



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE FUCOSILSACÁRIDOS: OPTIMIZACIÓN DE
COMPUESTOS CON POTENCIAL APLICACIÓN EN FÓRMULAS LÁCTEAS
INFANTILES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LAURA PAULINA BARRERA MUÑOZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Agustín López Munguía Canales

VOCAL: Profesor: María de Lourdes Gómez Ríos

SECRETARIO: Profesor: Sergio Andrés Alatorre Santamaría

1er. SUPLENTE: Profesor: Sandra Pérez Munguía

2° SUPLENTE: Profesor: Carmina Montiel Pacheco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA, PLANTA PILOTO 2, UAM-IZTAPALAPA

ASESOR DEL TEMA:

Sergio Andrés Alatorre Santamaría

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

Alma Elizabeth Cruz Guerrero

SUSTENTANTE (S):

Laura Paulina Barrera Muñoz

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 La leche humana e importancia de la lactancia	4
3.2 Composición de la leche humana	4
3.3 Fórmulas lácteas infantiles.....	7
3.4 Biosíntesis.....	7
3.5 Síntesis in vitro.....	8
3.5.1 Síntesis química.....	8
3.5.2 Síntesis enzimática	11
3.5.3 Síntesis quimioenzimática	15
3.6 Beneficios del uso de oligosacáridos	17
3.6.1 Efecto prebiótico	18
3.6.2 Efecto antiadhesivo.....	18
3.6.3 Modulación del sistema inmune.....	19
4. OBJETIVOS	20
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	21
5.1 Obtención de los donadores de fucosa.....	21

5.1.1 Purificación	22
5.2 Análisis de los carbohidratos y donadores de fucosa	22
5.3 Estudio del reconocimiento del sustrato.....	23
5.3.1 Preparación de la enzima α -L-fucosidasa.....	23
5.3.2 Reacción de hidrólisis con α -L-fucosidasa.....	23
5.4 Estudio de la transferencia de fucosa. Reacción de transfucosilación.....	24
5.4.1 Reacción de Transfucosilación	24
5.4.2 Reacción de Transfucosilación con diferentes aceptores	24
5.4.3 Efecto de la concentración de bencilfucosa en la transfucosilación.....	25
5.5 Actividad residual de la enzima α -L-fucosidasa	26
5.5.1 Actividad enzimática	26
5.5.2 Actividad de la enzima después de tratamiento térmico	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1 Obtención de los donadores de fucosa.....	27
6.2 Identificación de los donadores de fucosa por HPLC.....	29
6.3 Estudio del reconocimiento del sustrato.....	30
6.4 Estudio de la transferencia de fucosa. Reacción de transfucosilación.....	31
6.5 Reacción de transfucosilación: isoamilfucosa y bencilfucosa	32
6.5.1 Isoamilfucosa.....	32
6.5.2 Bencilfucosa	35

6.5.3 Efecto de la concentración de bencilfucosa en la transfucosilación.....	37
6.6 Actividad residual de la enzima α -L-fucosidasa	40
7.CONCLUSIONES.....	42
8. BIBLIOGRAFÍA	44
9. ANEXO.....	50

1. RESUMEN

La leche humana es el alimento más importante para un recién nacido debido a que contiene todo lo necesario para su crecimiento y desarrollo óptimo en los primeros días de su vida. Por lo consecuente a los recién nacidos que no cuentan con este alimento tienen un mayor porcentaje de fallecer por enfermedad como lo han reportado varias organizaciones.

La presencia y particularmente la notable abundancia de oligosacáridos en la leche humana como el tercer componente sólido más grande ha generado interés para conocer su funcionamiento y composición. Los oligosacáridos de la leche humana se han estudiado ampliamente por tener la capacidad de aportar beneficios en la salud de los lactantes. Por lo cual se han buscado métodos para su síntesis, uno de ellos es la síntesis quimioenzimática que pretende perfeccionar la obtención de estos compuestos al mezclar dos métodos que ya se utilizan en la obtención de estos compuestos.

En este proyecto se realizó la síntesis de oligosacáridos fucosilados por medio de la reacción enzimática de transfucosilación catalizada por la α -L-fucosidasa recombinante de *Thermotoga maritima* utilizando como sustrato diferentes aceptores y donadores de fucosa. Se logró sintetizar quimioenzimáticamente oligosacáridos fucosilados a partir de donadores sintetizados químicamente, además se definieron algunas condiciones de trabajo para optimizar el rendimiento.

2. INTRODUCCIÓN

La presencia y la abundancia de oligosacáridos en la leche humana han llevado a diferentes grupos de investigadores a buscar funciones biológicas de estas moléculas. Estos son carbohidratos complejos solubles que se sintetizan en las glándulas mamarias, lo cual depende del genotipo materno, es decir que cuenten con las enzimas necesarias para producir los diferentes oligosacáridos (Doare y col., 2018; German y col., 2008).

Los oligosacáridos de la leche humana (OLH) se han estudiado ampliamente por tener la capacidad de aportar beneficios en la salud de los lactantes. Se destacan por su carácter prebiótico, actuando como receptores competitivos para algunas bacterias patógenas, impidiendo su adhesión a la superficie epitelial del intestino, así como previniendo infecciones (Bode, 2012). En la leche humana es donde se encuentran en mayor cantidad estos oligosacáridos en comparación con los demás mamíferos productores de leche (Oliveira y col., 2015).

Por todo esto se han buscado métodos de obtención, uno de ellos es la síntesis quimioenzimática que pretende perfeccionar la obtención de estos compuestos, además de permitir la mejora de estructuras existentes y la construcción al por mayor de estructuras similares a los OLH.

Entre la gran variedad de prebióticos actualmente disponibles y emergentes, relativamente pocos han sido examinados para su uso en fórmulas infantiles

(Chichlowski y col., 2011). Debido a esto es una clara oportunidad de desarrollo el uso de prebióticos tanto en fórmulas infantiles, como en otros productos.

En este proyecto se realizó la síntesis de oligosacáridos fucosilados por medio de la reacción enzimática de transfucosilación catalizada por la α -L-fucosidasa recombinante de *Thermotoga maritima*. De esta manera, se busca mejorar la síntesis de oligosacáridos fucosilados analizando el efecto que tiene el uso de diferentes donadores y la concentración del donador, así como observar la cinética de la reacción.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 La leche humana e importancia de la lactancia

La leche humana es el alimento ideal para los lactantes, pues tiene propiedades inmunológicas y nutricionales que no se encuentran en ninguno de los sucedáneos. Este es un fluido vivo, cambiante, desarrollado a través de millones de años de evolución que se adapta en función a las necesidades de cada etapa de la vida de los lactantes, por lo que protege su salud y estimula su óptimo desarrollo físico y mental (Martínez y Cordero, 2016).

