasa empleando lactosa como sustrato
Condiciones: lactosa 0.1% m/V en solución amortiguadora de acetatos, 10 μ L/mL de fucosidasa (0.0208 UE/mL), 27° C, t=0, 20 y 60 minutos.

La α -fucosidasa es una enzima que cataliza reacciones de hidrólisis en un proceso convencional ya que pertenece a la familia de las hidrolasas. La familia de las hidrolasas posee algunas enzimas capaces, no solo de hidrolizar, sino también de producir oligosacáridos en condiciones adecuadas de reacción (temperatura, pH, elevadas concentraciones de sustrato, fuente enzimática, etc.) (Albayrak y Yang, 2002; Cardelle y col, 2008), de este modo, se buscaron las condiciones para la producción de compuestos fucosilados. Se seleccionó el sustrato donador y se estudió el efecto de la relación aceptor: donador, concentración de enzima, temperatura y tiempo de reacción.

Para la selección del sustrato donador en las reacciones de fucosilación se planteó el uso de fucosa libre, sin embargo, en el cromatograma 2 se observó que la α -fucosidasa no es capaz de transferir la fucosa si no se encuentra unida a otra molécula, esto se comprobó ya que el tamaño en las áreas de los picos de la fucosa en el tiempo cero permanecen constantes con respecto a 1, 2 y 3 horas, así que se descarta el uso de fucosa libre para la síntesis de fucosil-lactosa.



Cromatograma 2: Uso de fucosa como sustrato donador para la síntesis de fucosil-lactosa.

Condiciones: lactosa 1mg como sustrato aceptor, fucosa 1 mg como donador, 10 μ L de fucosidas (0.0208 UE/mL), 27° C, $t=0, 1, 2$ y 3 horas

LACT=lactosa; FUC= fucosa.

Se planteó el empleo de PNP-F como sustrato donador de fucosa y lactosa como sustrato aceptor, el objetivo en esta reacción fue que la α -fucosidasa hidrolizara el enlace α (1-4) del PNP-F y transfiriera la fucosa a un grupo hidroxilo (OH) disponible del sustrato aceptor. Como se muestra en la figura 17, la lactosa posee en su estructura ocho grupos OH libres, disponibles para aceptar a la molécula de fucosa, teóricamente en esta reacción se podrían generar ocho isómeros de fucosil-lactosa, sin embargo, Crout y Vic (1998) señalaron que las exo-glicosidasas, entre ellas las α -fucosidasas, solo permiten la transferencia del glicosil al monómero terminal no reductor del sustrato, lo que restringe el tipo de estructuras de OS que pueden ser producidos. De este modo se puede saber que la fucosa sólo es transferida a la galactosa presente en la lactosa, pero la formación de enlaces depende de la naturaleza de la enzima (Figura 17).

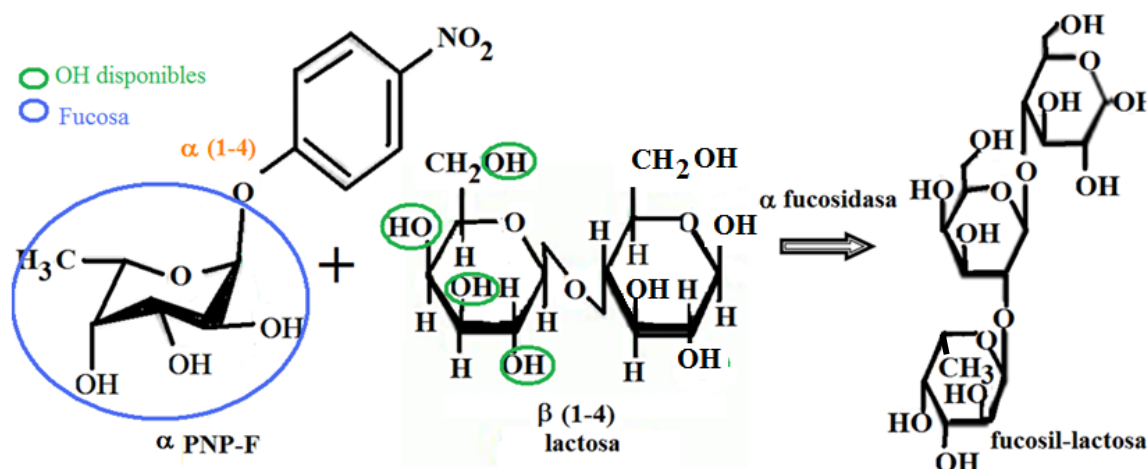


Figura 17: Reacción de fucosilación para la síntesis de fucosil-lactosa.

En los primeros experimentos realizados para sintetizar fucosil-lactosa, solo se efectuó la reacción de hidrólisis de PNP-F. Debido a que la α -fucosidasa es una hidrolasa, por tanto, su función principal es romper enlaces glicosídicos para la degradación de compuestos. Sin embargo, se sabe que en condiciones adecuadas, estas enzimas son capaces de hacer la reacción inversa y generar enlaces glicosídicos que dan como resultado la síntesis de OS (Smoot y Demchenko, 2009).

En las secciones 6.2.1 y 6.2.2 se explican cómo se dio la búsqueda de las condiciones de reacción que generen la síntesis de fucosil-lactosa.

6.2.1 Efecto de la concentración de α -fucosidasa en la síntesis de fucosil-lactosa

Se determinó el efecto de la concentración de la enzima empleando PNP-F al 0.1% m/V, (3.5×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$) lactosa al 0.5% m/V a 27 °C y 1h de tiempo de reacción. El pH de reacción fue de 5.5, un poco más elevado que el pH óptimo de la enzima que es de 5.3 (mostrado en la sección 6.2.1), ya que ha reportado que se obtienen mayores rendimientos de OS si se usa un pH un poco mayor al óptimo (Nilsson, 1990).

En la tabla 12 se muestra que al aumentar 10 veces la concentración de enzima, se incrementa en un 14% la hidrólisis del sustrato, pero no se consigue sintetizar OS.

Tabla 12: Efecto de la concentración de enzima.

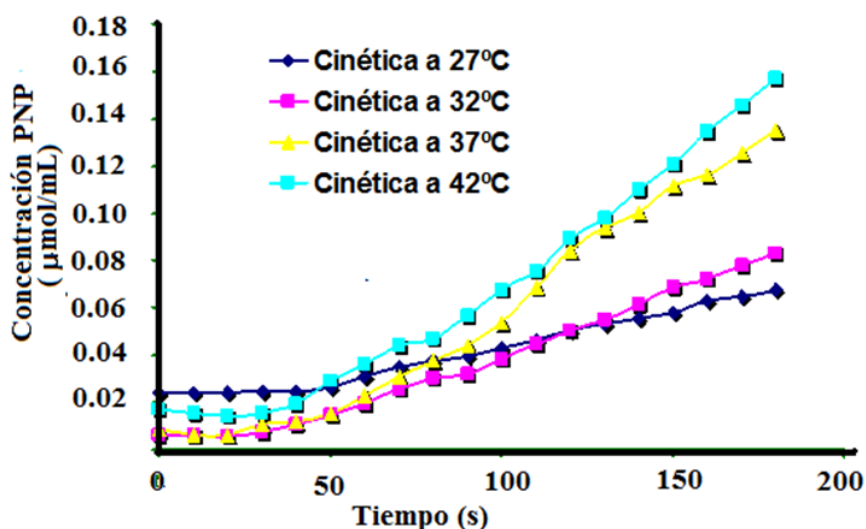
Enzima (UE/mL)	PNP ($\mu\text{mol/mL}$)	% hidrólisis
0.0208	1.775	24
0.208	2.732	38

En las condiciones anteriores la α -fucosidasa únicamente realiza la transferencia de la fucosa a un grupo OH del agua (hidrólisis) y no a un grupo OH de la lactosa (síntesis).

6.2.2 Efecto de la temperatura en la reacción enzimática.

La temperatura es un parámetro que puede influir en la síntesis de OS, así como en los rendimientos obtenidos (Nilsson, 1990). Para determinar el efecto de la temperatura en las reacciones de fucosilación, se estudió la actividad enzimática de la α -fucosidasa a cuatro temperaturas (27, 32, 37 y 42° C) a una concentración de 4.25 $\mu\text{mol/mL}$ de PNP-F.

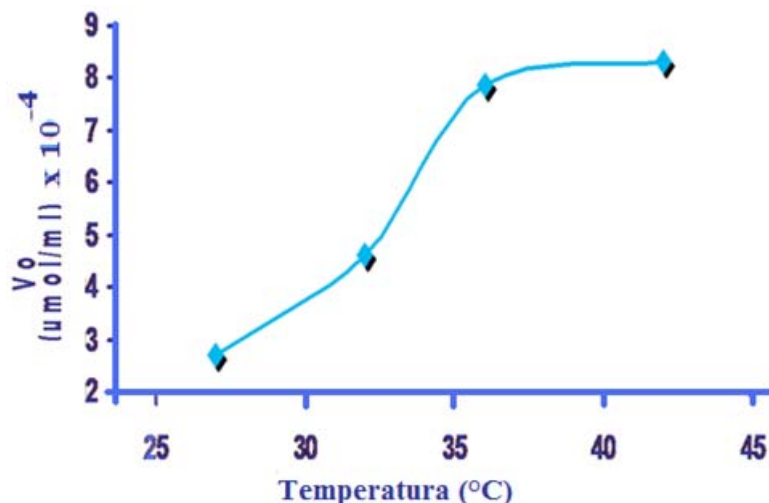
La gráfica 4 muestra un aumento en la actividad enzimática que se ve reflejado en un incremento en la concentración de PNP liberado del PNP-F, como efecto de la temperatura.



Gráfica 4: Cinéticas enzimáticas de la α -fucosidasa a diferentes temperaturas

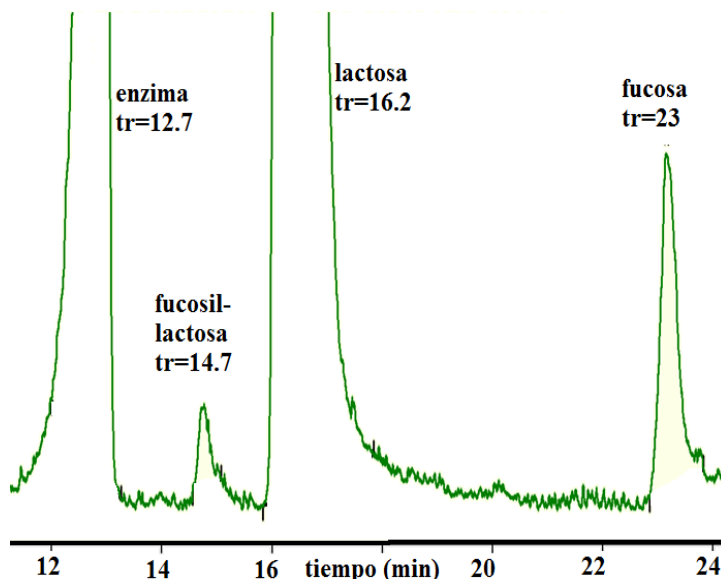
Con los datos obtenidos de la gráfica 4 se calculó la V_o para la α -fucosidasa a las cuatro temperaturas (Gráfica 5) y se observó que la velocidad de la reacción aumentó rápidamente al incrementar la temperatura de 27°C a 32° C en 72% y de 32°C a 37° C en 70%, mientras que

de 37°C a 42° C solamente aumentó 5% (Gráfica 6). Por lo que las siguientes reacciones para la síntesis de OS se realizaron a una temperatura de 37°C.



Gráfica 5: Efecto de la temperatura en la actividad de la α -fucosidasa.

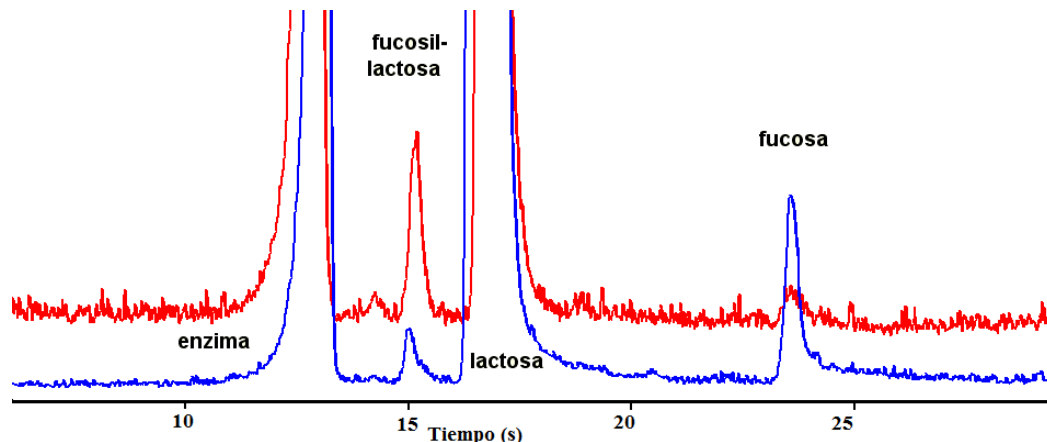
Se llevó a cabo la reacción de fucosilación a 37°C y como se puede observar en el cromatograma 3 al minuto 14.7 se tiene la presencia de un OS, probablemente el fucosil-lactosa, con lo cual se comprueba que esta temperatura favorece la síntesis.



Cromatograma 3: Reacción de fucosilación a 37°C utilizando la α -fucosidasa.

Condiciones: Reacción de fucosilación a 37° C, lactosa 0.5% m/V como aceptor, PNP-F 0.1% m/V como donador, 10 μ L de fucosidasa (0.0208 UE m/L) y 1 hora de reacción.

Una vez que se comprobó la síntesis de OS a 37°C, se evaluó el efecto de la concentración de enzima en la reacción de fucosilación. En el cromatograma 4 se observó que al aumentar al doble la concentración de enzima la producción del trisacárido se ve favorecida en un 630%



Cromatograma 4: Efecto de la concentración de enzima en la reacción de fucosilación a 37°

Condiciones: lactosa 0.5% m/V y PNP-F 0.1% m/V

Línea azul: Reacción de fucosilación empleando 0.0208 UE/mL

Línea roja: Reacción de fucosilación empleando 0.0416 UE/mL

En la tabla 13 se observan algunas condiciones de reacción probadas para la síntesis de OS, destacando que sólo en la reacción 6 y 7 se logró la síntesis de fucosil-lactosa.

Tabla 13: Resumen de las reacciones de fucosilación con diferentes condiciones							
R	Sustrato donador (mg/mL)	Sustrato aceptor (mg/mL)	Enzima UE/mL	t (h)	T (° C)	Hidrólisis (%)	fucosil-lactosa (mg/mL)
1	Fucosa 1	Lactosa 1	0.0208	1, 2, 3	27	ND	0
3	PNP-F 1	Lactosa 5	0.0208	1	27	24	0
4	PNP-F 1	Lactosa 5	0.0208	3	27	52	0
5	PNP-F 1	Lactosa 5	0.208	1	27	38	0
6	PNP-F 1	Lactosa 5	0.0208	0.3, 0.6, 1, 2, 3	37	ND	0.003
7	PNP-F 1	Lactosa 5	0.0416	0.3, 0.6, 1	37	ND	0.023

ND=No determinado

Zeng y col. (1999) reportaron la síntesis del trisacárido fuc-lac-PNP (para-nitrofenil- α -L-fucopiranosil- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranosido) al emplear PNP-F como sustrato

donador y para-nitrofenil- β -lactósido como sustrato aceptor con un rendimiento de 0.22 mg/mL con respecto al sustrato donador. Esta concentración es nueve veces mayor a la concentración de fucosil-lactosa que se obtuvo por el método descrito en este trabajo. Se debe hacer notar que existen diferencias importantes en los parámetros cinéticos que favorecieron el rendimiento obtenido por Zeng y col., como la temperatura (40 ° C), el tiempo de reacción (15 h), la concentración de enzima (1U) y la cantidad de carbohidratos totales presentes en la mezcla de reacción (20 mg/mL) todos estos parámetros favorecen la reacción de síntesis sobre la de hidrólisis.

Dado que el objetivo se centró en demostrar la síntesis de OS fucosilados mediante vía enzimática no se buscaron las condiciones óptimas de reacción, una vez que el planteamiento sea alcanzado podrá justificarse la inversión de recursos y tiempo en optimizar la reacción.

6.3 Síntesis de Disacáridos Fucosilado.

Los resultados obtenidos en la sección 6.2.2 muestran la viabilidad de la reacción para la síntesis de fucosil-lactosa por método enzimático utilizando únicamente la fucosidasa, con lo que se cumple con la primera etapa del estudio de compuestos fucosilados. La segunda etapa de este trabajo se centro en la síntesis de disacáridos fucosilados con posibles propiedades prebióticas y antiinfecciosas empleando otras glicosil-hidrolasas para estudiar su capacidad de transferasas y la viabilidad de síntesis de disacáridos usando como sustrato aceptor la fucosa.

6.3.1 Síntesis de galactosil-fucosa empleando α -galactosidasa del producto comercial "Beano"

Se propuso el empleo de un producto comercial "Beano". Este producto está diseñado para disminuir los problemas de flatulencia que se generan al consumir alimentos como leguminosas que contienen rafinosa, estaquiosa y otros carbohidratos que no son digeribles para los humanos. El "Beano" reporta en su formulación contener α -galactosidasa que fue la fuente de enzima para esta reacción.

El "Beano" se encuentra en presentación de tabletas de 347mg (150 UE/tableta), previamente se comprobó la actividad de la α -galactosidasa (*Aspergillus niger*) presente en este producto.

La reacción se realizó con la fuente de enzima en dos formas: en solución sometida a diálisis con una membrana de 10 kDa durante 3 días y en polvo. Las pruebas realizadas indican que esta enzima pierde rápidamente la actividad al estar en solución por lo que los estudios posteriores se efectuaron con la fuente de enzima en polvo.



Imagen 6: Producto comercial "Beano."

Se utilizó melibiosa (α -Galactosa-Glucosa) como sustrato donador de galactosa y fucosa como sustrato aceptor. En esta reacción se planteó

que la α -galactosidasa hidrolizara el enlace α (1-6) de la melibiosa y transfiriera la fucosa a un grupo hidroxilo (OH) disponible de la fucosa. Como producto de la hidrólisis y/o síntesis enzimática (Figura 18) se generan diferentes sacáridos que pueden ser reconocidos como aceptores generando como resultado una mezcla de varios productos.

- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de fucosa dando como resultado un disacárido Gal-Fuc.
- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de otra galactosa libre proveniente de la hidrólisis de la melibiosa dando como resultado un disacárido Gal-Gal.
- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de una glucosa libre proveniente de la hidrólisis de la melibiosa dando como resultado un disacárido Gal-Glu.
- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de la melibiosa generando un trisacárido Gal-Gal-Glu, así como otros sacáridos de mayor grado de polimerización.