La lactancia exclusivamente materna durante los primeros seis meses de vida aporta muchos beneficios a los lactantes, al mismo tiempo que el inicio temprano de la lactancia materna (en la primera hora de vida) protege al recién nacido de las infecciones y reduce la mortalidad neonatal. A nivel mundial, solo el 43% de los bebés menores de seis meses son amamantados, lo que representa un problema de salud (OMS, 2018; UNICEF, 2016).

3.2 Composición de la leche humana

Un litro de leche humana aporta alrededor de 700 kcal, consiste en diferentes nutrientes, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales, vitaminas y oligoelementos que son de primordial importancia para satisfacer las necesidades nutricionales de los recién nacidos y asegurar el crecimiento y desarrollo normal. (Tabla 1; FAO, 2002).

Tabla 1. Comparación del contenido de nutrientes de leche humana y leche de vaca en 100 g.
(FAO,2002)

Tipo de leche	Energía (kcal)	Carbohidratos (g)	Proteínas (g)	Grasas (g)	Calcio (mg)	Hierro (mg)	Vitamina A (µg)	Folato (µg)	Vitamina C (mg)
Leche humana	70	7.0	1.03	4.6	30	0.02	48	5	5
Leche de vaca (entera)	61	5.4	3.3	3.3	119	0.05	31	5	1

El principal carbohidrato de la leche humana es el disacárido lactosa, cuya concentración es la menos variable de los macronutrientes. Posteriormente es la presencia de glicanos, los cuales son muy diversos y complejos, debido a varios factores como puede ser por el número de diferentes azúcares, la estructura molecular de cada residuo de azúcar, así como los enlaces entre ellos que conducen a múltiples isómeros para una sola masa, y si están libres o unidos a proteínas, péptidos o lípidos. Dentro de estos se encuentran los oligosacáridos que son cadenas complejas de monosacáridos.

3.2.1 Oligosacáridos en la leche humana (OLH)

La leche humana contiene entre 7 y 12 g/L de oligosacáridos, de los cuales se han identificado más de 200 especies moleculares de OLH, algunas se muestran en la figura 1. Esta diversidad estructural es debido a la combinación que se genera a partir de los cinco monosacáridos que los componen: D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina, L-fucosa y ácido siálico (Xi, 2015).

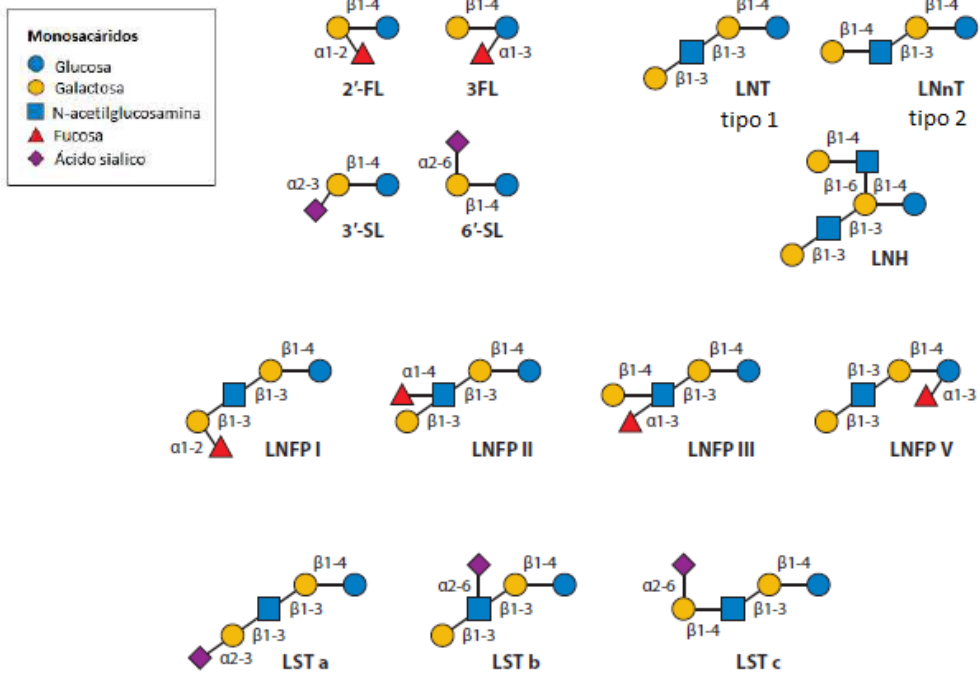


Figura 1. Ejemplo de oligosacáridos presentes en la leche humana (Smilowitz y col.,2014)

(2'-FL) 2'-fucosil-lactosa; (3FL) 3-fucosil-lactosa; (3'-SL) 3'-sialil-lactosa; (6'-SL) 6'-sialil-lactosa; (LNFP I, II, III, V) lacto-N-fucopentosa I, II, III, V; (LNnH) lacto-N-hexaosa; (LNnT) lacto-N-neotetraosa; (LNT) lacto-N-tetraosa; (LST a,b,c) sialillacto-N-tetraosa a-c.

En los OLH existen diferentes categorías entre ellas se encuentran los oligosacáridos neutros que incluyen a los oligosacáridos fucosilados. Los oligosacáridos fucosilados son los que se encuentran en mayor proporción, entre estos se encuentran las moléculas de 2'-fucosil-lactosa (2'-FL), 3-fucosil-lactosa (3-FL) y difucosil-lactosa. Se conoce que 2'-fucosil-lactosa inhibe la unión de *Campylobacter jejuni* a la mucosa intestinal disminuyendo la presencia de infecciones (Morrow y col., 2004).

3.3 Fórmulas lácteas infantiles

La fórmula infantil se define como un alimento para lactantes que es adecuado para sustituir a la leche humana satisfaciendo las necesidades nutricionales del lactante. Las fórmulas lácteas infantiles comercializadas pueden ser clasificadas en función de la naturaleza y origen de la proteína, fórmulas a base de leche de vaca (con predominio de caseína o suero de leche), a base de concentrados de proteínas (preferentemente de soya) y a base de hidrolizados de proteína.

En la mayoría de estas fórmulas carecen de contenido de fucosilsacáridos, y en su lugar se añaden galactooligosacáridos y fructooligosacáridos, estos compuestos no aportan los mismos beneficios a la salud del lactante (Bode, 2012; Gómez-Álvarez, 2002).

3.4 Biosíntesis

De manera natural la síntesis de estos oligosacáridos se lleva a cabo dentro de las células de la glándula mamaria lactante específicamente en el aparato de Golgi. Después de la producción de la lactosa que está regulada por α -lactoalbúmina, donde se utilizan una variedad de transferasas específicas como galactosiltransferasa, N-acetilglucosamiltransferasa, fucosiltransferasa y sialiltransferasas estas enzimas adicionan monosacáridos sobre la lactosa para formar las distintas moléculas de oligosacáridos (Chichlowski y col., 2011). En el caso de la fucosa la adición depende de las acciones de al menos tres diferentes fucosiltransferasas (FucT) (Kunz y col., 2000).

3.5 Síntesis in vitro

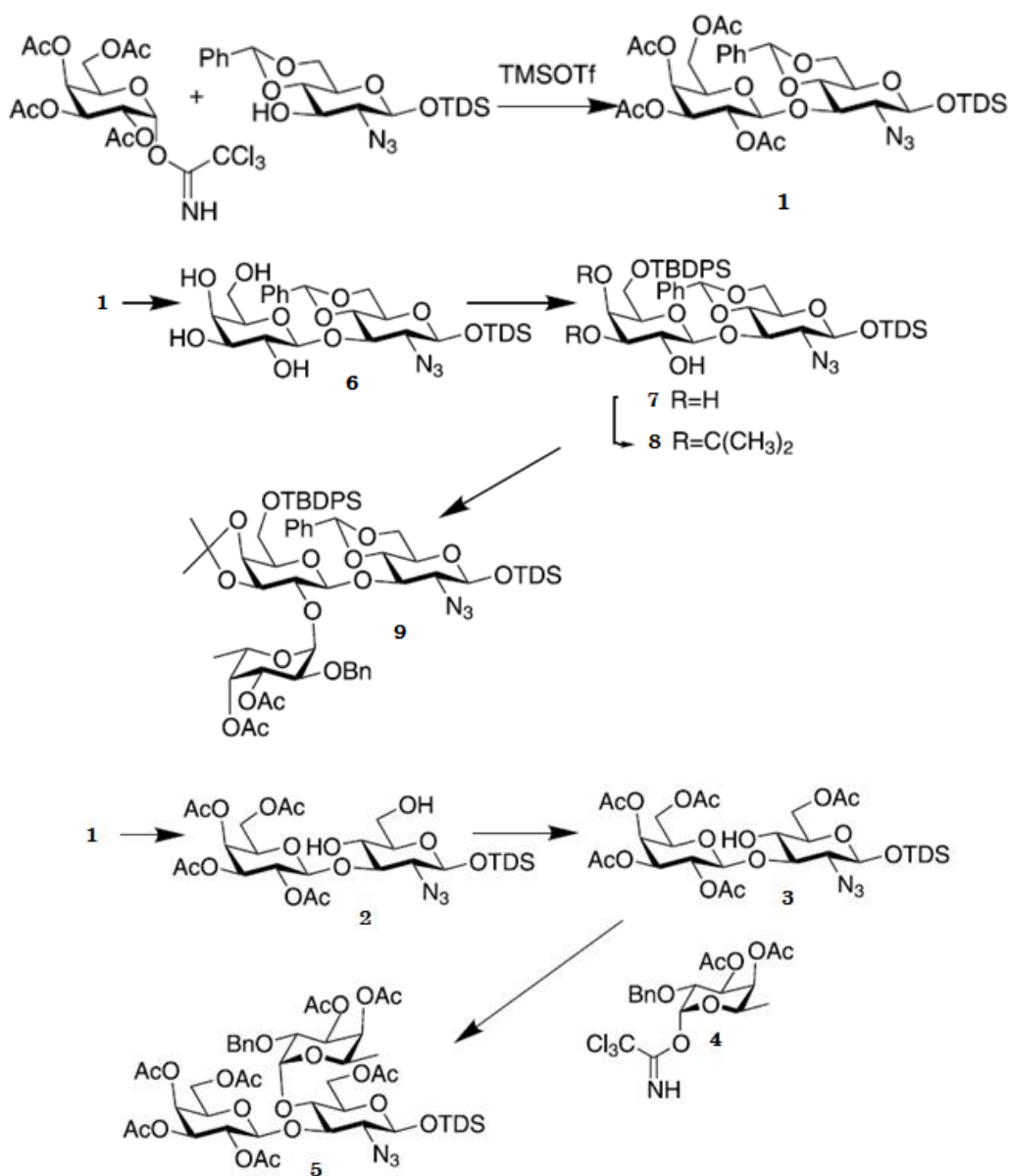
Debido a la importancia de estos compuestos se ha impulsado la búsqueda de métodos de síntesis, intentado por diversas vías, tales como la síntesis química, la enzimática y la quimioenzimática, que tienen como objetivo la producción de oligosacáridos en gran escala.

3.5.1 Síntesis química

La síntesis química de oligosacáridos requiere de múltiples pasos de reacción, debido a la complejidad de los OLH, ya que contienen un gran número de grupos hidroxilos libres con reactividad similar, por lo que es necesario la protección y desprotección de estos grupos, así como la activación de carbonos anoméricos. La mayoría de estos procedimientos tienen como inconveniente los bajos rendimientos y el uso de reactivos tóxicos que no son apropiados para los productos alimenticios. Un ejemplo de síntesis química es el publicado por La Ferla y col. (2002) donde estudiaron la síntesis de diversos oligosacáridos fucosilados, con grupos protegidos a partir de un precursor, algunos ejemplos son el compuesto **A** y **B** que se representan en la figura 2.