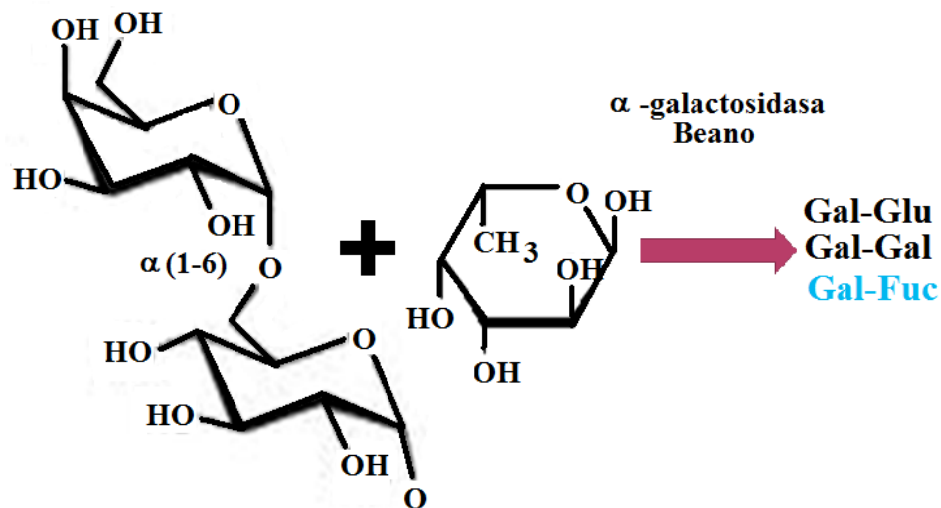
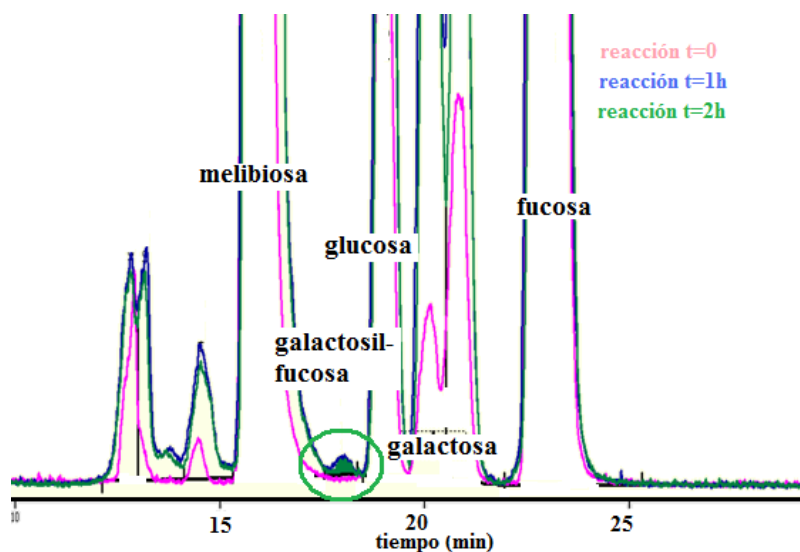


Figura 18: Reacción catalizada por la α -galactosidasa del producto comercial "Beano",

La reacción se efectuó en diferentes condiciones a fin de determinar los parámetros adecuados a los cuales la α -galactosidasa lleva a cabo la síntesis de OS, las variables estudiadas fueron: la concentraciones de enzima (2.1 y 0.8 UE/mL), temperatura (37 y 50 °C), pH (3.4, 3.8, 4.4 y 4.5) y tiempos de reacción (0, 0.5, 1 y 2 h). Las condiciones en las que fue posible producir el disacárido galactosil-fucosa son: melibiosa y fucosa 10 mg /mL, temperatura de 37 °C, tiempo 2 h, concentración de enzima de 0.8 UE/mL y pH de 3.4.

En el cromatograma 5 se muestra la presencia de un pico (encerrado en verde) que se presume pueda ser el producto de la síntesis, sin embargo los componentes contenidos en la fuente de enzima impiden que la determinación de los productos de reacción enzimática sea precisa. Este inconveniente nos hizo descartar este método de síntesis.



Cromatograma 5: Síntesis de galactosil-fucosa usando α -galactosidasa de "Beano".

6.3.2 Síntesis de glucosil-fucosa empleando α -glucosidasa de *Sacharomyces cerevisiae*

La siguiente propuesta fue el uso α -glucosidasa de *Sacharomyces cerevisiae*. El objetivo en la reacción es transferir una molécula de glucosa obtenida por hidrólisis del enlace α (1-4) de la maltosa (α -Glucosa-Glucosa) a un grupo OH disponible de la fucosa (Figura 19). Nótese que en este caso la cantidad de productos obtenidos por la reacción enzimática son menos que en el caso anterior (sección 6.3.1), así se puede obtener lo siguiente:

- ✓ La glucosa podrá ser transferida a un grupo OH de fucosa dando como resultado un disacárido Glu-Fuc.
- ✓ La glucosa podrá ser transferida a un grupo OH de otra glucosa libre proveniente de la hidrólisis de la maltosa dando como resultado un disacárido Glu-Glu (homologo de la maltosa).
- ✓ La glucosa podrá ser transferida a un grupo OH de la maltosa generando un trisacárido (Glu-Glu-Glu), así como sacáridos de mayor grado de polimerización.

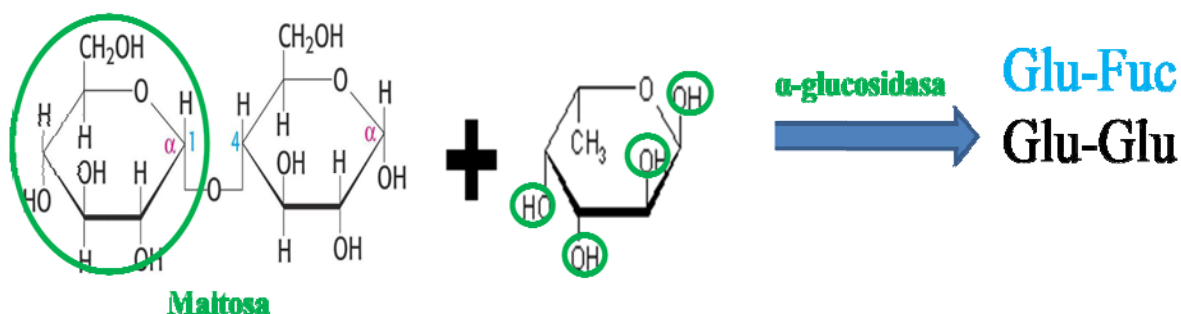


Figura 19: Reacción catalizada por la α -glucosidasa empleando maltosa como sustrato donador.

El primer paso para establecer las variables de reacción para la síntesis de glucosil-fucosa fue determinar la concentración de enzima, el estudio se realizó a las condiciones a las cuales la α -glucosidasa presenta actividad descrito en la sección 5.6 (<http://www.brenda-enzymes.info/>) Como se muestra en la tabla 14, empleando 10 UE/mL de α -glucosidasa se logró sintetizar el disacárido glucosil-fucosa.

Tabla 14: Efecto de la concentración de enzima para la síntesis de glucosil-fucosa

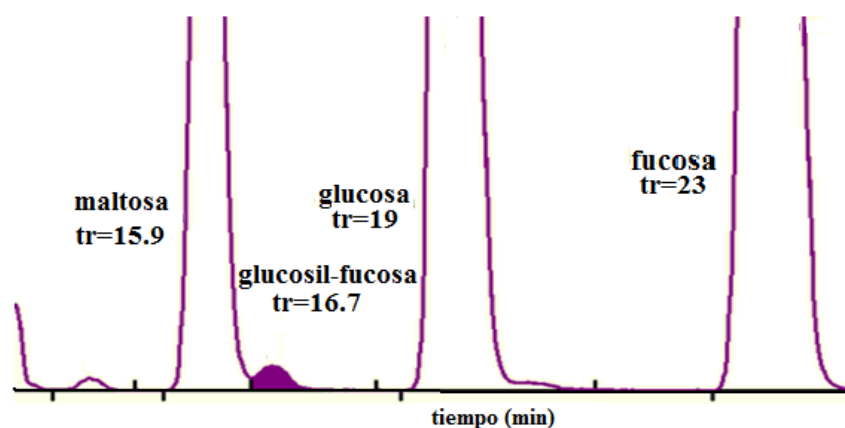
Maltosa (mg/mL)	Fucosa (mg/mL)	α -glucosidasa (UE/mL)	glucosil-fucosa (mg/mL)
1	1	0.01	0
		0.1	0
		1	0
		10	0.089
Condiciones: Solución amortiguadora de acetatos 0.05M, pH 6.8, T=37°C, t=2h			

Ya establecida la concentración de enzima a la cual es posible la síntesis de OS, se evaluó el efecto de la proporción donador: aceptor. En la tabla 15 se muestra que hay una mayor concentración de glucosil-fucosa sintetizado si la relación donador: aceptor es de 1:3 y además se observó que a 0.5 h de reacción se obtiene la máxima producción del disacárido a estas condiciones y es hidrolizado a tiempos mayores.

Tabla 15. Efecto de la relación donador: aceptor en la síntesis de glucosil-fucosa					
Relación donador: aceptor	Maltosa (mg/mL)	Fucosa (mg/mL)	glucosil-fucosa a 0.5 h (mg/mL)	glucosil-fucosa a 1 h (mg/mL)	glucosil-fucosa a 2 h (mg/mL)
1:1	10	10	0	0.102	0.069
1:3	10	30	0.304	0.254	0.251
1:5	10	50	0.289	0.289	0.246

Condiciones: 10 UE/mL de α -glucosidasa, solución amortiguadora de acetato 0.05M, pH 6.8 y 37 °C.

El cromatograma 6 muestra los sacáridos presentes en la mezcla de reacción después de la acción enzimática. El glucosil-fucosa sintetizado se presenta en el tiempo 16.7 min



Cromatograma 6: Productos de reacción generados por la acción de la α -glucosidasa.

6.3.3 Síntesis de galactosil-fucosa empleando β -glucosidasa hipertermofílica

Una alternativa más para tratar de sintetizar un disacáridos de fucosa fue usando la β -glucosidasa hipertermofílica GLY 001-02 ya que se ha estudiado su capacidad para la producción de oligosacáridos a partir de lactosa dado que se ha comprobado su actividad como β -galactosidasa (Cruz-Guerrero, 2005).

El objetivo planteado fue que la enzima transfiriera la galactosa a un grupo OH de la fucosa, pero también se debe considerar que en el medio de reacción se tienen otros carbohidratos que pueden fungir como aceptores, entonces al final de la reacción no sólo se obtendrá un solo producto sino una mezcla de diferentes oligosacáridos (Figura 20).

- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de fucosa dando como resultado un disacárido Gal-Fuc.
- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de otra galactosa libre proveniente de la hidrólisis de la lactosa dando como resultado un disacárido Gal-Gal.
- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de una glucosa libre proveniente de la hidrólisis de la lactosa dando como resultado un disacárido Gal-Glu.
- ✓ La galactosa podrá ser transferida a un grupo OH de la lactosa dando como resultado un trisacárido Gal-Gal-Glu.

Dependiendo del tiempo de reacción podrían generarse OS de diversos grados de polimerización.

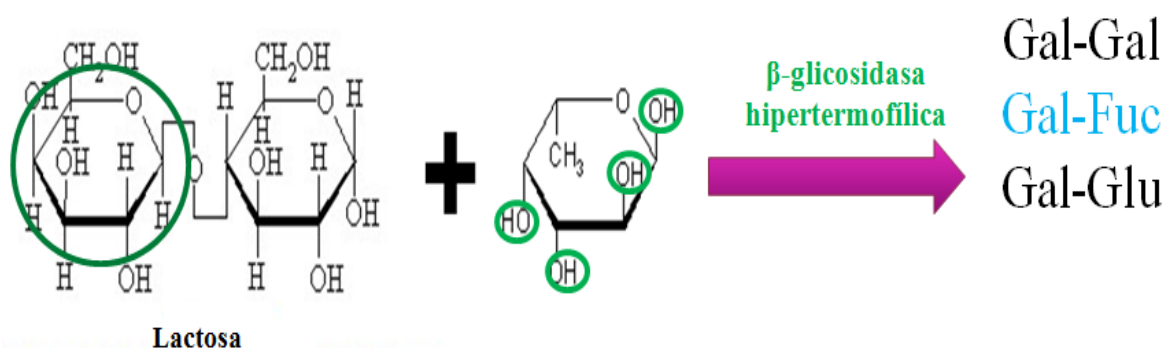


Figura 20: Reacción catalizada por la β -glicosidasa hipertermofílica empleando lactosa como sustrato donador

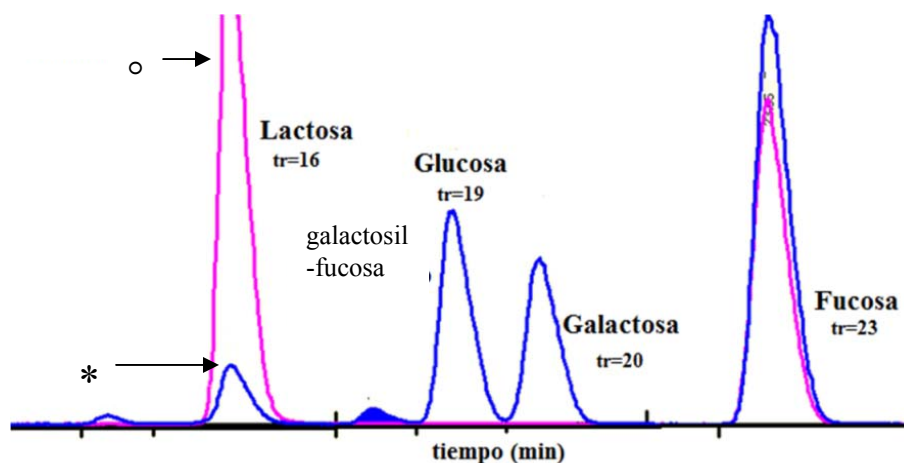
En la búsqueda de las condiciones para sintetizar de galactosil-fucosa se probaron diferentes condiciones de reacción: pH (4.5, 5.5 y 7), solución amortiguadora (fosfatos 0.1M, acetatos 0.05M), y tiempos de reacción (0.5, 1, 2 y 3 h). Se obtuvieron concentración de galactosil-fucosa con valores que oscilaron entre 0.005-0.32 mg/mL. Ya establecidos los parámetros para la síntesis del disacárido, que se muestran en la tabla 16, se evaluó el efecto del incremento en la concentración de sustratos los valores fueron aumentados 5 y 10 veces

Tabla 16: Efecto del incremento en la concentración de sustratos para la síntesis de galactosil-fucosa

Lactosa (mg/mL)	Fucosa (mg/mL)	galactosil-fucosa a 1 h (mg/mL)	galactosil-fucosa a 2 h (mg/mL)	galactosil-fucosa a 3 h (mg/mL)
1	1	0.005	0.005	0.004
5	5	0.068	0.067	0.070
10	10	0.364	0.478	0.455
Condiciones: Solución amortiguadora de acetatos 0.05 M, pH 5.5 y T=90 °C				

Los resultados obtenidos indican que al incrementar la concentración de sustratos cinco veces, la producción de galactosil-fucosa se eleva entre 13 y 17 veces y al aumentar 10 veces las concentraciones de sustrato la síntesis del disacárido se ve favorecida entre 90 y 110 veces. Además se observó que la máxima producción del OS (0.478 mg/mL), fue cuando se emplearon 10 mg/mL de sustratos, y dos hora de reacción, después de la cual, el disacárido es hidrolizado.

El cromatograma 7 muestra los sacáridos presentes en la mezcla de reacción, en el tiempo cero (línea rosa) sólo se observa la presencia de lactosa y fucosa que son los sustratos, pero después de 2h de reacción (línea azul) se observa la presencia de galactosa y glucosa generados por la hidrólisis de lactosa y además en el minuto 18 el galactosil-fucosa.

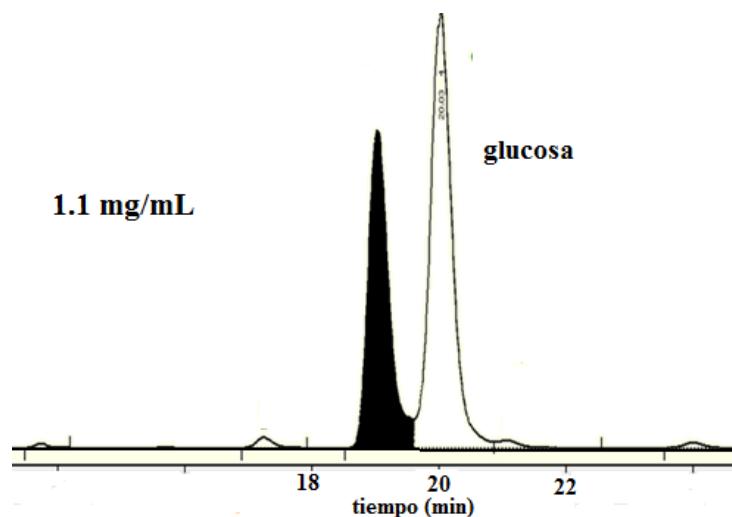
Cromatograma 7: Síntesis del galactosil-fucosa con β -glicosidasa hipertermofílica

Línea rosa (°): t=0

Línea azul (*): t=2h

Ya establecidas las condiciones de reacción y con el propósito de estudiar los productos obtenidos, se inició la producción a mayor escala incrementando el volumen de reacción 10 veces (10 mL) y se llevó a cabo la purificación con el procedimiento descrito en la sección 5.12.

En el cromatograma 8 se observa el disacárido galactosil-fucosa parcialmente purificado, ya que aún contiene glucosa residual. Coincidiendo con lo reportado por Nilsson y col. (1990) que indican que la mezcla de productos generada durante la síntesis de OS es difícil de purificar.



Cromatograma 8: Disacárido galactosil-fucosa parcialmente purificado en la columna Resex®.

6.4 Estudio y análisis de los disacáridos sintetizados

Los OS pueden aislarse y analizarse mediante el uso de MALDI-TOF y otras técnicas de espectrometría de masas ó HPLC, sin embargo, debido al gran número de combinaciones posibles se puede tener la formación de isómeros. Puede adquirirse información más completa rompiendo el OS con enzimas de diferentes especificidades, los productos resultantes, pueden analizarse nuevamente por HPLC o espectrometría de masas. La repetición de este proceso utilizando otra enzimas de especificidades distintas puede revelar la estructura de los OS (Mark y col., 2007)

El estudio de los productos sintetizados vía enzimática se realizó mediante HPLC usando dos columnas: una columna de exclusión molecular (Resex® RHM-monosacáridos 300 x 7.8, 8 μ) que permitió la separación y purificación de disacáridos de los demás carbohidratos y, una columna que permite la separación de isómeros del mismo peso molecular con base a las diferencias en la configuración espacial de los sacáridos (HiperCab® 100 x 4.6, 5 μ).

6.4.1 Análisis de glucosil-fucosa sintetizado por la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Como se muestra en la figura 17, la síntesis del glucosil-fucosa empleando maltosa como sustrato donador de glucosa y fucosa como aceptor puede dar como producto dos posibles disacáridos: glucosil-glucosa y glucosil-fucosa. Ese último de interés para nuestro estudio por ser un disacárido que posee fucosa como parte de su estructura.

Si se observa la estructura de la fucosa se puede ver que posee cuatro grupos OH libres candidatos para poder aceptar la glucosa transferida mediante la α -glucosidasa y generar diferentes enlaces: (1-1), (1-2), (1-3) y (1-4).