El precursor **1** (figura 2) se obtiene a partir de dos monosacáridos en presencia trimetilsilil trifluorometanosulfonato (TMSOTf), este se utilizó como punto de partida. El compuesto **5** es el derivado protegido del compuesto **A**, se sintetizó de manera directa, se inicia con la eliminación del grupo bencilideno del compuesto **1** seguido de una acetilación selectiva de la posición primaria a baja temperatura con cloruro de acetilo produciendo el aceptor **3**. Este se fucosilo utilizando al donante **4**, este donante se encuentra parcialmente acetilado debido a que es más estable y fácil de

usar en estas condiciones. Produciendo el compuesto **5** con un rendimiento del 79%. Para el compuesto **9** que es el derivado protegido del compuesto **B**, se inicia con la eliminación de los grupos acetatos de la unidad de galactosa del compuesto **1** y la posición 1' que se encuentra libre se silió mediante la introducción de un grupo t-butildifenilsililo. Las posiciones 3' y 4' del compuesto **7** se protegieron con un grupo isopropilideno que proporciona un aceptor **8** que se fucosila con el donante **4** en presencia de TMSOTf para dar el trisacárido **9** con un rendimiento del 66%.



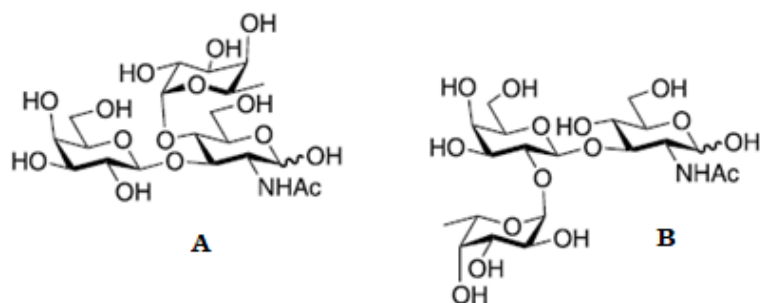
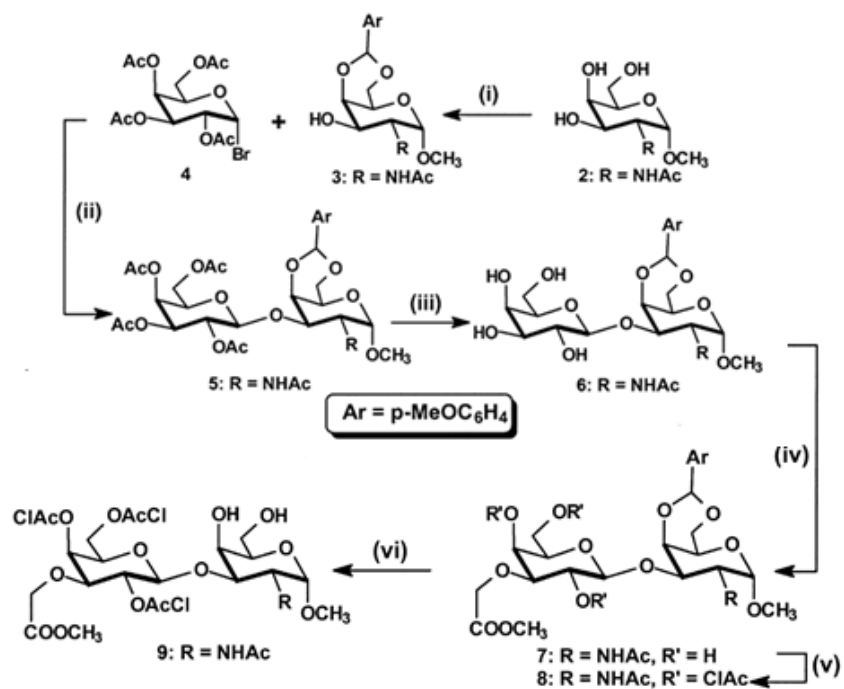


Figura 2. Esquema de síntesis de oligosacáridos fucosilados (La Ferla y col.,2002)

Por su parte (figura 3), Xia y col., (2000) proponen la síntesis de un pentasacárido **1** que se observa en la figura 3 con una serie de pasos, se inicia con el compuesto **2** con este se lleva a cabo 5 pasos de protección/ desprotección (i, iii, iv, v, vi) y una glicosilación (ii) donde se obtiene el disacárido **9** el cual se acopla regioselectivamente (vii) a un trisacárido donador tipo Lewis-x catalizado NIS/TfOH (simportador de Na^+/I^- /ácido trifluorometansulfónico). Después sufre una o-decloroacetilación (viii), una sulfatación regioselectiva (ix) y finalmente la eliminación de los grupos protectores (x, xi, xii, xiii, xiv).



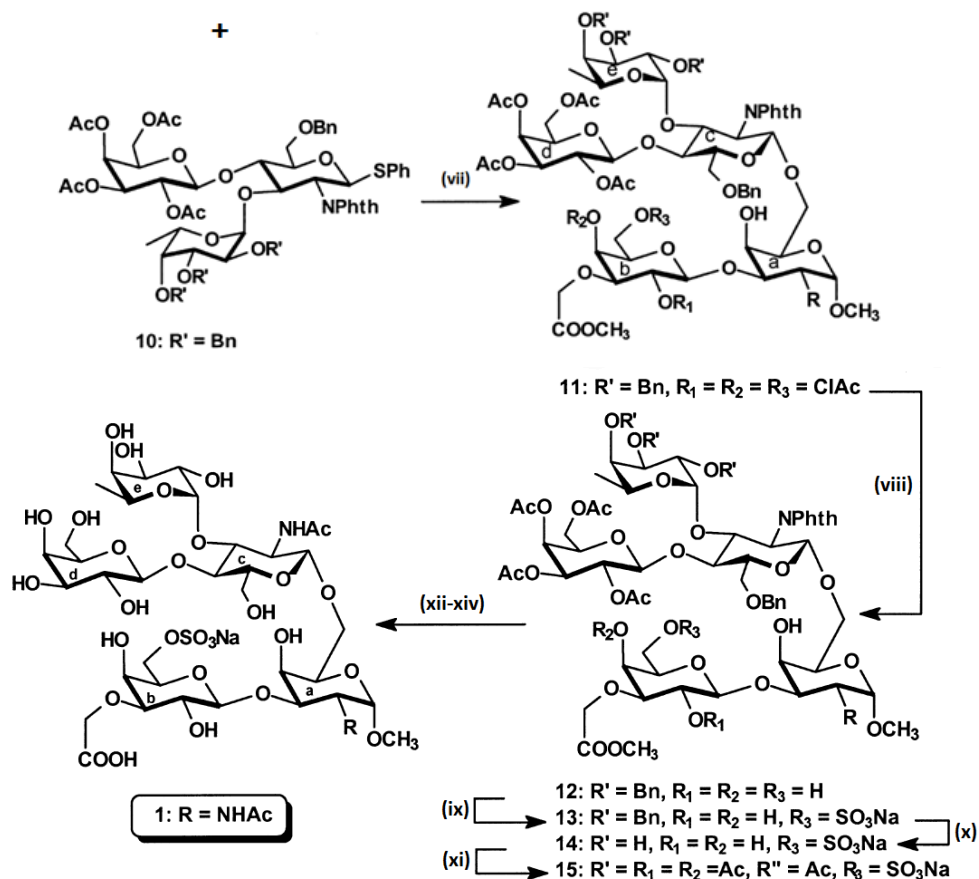


Figura 3. Esquema de síntesis de un pentasacárido (Xia y col.,2000)

3.5.2 Síntesis enzimática

La síntesis enzimática ha sido una de las mejores opciones de obtención de estos productos debido a la alta especificidad que presenta. Se ha estudiado el uso de enzimas como glucosiltransferasas y glicosidasas, además de la modificación genética de microorganismos para la producción de oligosacáridos.

3.5.2.1 Glucosiltransferasas

Las glucosiltransferasas catalizan la transferencia de restos de azúcar de moléculas donadoras a moléculasceptoras, formando enlaces glicosídicos. Se pueden distinguir en dos grupos principales de glucosiltransferasas: las del tipo Leloir y las

del tipo no Leloir (figura 4). La del tipo Leloir utiliza un nucleótido-difosfato para activar al donador y la del tipo no Leloir utilizan donadores fosforilados (Carel y col., 2008).

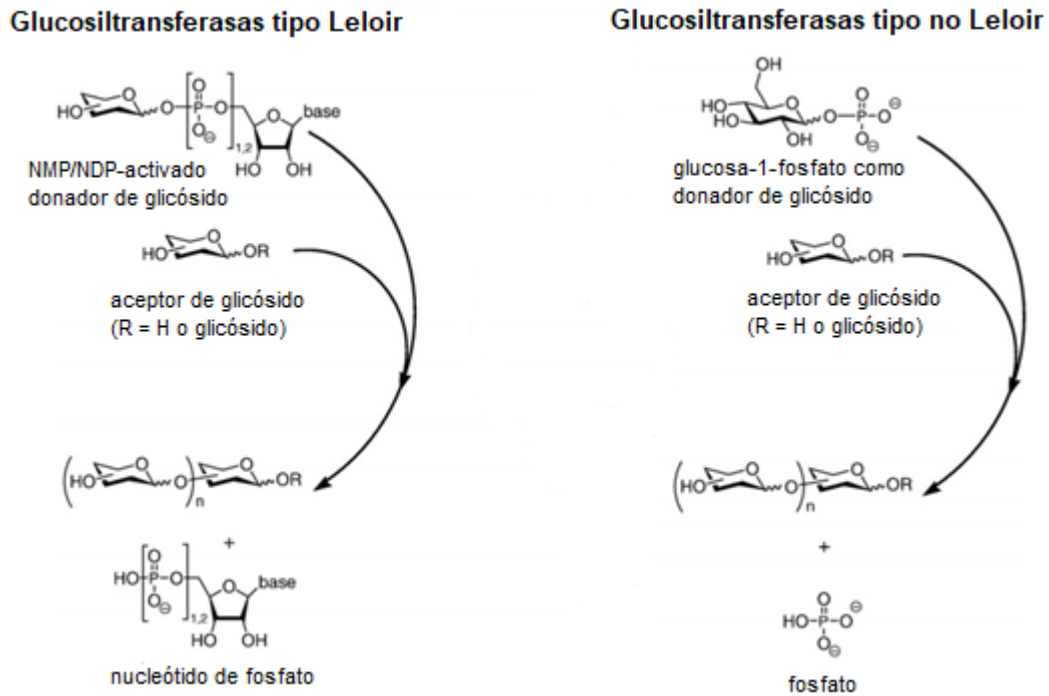


Figura 4. Síntesis enzimática de oligosacáridos por glucosiltransferasas de Leloir y no Leloir. (Carel y col.,2008)

Las fucosiltransferasas son un tipo de glucosiltransferasas, que catalizan la transferencia del grupo fucosilo de un donador fucosil-nucleótido a un sustrato aceptor (carbohidrato). Su uso está restringido debido a la poca disponibilidad de este tipo de enzimas, además de contar con la dificultad de que cada enzima necesita de un donador específico y el alto costo de estas enzimas.

3.5.2.2 Glicosidasas

Las glicosidasas son glicosil hidrolasas, que su función es hidrolizar sustratos que contiene un monosacárido unido por un enlace α ó β , pero con ciertas condiciones puede catalizar la reacción de transglicosilación. La reacción con una enzima glicosidasa produce un intermediario glicósido-enzima que puede ser interceptado por agua, para dar el producto de hidrólisis, o por un aceptor de glicósido para formar un nuevo glicósido u oligosacárido (figura 5).

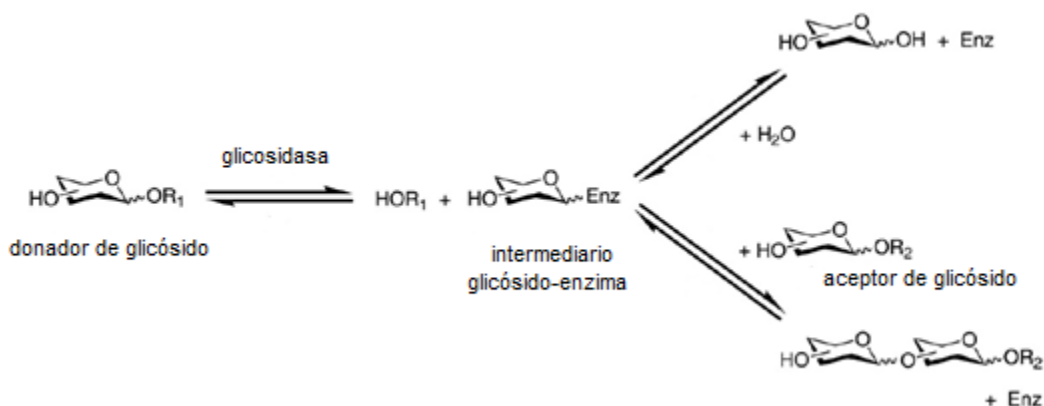


Figura 5. Esquema de síntesis de glucósidos catalizada por glicosidasa (Carel y col.,2008)

La mayoría de las glicosidasas utilizadas con fines sintéticos son exo-glicosidasas que catalizan la transferencia de glicosilo a la unidad terminal no reductora de monosacáridos de los sustratos aceptores (Carel y col., 2008). Estas enzimas están ampliamente distribuidas en organismos vivos, siendo encontradas en bacterias, hongos, plantas y mamíferos.