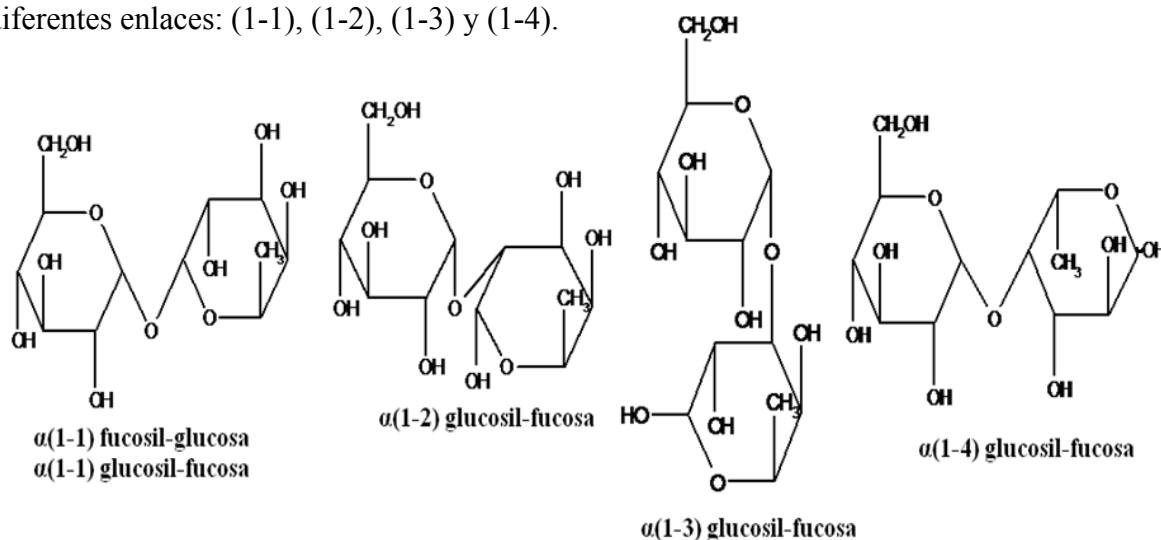


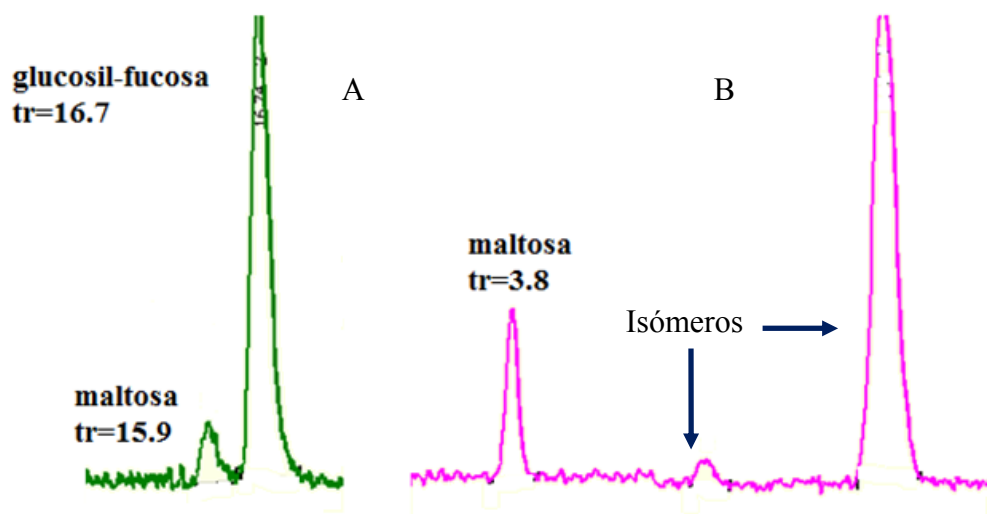
Figura 21: Probables isómeros de glucosil-fucosa sintetizados mediante α -glucosidasa

El análisis de los disacáridos sintetizados por vía enzimática se llevó a cabo mediante HPLC usando una columna de exclusión molecular (Resex®) y una columna capaz de separar compuestos con base a su configuración espacial (HiperCab®), de este modo se puede separar isómeros de igual peso molecular pero diferente arreglo espacial.

El disacárido glucosil-fucosa fue purificado como se describió en la sección 5.12 usando la columna Resex® para después analizarlo en la columna HiperCab®, de este modo se eliminaron monosacáridos y disacáridos (lactosa, isómeros de la lactosa y disacáridos gal-gal en caso de estar presentes), a pesar de que el producto sintetizado también es un disacárido, es posible separarlo de los demás ya que la fucosa presente en el glucosil-fucosa posee un grupo

metil (CH_3) en lugar de un grupo CH_2OH , por lo tanto tiene un peso molecular menor que el de los demás disacáridos (16 g/mol), de este modo se aseguró que la fracción purificada sólo estuviera compuesta de disacáridos glucosa-fucosa.

Lo que se observó es que el disacárido purificado por exclusión molecular (columna Resex®), se separa en dos fracciones al hacerlo pasar por la columna Hipercarb® lo cual sugiere la existencia de al menos dos isómeros de glucosil-fucosa (Figura 18).

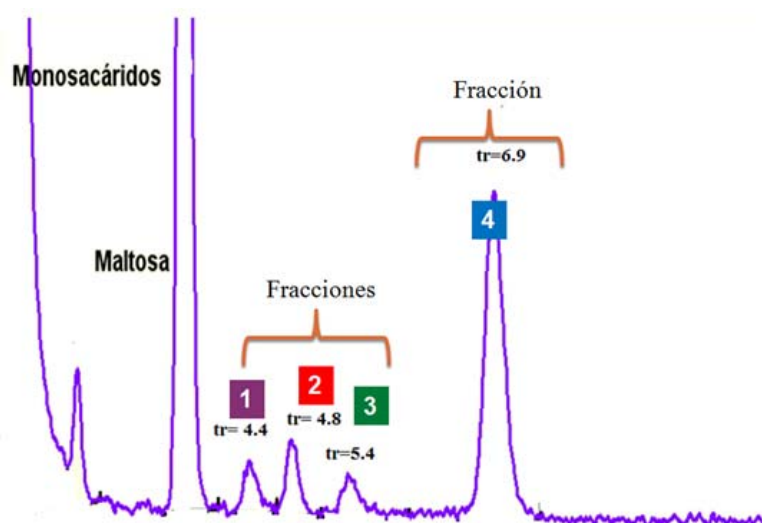


Cromatograma 9: Disacárido glucosil-fucosa analizado por HPLC

A: Purificado por exclusión molecular en la columna Resex®

B: Identificación de isómeros en la columna Hipercarb®

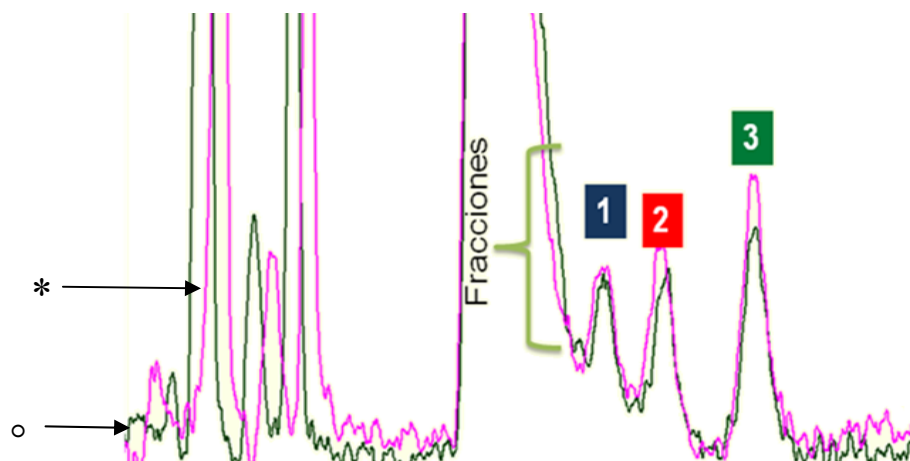
La mezcla de reacción del glucosil-fucosa sin ser purificado en la columna Resex® se hizo pasar por la columna Hipercab® y se observó la presencia de cuatro disacáridos sintetizados (Cromatograma 10). La diferencia con los resultados anteriores se debe a que la concentración de los isómeros presentes en la fracción colectada en la columna Resex® es menor a la concentración en la reacción original, debido a que no se colectó la fracción completa del disacárido para evitar en lo posible la presencia de otros productos de la reacción.



Cromatograma 10: Mezcla de reacción observada en la columna HiperCab®

Posteriormente se purificaron los disacáridos sintetizados empleando columna HiperCab®, y se colectó por separado las fracciones 1-3 de la fracción 4.

La colecta que contenía las fracciones 1-3 fue sometida a la acción de la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, ya que se conoce que esta enzima es capaz de hidrolizar enlaces α (1-4) (www.brenda-enzymes.org). Se observó que la α -glucosidasa no hidrolizó los compuestos sintetizados lo que nos indica que ninguna de las fracciones contienen enlaces α (1-4) sin embargo, no es posible determinar los probables enlaces que poseen los sacáridos producidos (Cromatograma 11).

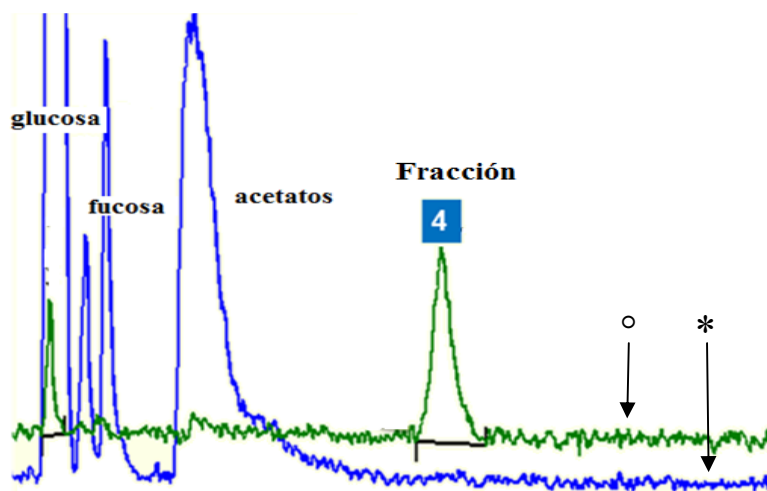


Cromatograma 11: Hidrólisis de las fracciones 1, 2 y 3 de glucosil-fucosa mediante la acción de la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Línea rosa (°): Fracciones 1-3 purificadas en la columna HiperCab®

Línea verde (*): Acción de la α -glucosidasa sobre las fracciones 1-3

La fracción 4 fue tratada del mismo modo que las anteriores. Se observó la hidrólisis total de este disacárido por la acción de la α -glucosidasa liberándose fucosa y glucosa (Cromatograma 11). Se sabe que las glicosidasas presentan dos mecanismos de acción que resultan en la conservación o inversión de la configuración anomérica α ó β (Smoot y Demchenko, 2009), el resultado obtenido con la α -glucosidasa confirma que la fracción 4 se generó con conservación de la configuración del carbono anomérico obteniéndose el α -glucosil-fucosa, sin embargo, para identificar el enlace glicosídico correctamente es necesario realizar un análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).