Las α -L-fucosidasas son glicosil hidrolasas que escinden enlaces fucosídicos en oligosacáridos y glicoconjugados como se muestra en la figura 6. En este esquema se representa el funcionamiento de la enzima, empieza con la formación

de un intermediario glicosilo-enzima que sufre un ataque nucleofílico, si el ataque es debido al agua, el resultado es la hidrólisis y en el caso de que sea otro aceptor da como resultado una trans-glicosilación. El producto de la trans-glicosilación también funciona como sustrato para la enzima por lo tanto también puede sufrir una hidrólisis posterior (Zeuner y col., 2014).

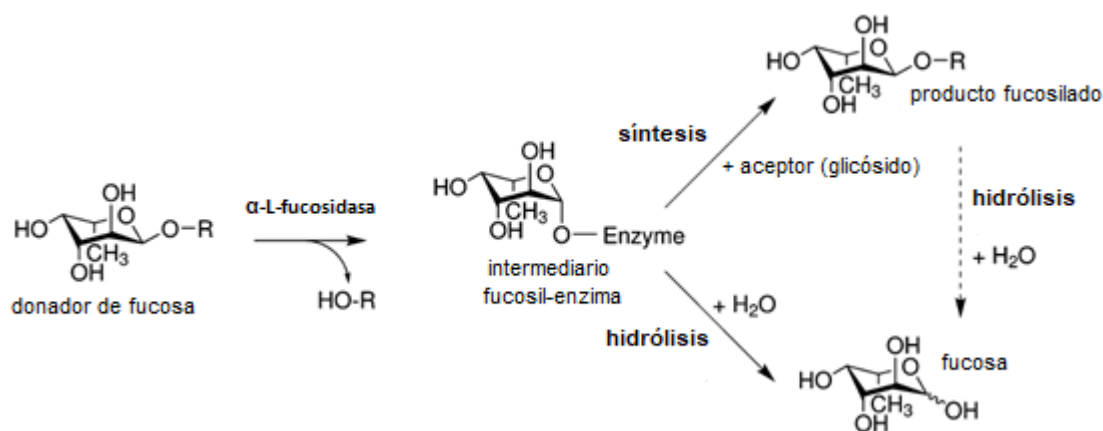


Figura 6. Esquema de reacción catalizada por α-L-fucosidasa (Zeuner y col.,2014)

Entonces el rendimiento de la trans-glicosilación es el resultado del equilibrio entre las velocidades de síntesis, la hidrólisis del donante y la hidrólisis del producto. La actividad de transglicosilación de las α-L-fucosidasas es altamente variable según el origen de las enzimas, pero sugiere que estas enzimas pueden ser atractivas para sintetizar oligosacáridos fucosilados. (Osanzo y col., 2007).

Un ejemplo de síntesis enzimática es el publicado por Guzmán-Rodríguez y col. (2018), donde proponen la síntesis de un trisacárido fucosilado empleando una reacción enzimática de transfucosilación catalizada por α-L-fucosidasa recombinante de *Thermotoga maritima*, utilizando 4-nitrofenil-α-L-fucopiranosido

como sustrato donador y lactosa como sustrato aceptor, con un rendimiento de 32.5% en 3 h de reacción a 60 °C.

Por otra parte, Osanjo y col. (2007) utilizaron la α -L-fucosidasa de *T. maritima* clonada en *Escherichia coli* para transferir fucosa a partir de 4-nitrofenil- α -L-fucopiranosido hacia diferentes aceptores. Un aceptor utilizado fue 4-nitrofenil- α -D-galactopiranosido donde la fucosa se transfirió a la galactosa con la formación de enlaces α -1,2 y α -1,6 con rendimientos del 14% y del 7% respectivamente.

3.5.3 Síntesis quimioenzimática

La síntesis quimioenzimática es una nueva manera de obtener oligosacáridos, utilizando las dos técnicas ya existentes y aprovechando las ventajas de cada método. Este método combina la flexibilidad de la síntesis química, la alta regioselectividad y estereoselectividad de las reacciones catalizadas por enzimas para lograr una síntesis altamente eficiente de carbohidratos complejos.

Un ejemplo de síntesis quimioenzimática es la propuesta por Rencurosi y col. (2003) en donde sintetizan diferentes fucosil-lactosas protegidas, inician con bencil-lactosida (compuesto comercial) en donde mezclan la protección enzimática regioselectiva de las lipasas para dar un compuesto **5** que será el bloque principal de la construcción posterior (figura 7).

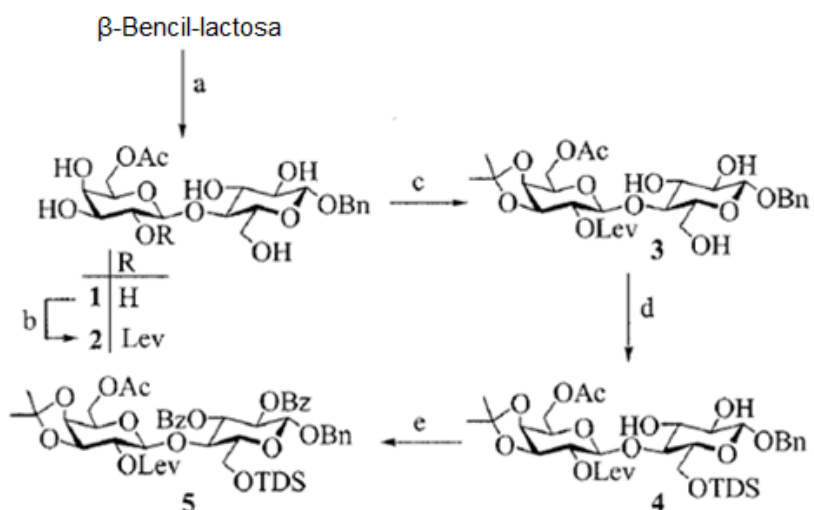


Figura 7. Esquema de síntesis (Rencurosi y col., 2003)

a) Acetato de vinilo, Tetrahidrofurano, lipasa *Candida antartica* (73%); b) trifluoetil levulinate, Acetonitrilo, lipasa *Candida antartica* (72%); c) acetona, ácido canforsulfónico, sikkon (66%); d) Cloro dimetil (1,1,2-trimetilpropil) silano, imidazol, Dimetilformamida (75%); e) Cloruro de benzoílo (BzCl), Piridina, 4-dimetilamiopiridina (94%)