Cromatograma 12: Hidrólisis de la fracción 4 de α -glucosil-fucosa mediante la acción de la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

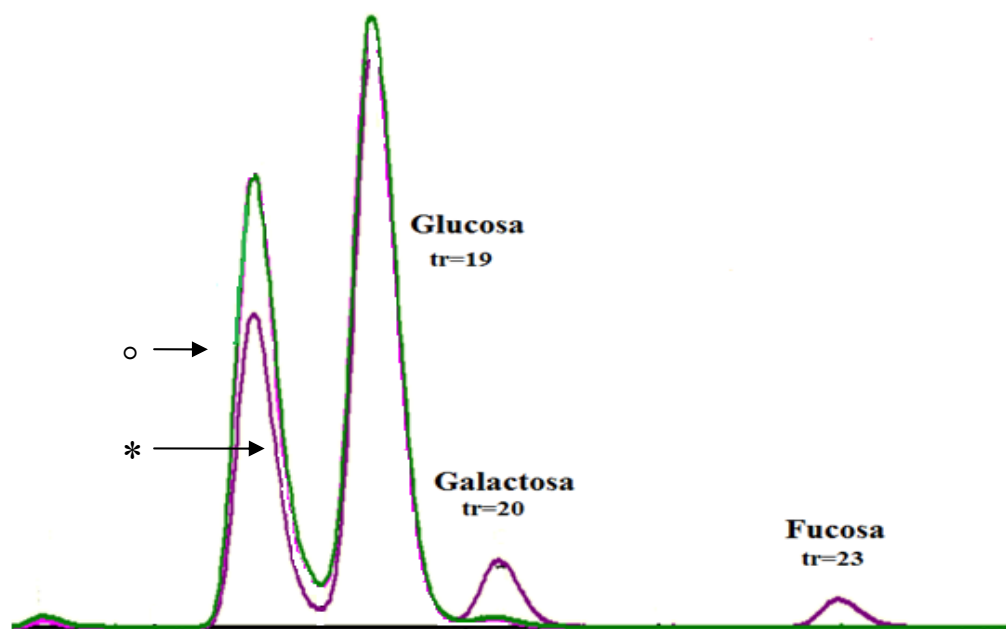
Línea verde (°): fracción 4 del disacárido sintetizado purificado en la columna Hipercarb®

Línea azul (*): Hidrólisis del α -glucosil-fucosa por acción de la α -glucosidasa

6.4.2 Análisis de galactosil-fucosa sintetizado por la β -glicosidasa hipertermofílica

Como se explicó en la sección 6.3.3 es probable que durante la reacción enzimática de la β -glicosidasa hipertermofílica se sinteticen una gran variedad de OS, de estos, existe la posibilidad de generarse tres clases de disacáridos (Gal-Gal, Gal-Glu y Gal-Fuc). Para asegurar que el compuesto sintetizado es el galactosa-fucosa y no alguno de los otros dos, éste fue purificado con la técnica descrita en la sección 5.12 usando la columna Resex® y sometido a la acción de la β -glicosidasa hipertermofílica (presenta actividad β -galactosidasa)

En el cromatograma 12 se observa claramente que después de que el disacárido es sometido a hidrólisis por la enzima, se libera los monosacáridos galactosa y fucosa. Este resultado confirma que el disacárido sintetizado por la β -glicosidasa hipertermofílica empleando lactosa como donador de galactosa y fucosa como aceptor, genera un disacárido galactosa-fucosa con conservación de la configuración anomérica es decir un disacárido β -galactosa-fucosa.



Cromatograma 13: Hidrólisis del β -galactosil-fucosa mediante la acción de la β -galactosidasa hipertermofílica
Línea verde (°): β -galactosil-fucosa parcialmente purificado en la columna Resex®
Línea morada (*): Acción de la β -galactosidasa hipertermofílica

El siguiente análisis tuvo el objetivo de determinar si el β -galactosil-fucosa presenta isómeros, para cumplir este objetivo, se purificó en la columna HiperCab® y posteriormente se sometió a la hidrólisis con diferentes β -galactosidasas (*Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli* e hipertermofílica GLY 001-02), las cuales tienen diferente regioselectividad (Imagen 7).

La fucosa tiene en su estructura cuatro grupos OH libres candidatos para poder aceptar la galactosa transferida por la β -galactosidasa hipertermofílica GLY 001-02 utilizada en la síntesis del compuesto, lo que deja abierta la posibilidad de obtener la formación de cuatro isómeros con enlaces β (1-1), β (1-2), β (1-3) y/o β (1-4).

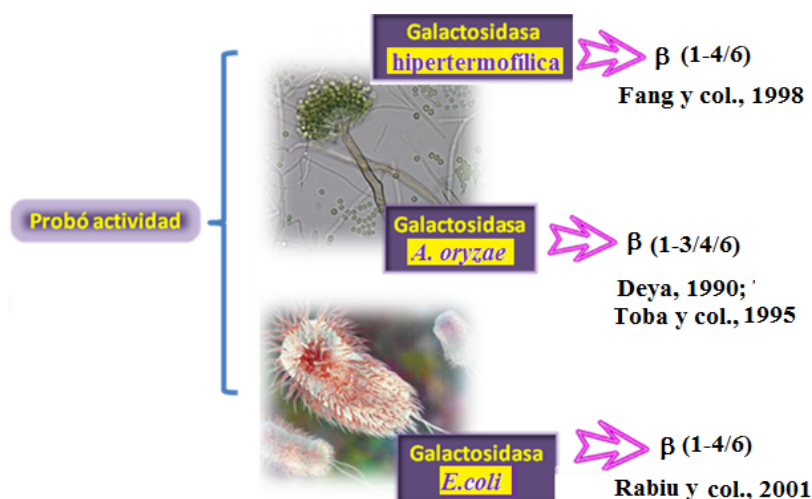


Imagen 7: Análisis del β -galactosil-fucosa empleando las β -galactosidasas de *A. oryzae*, *E. coli* e hipertermofílica GLY 001-02.

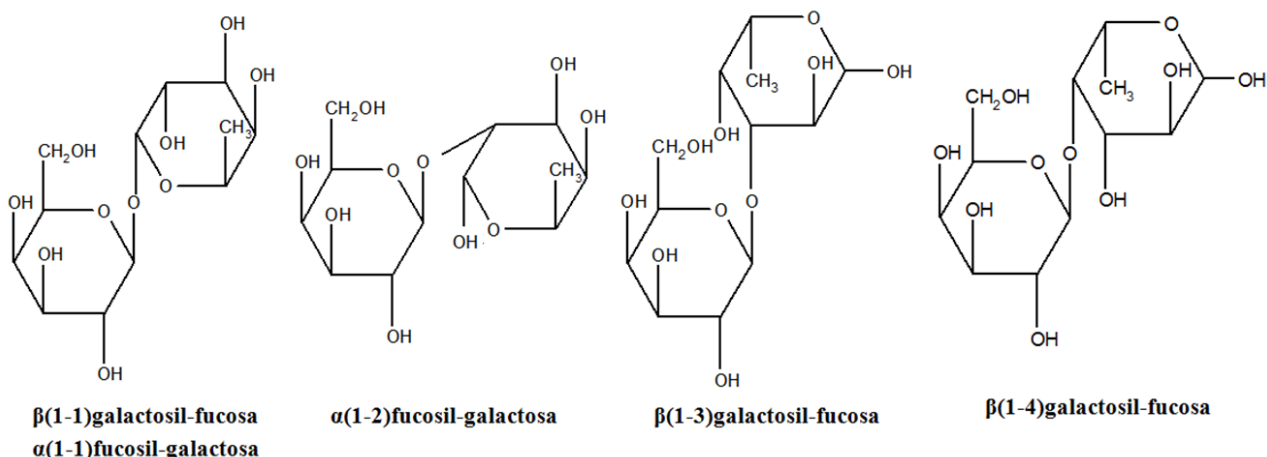
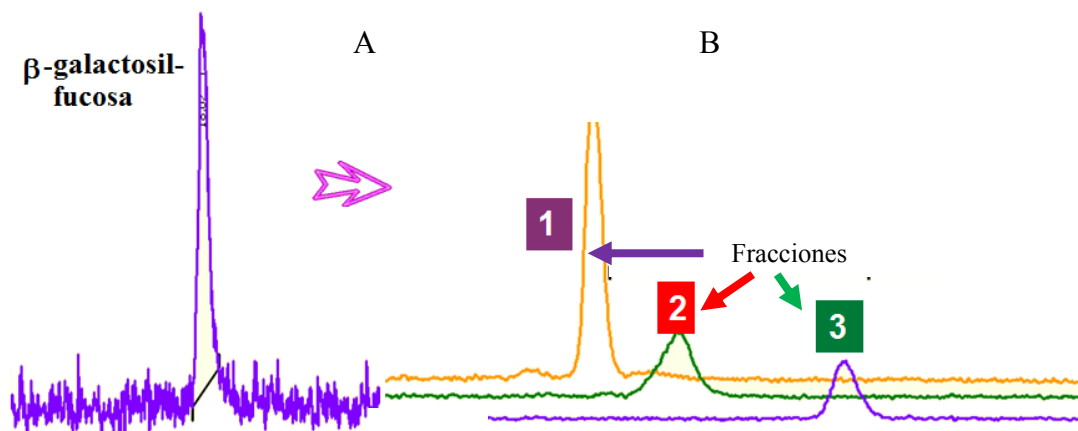


Figura 22: Probables isómeros de β -galactosil-fucosa sintetizados mediante β -galactosidasa hipertermofílica:

El estudio de los disacáridos sintetizados por esta vía se llevó a cabo mediante HPLC usando la columna Resex® e Hipercab®.

En la primera etapa del análisis el β -galactosil-fucosa fue purificado usando la columna Resex® y posteriormente se hizo pasar por la columna Hipercab®. El cromatograma 13 muestra que el pico observado en la cromatografía de exclusión molecular es separado en tres fracciones al ser analizado por la columna Hipercab® lo que indica que existen tres isómeros de β -galactosil-fucosa. La segunda etapa del análisis fue purificar por separado las tres

fracciones empleando la columna Hipercab® con el propósito de estudiar cada una por separado.



Cromatograma 14: β -galactosil-fucosa purificado mediante HPLC

A: Purificación por exclusión molecular en la columna Resex®

B: Purificación de isómeros de β -galactosil-fucosa en la columna Hipercab®

Los métodos enzimáticos empleados para la síntesis de OS, tanto de hidrólisis inversa como de transgalactosilación forman por lo general enlaces (1-6), mientras que los enlaces (1-2), (1-3) y (1-4) que son los que se encuentran con mayor frecuencia en glicoconjugado se forman en menor cantidad (Nilsson, 1990). Es claro que el disacárido sintetizado β -galactosil-fucosa no puede poseer el enlace β (1-6) ya que el sustrato aceptor al ser una 6-desoxy-L-galactosa no tiene un OH disponible en el C6 que pueda aceptar la galactosa y formar el enlace glicosídico (Becker y Lowe, 2003).

Las tres fracciones del β -galactosil-fucosa purificadas fueron sometidas a la acción de β -galactosidasas (*E. coli*, *A. oryzae* e hipertermofílica GLY 001-02) con diferentes regioselectividades. Como se muestra en la tabla 17 las fracciones 1y 2 del disacárido sintetizado fueron hidrolizadas por la β -galactosidasa de *A. oryzae* e hipertermofílica GLY 001-02, pero no ocurrió lo mismo con la β -galactosidasa de *E. coli*. Mientras que la fracción 3 del disacárido fue hidrolizada por las tres enzimas.

Basándonos en los resultados anteriores, podemos decir que existe la posibilidad de que alguno de los disacáridos sintetizados presente un enlace β (1-2) ó β (1-3), haciéndolo un buen candidato para ser estudiado como disacárido con efecto prebiótico. Debido a que el lumen del intestino humano no expresa las enzimas que rompen enlaces α -glicosídicos a fucosa y ácido siálico así como enlaces β -glicosídicos a excepción del β (1-4). Por otro lado, los probióticos presentes en el intestino expresan glicosidasas para metabolizar OS como las α y β -galactosidasas (Boehm y Moro, 2008; Domínguez-Vergara y col., 2009).

Tabla 17: Análisis de β -galactosil-fucosa empleando β -galactosidasas de diferentes regioselectividades

Fracción	<i>E. coli</i> β (1-3/4)	<i>A. oryzae</i> β (1-3/4/6)	Hipertermofílica β (1-4/6)
1	No	Si	+/-
2	No	Si	+/-
3	+/-	Si	+/-

(Deya, 1990, Nilsson, 1990; Fang y col., 1998; Rabiú, 2001 y Albayrak y Yang, 2001)

En general, la cantidad y la naturaleza de los OS sintetizados depende del origen de la enzima, concentración y naturaleza del sustrato, grado de conversión del sustrato y las condiciones de reacción. (Mahoney, 1998; Chockchaisawasdee y col., 2005). Estudios realizados en síntesis de galactooligosacáridos (GOS) mediante reacciones de transgalactosilación empleando lactosa como sustrato donador de galactosa y catalizado por β -galactosidasa, genera la producción de β (1-2) β (1-3) y β (1-4) unidos a la fracción glucosa (β -galactosil-glucosa) y enlaces β (1-4) y β (1-6) presentes en la fracción galactosa (β -galactosil-galactosa) (Macfarlane y col., 2007), lo que demuestra la gran importancia de la naturaleza del aceptor para la formación de enlaces, ya que a pesar de las similitudes entre los aceptores galactosa y glucosa (difieren en una posición de un OH) la naturaleza y proporción de los OS sintetizados son completamente distintos. Así mismo ocurre con los disacáridos β -galactosil-fucosa producidos por la β -glicosidasa hipertermofílica ya que la fucosa es un monosacárido totalmente distinto a la galactosa ó a la glucosa, esto fue al obtenerse tres de los 4 disacáridos que teóricamente sería posible sintetizar al haber cuatro OH disponibles en la fucosa. Para caracterizar los isómeros β -galactosil-fucosa es necesario realizar un análisis por RMN.

Por otra parte, el hecho de que los OS sintetizados por este método contengan fucosa como parte de su estructura es de gran importancia, ya que el principal objetivo en este estudio fue sintetizar compuestos estructuralmente semejantes a los presentes en la leche materna, que tengan la posibilidad de mimetizar sus estructuras. Un oligosacárido puede mimetizar a otro cuando existe similitud en sus estructuras químicas, lo anterior debido a que las interacciones proteína carbohidrato son altamente específicas. Los oligosacáridos de la leche humana presentan dicha similitud y por ello evitan la adhesión de los patógenos al intestino del infante (Kunz y col., 2000). Dada la gran importancia del consumo de OS durante la lactancia, se ha buscado la manera de crear fórmulas lácteas que aporten los mismos beneficios que la leche materna. Se han creado diferentes formulaciones empleando fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS), sin embargo, hay que considerar que las estructuras de los OS de leche humana son mucho más complejas que las de los FOS y GOS empleados en el diseño de fórmulas lácteas. Además, estos últimos carecen de fucosa y de ácido siálico necesarios, en muchos casos, para que los enteropatógenos reconozcan a las células del intestino, además, la galactosa también es importante en este tipo de uniones ya que varias adhesinas microbianas son específicas para galactosa (Domínguez-Vergara y col., 2009).

7 Conclusiones

- Se logró sintetizar un trisacárido fucosilado mediante reacción de fucosilación con la α -L-fucosidasa de *Bos taurus*, empleando como sustrato donador PNP-F y como sustrato aceptor lactosa. Lo que demuestra la viabilidad de la reacción utilizando exclusivamente glicosil-hidrolasas.
- Se lograron sintetizar 8 disacáridos mediante reacciones de fucosilación y se comprobó la existencia de fucosa 4 de ellos por hidrólisis enzimática.
- Se sintetizó un disacárido con la α -galactosidasa presente en el producto “Beano” utilizando melibiosa como sustrato donador y fucosa como aceptor.
- Se sintetizaron 4 disacáridos con la α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleando maltosa como sustrato donador y fucosa como sustrato aceptor. Se comprobó la presencia de fucosa en uno de los disacáridos sintetizados.
- Se sintetizaron 3 disacáridos con la β -glicosidasa hipertermofílica GLY 001-002 usando lactosa como sustrato donador y fucosa como sustrato aceptor. Se comprobó la presencia de fucosa en los disacáridos por hidrólisis enzimática.
- Debido a que los oligosacáridos fucosilados sintetizados en esta investigación son similares estructuralmente a los OS de la leche materna, éstos podrían aportar los mismos beneficios a la salud humana como compuestos prebióticos y antiinfecciosos principalmente, con lo cual se tendría una opción que beneficiaría a los bebés que no pueden ser amamantados.

8 Bibliografía

1. Ajisaka K. y Yamamoto Y. 2002. Control of the regioselectivity in the enzymatic syntheses of oligosaccharides using glycosidases. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 14: 1–11.
2. Albayrak N., Yang S. 2002. Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose by *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase Immobilized on Cotton Cloth. *Biotechnology and Bioengineering* 77: 8-19.
3. Albermann C., Piepersberg W. y Wehmeier U. 2001. Synthesis of the milk Oligosaccharides 2'Fucosyllactose using Recombinant Bacterial Enzymes. *Carbohydrate Research* 334: 97-103.
4. Andersson B., Porras O., Hanson L., Lagergård T. y Svanborg C. Andersson. 1986. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *Journal of Infectious Diseases* 153: 232–237.
5. Becker D., Lowe J. 2003. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13 (7): 41R-53R.
6. Bhatia Y., Mishra S. y Bisaria V. 2002. Microbial beta-glucosidases: Cloning, properties, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 22: 375–407.
7. Bing M., Simala J. y Taylor D. 2006. Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology* 16 (12):158R-184R.
8. Bode L., Kunz C., Muhly M., Mayer K., Seeger W., Rudloff S. 2004a. Inhibition of monocyte, lymphocyte, and neutrophil adhesion to endothelial cells by human milk oligosaccharides. *Journal Thrombosis and Haemost* 92: 1402–1410.
9. Bode L., Rudloff S., Kunz C., Strobel S., Klein N. 2004b. Human milk oligosaccharides reduce platelet–neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil X2 integrin expression. *Journal of Leukocyte Biology*: 1–7.
10. Boehm G. and Stahl B. 2007. Oligosaccharides from Milk. *The Journal of Nutrition* 137: 847S-849S.
11. Boehm G. and Moro G. 2008. Structural and Functional Aspects of Prebiotics Used in Infants Nutrition. *The Journal of Nutrition* 138: 1818S-1828S.