Para obtener el compuesto **8** (figura 8), se elimina quimiosselectivamente el grupo 2b-O-levulinoilo (Lev) generando el compuesto **6** y después sigue una reacción de glicosilación utilizando como donante al compuesto **7** (3,4 di-O-acetil-2-O-bencil-L-fucopiranososa), el trisacárido obtenido tuvo un rendimiento del 61%. En el caso del compuesto **10**, se elimina el grupo sililo compuesto **9** y después una glicosilación con el mismo donante utilizado anteriormente, este compuesto **10** tiene un rendimiento del 76%.

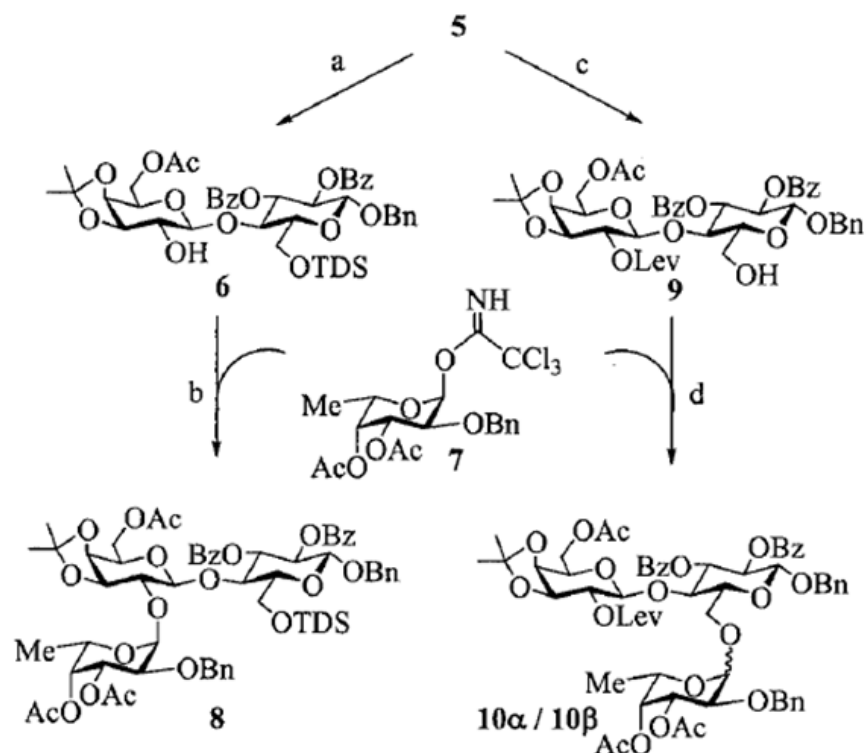


Figura 8. Esquema de síntesis (Rencurosi y col., 2003)

a) acetil hidrazina, etanol/ éter dietílico (99%); b) 7, Trimetilsilil trifluorometanosulfonato (0.01 eq), -10 °C (61%); c) Fluoruro de tetrabutilamonio, Tetrahidrofurano, ácido acético, 0 °C (61%); d) 7, Trimetilsilil trifluorometanosulfonato (0.01 eq), -36 °C (76%)

3.6 Beneficios del uso de oligosacáridos

Como ya ha sido mencionado, los OLH presentan diversas actividades biológicas que resultan interesantes, debido a que estos no son digeridos por las enzimas intestinales presentes, por lo que se dirigen al intestino delgado y al colon. Estos compuestos contribuyen al crecimiento de bifidobacterias, brinda protección en la adhesión de patógenos y la modulación del sistema inmune.

3.6.1 Efecto prebiótico

Los OLH son fuentes de carbono y energía utilizadas preferentemente por bacterias “buenas” como lo son las bifidobacterias probióticas, promoviendo así su crecimiento, estas a su vez producen ácido láctico y otros ácidos orgánicos de cadena corta que ocasionan la disminución del pH en el intestino, lo que evita el crecimiento de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* (Yu y col., 2013). Un ejemplo es el estudio in vitro realizado por Ward y col. (2007) donde demostró que los OLH son la única fuente de carbono utilizada por *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium infantis*. Además, el crecimiento predominante y la colonización de las bifidobacterias les permite competir por los nutrientes limitados disponibles en el intestino, disminuyendo así la oportunidad de proliferación de las bacterias patógenas. Algunas sustancias antimicrobianas liberadas por las bifidobacterias también pueden generar un ambiente desfavorable para los patógenos (Xi, 2015).

3.6.2 Efecto antiadhesivo

Los OLH imitan las estructuras de glucanos presentes en la superficie del epitelio intestinal, y sirven como receptores “señuelo” de las bacterias patógenas disminuyendo su unión a la superficie del intestino del infante evitando la colonización, reduciendo así el riesgo a infecciones virales, bacterianas y protozoarias (figura 10; Xi, 2015). Un ejemplo es el estudio in vitro realizado por Coppa y col. (2006) donde demostraron que los oligosacáridos inhiben la adhesión a las células epiteliales de *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella fytis*.