12. Cardelle A., Villamiel M., Olano A., Corzo N. 2008. Study of galactooligosaccharide formation from lactose using Pectinex Ultra SP-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 954-961.
13. Chaturvedi P., Warren C., Altaye M., Morrow A., Ruiz G., Pickering L y Newburg D. 2001. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* 11(5): 365-372.
14. Chockchaisawasdee S., Athanasopoulos V., Niranjana K., Rastall R. 2005. Synthesis of Galacto-oligosaccharide from Lactose Using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on Batch and Continuous UF Membrane-Fitted Bioreactors. *Biotechnol Bioeng.* 89 (4): 434-443.
15. Coppa G., Bruni S., Zampini L., Galeazzi T., Facinelli B., Capretti R., Carlucci A. y Gabrielli O. 2003. Oligosaccharides of human milk inhibit the adhesion of *Listeria monocytogenes* to Caco-2 cells. *Italian Journal of Pediatrics.* 29: 61–68.
16. Cravioto A., Tello A., Villafán H., Ruiz J., Del Vedovo S., y Neeser J. 1991. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *Journal Infectious Diseases* 163: 1247–1255.
17. Crout G. y Vic G. 1998. Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2: 98–111.
18. Cruz-Guerrero A. 2005. Síntesis de galactooligosacáridos con β -galactosidasa en solventes orgánicos. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
19. Cruz-Hernandez C. 1999. Caracterización bioquímica y funcional de una β -glicosidasa hipertermofílica. Tesis para obtener el grado de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
20. De Rode M., Franssen M., Padt A. y Boom R. 2003. Perspectives for the Industrial Enzymatic Production of Glycosides. *Biotechnology Progress* 19 (5): 1391–1402.
21. Deya. 1990. Enzymic syntheses of oligosaccharides from lactose and utilization of these oligosaccharides. *Yukijirushi Nyugyo Kenkyusho Hokoku* 92: 1-54

22. Domínguez-Vergara A., Vázquez L., Ramos G. 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. Archivos Latinoamericanos de nutrición 59 (4): 358-368
23. Engfer M., Stahl B., Finke B., Sawatzki G., Daniel H. 2000. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. American Journal Clinical Nutrition 71: 1589–1596.
24. Fanaro S., Vigi V. 2008. Which role for prebiotics at weaning. Journal of Clinical Gastroenterology 42: S209-S213
25. Fang J., Xie W., Li J., y Wang P., 1998. Chemical and Enzymatic Synthesis of Glycoconjugates 3. Synthesis of Lactosamine by Thermophilic Galactosidase Catalyzed Galactosylation on a Multigram Scale. Tetrahedron Letters 39: 919-922.
26. Farkas E., Thiem J., Ajisaka K. 2000. Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified α -L-fucosidase from *Penicillium multicolor*. Carbohydrate Research 328: 293–299
27. Gibson G., Probert H., Van Loo J., Rastall R and Roberfroid M. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews 17: 259-275.
28. Gnoth M., Kunz C., Kinne E., Rudloff S. 2000. Human milk oligosaccharides are minimally digested in vitro. The Journal of Nutrition 130: 3014–3020.
29. Gudiel-Urbano y Goñi. 2001. Oligosacáridos de la Leche Humana. Papel en la salud y el desarrollo del lactante. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 51 (4): 332-339.
30. Heithoff M., Conner P., Mahan J. 1997. Dissecting the biology of a pathogen during infection. Trends in Microbiology 12: 509-513.
31. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>
32. <http://www.cazy.org/Home.html>
33. <http://www.biochem.ucl.ac>
34. <http://www.brenda-enzymes.info/>
35. <http://ebi.ac>
36. <http://www.expansy.org>

37. Huerta L. Revisión: Síntesis Enzimática de Galacto-oligosacáridos a partir de residuos de la industria láctea: Desafíos tecnológicos y oportunidades
38. Ichikawa Y., Look G., Wong H. y Kajimoto T. 1992 Synthesis of oligosaccharides using glycosyltransferases. *J. Synth. Org. Chem. Japan* 50: 441–450.
39. Iwasaki K., Nakajima M., Nakao S. 1996. Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β -Galactosidase. *Process Biochem.* 31 (1): 69-76
40. Jiménez- Guzmán. 2003. Influencia de las proteínas de la leche y su tratamiento térmico en la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces fragilis*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
41. Kannagi R. 2002. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Current Opinion Structural Biology* 12: 599–608
42. Koizumi S., Endo T., Tabata K., Ozaki A. 1998. Large-scale production of UDP-galactose and globotriose by coupling metabolically engineered bacteria. *Nature Biotechnol* 16: 847–850.
43. Kunz C., Rudloff S., Baie W., Klein N y Strobet S. 2000. Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional and Metabolic Aspects. *Annual Review Nutrition* 20: 699-722.
44. La Ferla B., Prospero D., Lay L., Russo G. y Panza L. 2002. Synthesis of Building Blocks of Human Milk Oligosaccharides. Fucosylated derivatives of the lacto- and neolacto-series. *Carbohydrate Research* 337: 1333-1342.
45. Lairson L., Henrissat B., Davies G. y Withers S. 2008. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual Review Biochem* 77: 521-555.
46. Li y Wang. 1997. Chemical and Enzymatic Synthesis Glycoconjugates 2. High Yielding Regioselective Synthesis of N-Acetylglucosamine by use of Recombinant Thermophilic Glycosidases Library. *Tetrahedron Letters* 38: 7967-7970.
47. Macfarlane G., Steed, H., Macfarlane S. 2007. Review: Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other Prebiotics. *J. Appl Microbiol* 13: 1-40.
48. Mahoney R. 1998. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chemistry* 63 (2): 147-154.
49. Mark J., Stray L. y Tymoczko J. 2008. Bioquímica. Reverté. Barcelona España: 319-320
50. Miñana V. 2007. Oligosacáridos en la Leche Humana. *Acta Pediátrica Española* 65 (3): 129-133.

51. Morrow A., Rangel J. 2004. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care seminars in pediatric infectious diseases. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 15: 221-228.
52. Morrow A., Ruiz-Palacios G., Jiang X., and Newburg, D. 2005. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *Symposium: Innate Immunity and Human Milk. The Journal of Nutrition* 135:1304–1307.
53. Mussatto S. and Mancilha I. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* 68: 587-597.
54. Nakhla T., Fu D., Zopf D., Brodsky N and Hurt H. 1999. Neutral Oligosaccharide content of preterm Human Milk. *The Journal of Nutrition* 82: 361-367.
55. Neri D., Balcão V., Costa R., Rocha I., Ferreira E., Torres D, Rodrigues L., Carvalho L., Teixeira J. 2009. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry* 115: 92–99
56. Newburg D. 1999. Human milk glycoconjugates that inhibit pathogens. *Current Medicinal Chemistry* 6: 117–127.
57. Nilsson K., 1990. Method of controlling the regioselectivity of glycosidic bonds. United States Patent. Patent No 4 918 009.
58. Nilsson K., 1993. Method for synthesis of oligosaccharides. United States Patent. Patent No 5 246 840.
59. Nilsson K., 1996. Enzymatic method for synthesis of carbohydrates. United States Patent. Patent No 5 532 147.
60. Nilsson K., 2001. N-Containing saccharides end method for the synthesis of n-containing saccharides from amino-desoxy-disaccharides and amino-desoxy-oligosaccharides. United States Patent. Patent No US 6 183 994 B1.
61. Nilsson y col., 1995. Production of Glucosamine containing disaccharides of the Lewis-a y -x types employing glycosidases. *Biotechnology Letters* 17 (7): 717-722.
62. Ofek I., Sharon N. 1990. Adhesins as lectins: specificity and role in infection. *Current Topics Microbiology and Immunology* 151: 91-113.
63. Planas A. y Faijes M. 2002. Glycosidases and glycosynthases in enzymatic synthesis of oligosaccharides. An overview. *Afinidad*. 59: 295–313.

64. Plou F., Gomez A. y Ballesteros A. 2007. Application of glycosidases and transglycosidases in the synthesis of oligosaccharides. Chapter 9. Springer: 141-157.
65. Rabiou A., Jay J., Gibson R. y Rastall A. 2001. Synthesis and fermentation properties of novel galacto-oligosaccharides by galactosidases from *Bifidobacterium* species. *American Society for Microbiology* 67: 2526–2530.
66. Ruiz-Palacios G. y col., 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc- α -1,2Gal- β -1,4GlcNAc) and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 14112-14120.
67. Scheppokat A., Morita M., Hiem J. Y Bretting H. 2003. Enzymatic α (1-2) fucosylation: investigation of the specificity of the α (1-2)-L-galactosyltransferase from *Helix pomatia*. *Tetrahedron Asymmetry* 14: 2381-2386.
68. Scigelova M., Singh S. y Crout. 1999. Glycosidases- a great synthetic tool. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6: 483–494
69. Sharon N. 2006. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*.1760(4) : 527-537.
70. Skoog y col., 2001. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill. España. 5ª edición.
71. Smoot J. y Demchenko V., 2009. Oligosaccharide synthesis: from conventional methods to modern expeditious strategies. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 62: Pp 161-250.
72. Stahl B., Thurl S., Zeng J., Karas M., Hillenkamp F., Steup M. 1994. Oligosaccharides from milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 223: 218-226.
73. Svensson S. y Thiem J. 1990. Purification of α -L-fucosidase by C-glycosylic affinity chromatography, and the enzymic synthesis of α -L-fucosyl disaccharides. *Carbohydrate Research* 200: 391-402
74. Teijón y col., 2005. Fundamentos de Bioquímica estructural. Alfa omega grupo editores, S. A de C. V. México.
75. Toba T., Yokota A y Adach S. 1995. Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase *Food Chemistry* 16. (2): 147-162.

-
76. Toepfer A. y Schmidt R. 1992. An efficient synthesis of the Lewis X (Le^x) antigen family. *Tetrahedron Letters* 33. 5161:5164.
 77. Voet y Voet. 2006. *Bioquímica*. 3^o edición. Medica Panamericana S. A. Argentina.
 78. Wang B., Brand J. 2003. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 57: 1351-1369
 79. Yang S., Okos M. 1989. A new graphical method for determining parameters in Michaelis-Menten type kinetics for enzymatic lactose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 763-77.
 80. Zeng X., Morimoto S., Murata T. and Usui T. 1999. Regioselectivity of α -L-fucopyranosyloligosaccharide Formation by the α -L-Fucosidase from Porcine Liver. *Journal of Applied Glycoscience* 46: 241-247.