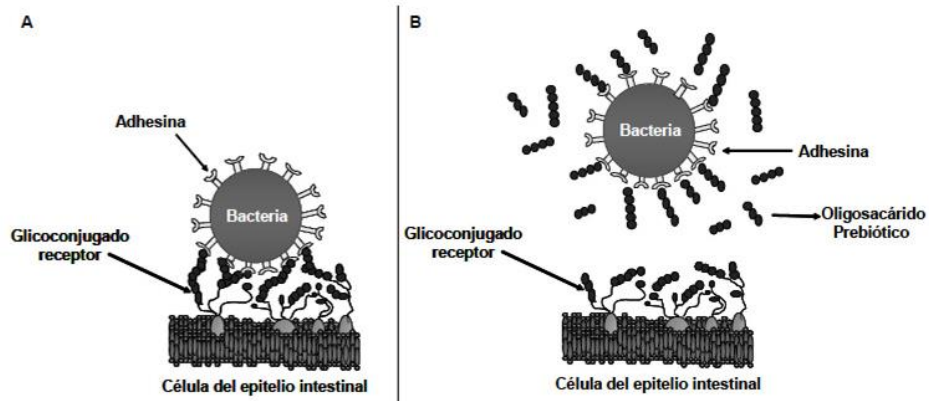


Figura 9. Modelo de acción directa de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones (Domínguez y col.,2009)

A) Las adhesinas bacterianas reconocen a los receptores oligosacáridos en las células del epitelio intestinal. B) Inhibición de la adhesión bacteriana por prebióticos con estructuras similares a los glicanos receptores.

3.6.3 Modulación del sistema inmune

Los OLH pueden modular las respuestas de células epiteliales, algunos OLH pueden influir directamente en las funciones del epitelio intestinal y reducen el exceso de infiltración y activación de leucocitos de la mucosa, lo que puede disminuir el riesgo de enterocolitis necrotizante, uno de los trastornos intestinales más comunes y fatales en los lactantes prematuros (Bienenstock y col., 2013).

4. OBJETIVOS

- ◇ Realizar la síntesis quimioenzimática utilizando distintos donadores de fucosa para la obtención de oligosacáridos fucosilados.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◇ Preparar distintos donadores de fucosa.
- ◇ Determinar la actividad hidrolítica de la α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* sobre las moléculas propuestas.
- ◇ Estudiar los donadores activos para la enzima en reacciones de transfucosilación con distintos azúcares aceptores.
- ◇ Conocer el efecto de la concentración del donador en la síntesis de oligosacáridos fucosilados para un mejor rendimiento

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Sustancias:

*Solución enzimática de α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* (Megazyme) esta se encuentra suspendida en una solución de sulfato de amonio con 0.02 % (m/v) de azida de sodio, con una actividad de 2.6 U/mg (U = cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato en un minuto).

*Fucosa: Sigma, G.C,99% pureza, sin purificación posterior.

*Glucosa: Sigma, G.C,99.5% pureza, sin purificación posterior.

*Lactosa: Sigma, G.C, 99% pureza, sin purificación posterior.

*Diclorometano: J. T. Baker, Q.P, 99.5% pureza, sin purificación posterior.

*Etanol: Meyer, R.A ,99.8% pureza, sin purificación posterior.

*Metanol: Meyer,R.A , 99.5% pureza, sin purificación posterior.

*Butanol: Silver Quim, R.A, 99.5% pureza, sin purificación posterior.

*Alcohol isoamílico: J. T. Baker, Q.P, 99.9% pureza, sin purificación posterior.

*Alcohol isopropílico: I.B.I Scientific, Q.P, 99% pureza, sin purificación posterior.

*Alcohol bencílico: Silver Quim, R.A, 99.8% pureza, sin purificación posterior.

5.1 Obtención de los donadores de fucosa

Etilfucosa, isoamilfucosa y bencilfucosa: se mezcla fucosa (250 mg, 1.52 mmol) con etanol (15 mL), alcohol isoamílico (10 mL), alcohol bencílico (15 mL)

respectivamente y ácido *p*-toluensulfónico (25 mg) como catalizador de reacción en un matraz bola de 25 mL, se deja en reflujo (3-6 h) donde se monitoreó la reacción por cromatografía en capa fina hasta que finalice la reacción utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano/metanol (3:1).

Isopropilfucosa y butilfucosa: se mezcla fucosa (100 mg, 0.61 mmol) con isopropanol (0.46 mL), butanol (0.56 mL) respectivamente y ácido *p*-toluensulfónico (10 mg) como catalizador de reacción en un matraz bola de 25 mL, se deja en reflujo (3-6 h) donde se monitoreó la reacción por cromatografía en capa fina hasta que finalice la reacción utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano/metanol (3:1).

5.1.1 Purificación

Se elimina el alcohol en exceso por destilación a presión reducida, después se purifica en columna de gel de sílice 60 utilizando diferentes proporciones de disolventes diclorometano(99-95%)/metanol, una vez separado se evapora el exceso de disolvente en un rotavapor.

5.2 Análisis de los carbohidratos y donadores de fucosa

Los carbohidratos fueron analizados por el método de HPLC propuesto por Guzmán-Rodríguez y col., (2018) con las siguientes condiciones se empleó una columna Rhexz RNO-Oligosaccharide Na⁺ 60 x 10 mm, tamaño de partícula 12 µm y una columna HC75-H⁺ 300 x 7.80 mm, tamaño de partícula 8 µm, a una temperatura de 75 °C y se utilizó como fase móvil agua destilada, desionizada y filtrada, a un flujo de 0.3 mL/min. Empleando un detector de dispersión de luz

modelo 300S a un flujo de nitrógeno de 62.5 psi, una temperatura en el nebulizador de 10 °C y una temperatura de evaporación de 45 °C.

Para el análisis de los donadores de fucosa, se prepararon soluciones de 0.25 mg/mL de concentración utilizando agua desionizada como disolvente y se inyectó en el equipo de HPLC con las mismas condiciones descritas anteriormente.

Como método complementario de análisis, los donadores (isoamilfucosa y bencilfucosa) se enviaron a espectrometría de masas. Utilizando un sistema de desorción/ionización láser asistida por matriz – tiempo de vuelo acoplado (MALDI-TOF/TOF) Autoflex-Speed (Brucker, MA, E.U.) con un láser Smart beam II de 1,000 Hz. Se usó una matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (5 mg/100 mL de una solución acuosa de acetonitrilo al 50%), y NaCl 0.01 M fue adicionado como catión dopante para incrementar la sensibilidad de la señal. El espectro de masas en tándem (MS/MS) fue obtenido a una energía de colisión de 1 k eV con gas argón.

5.3 Estudio del reconocimiento del sustrato

5.3.1 Preparación de la enzima α -L-fucosidasa

Se preparó una solución enzimática (0.026 U/mg) con buffer de acetatos de 0.01 M (pH 5) a partir de la solución comercial de enzima (Megazyme).

5.3.2 Reacción de hidrólisis con α -L-fucosidasa

Se realizó una mezcla con cada donador y 0.67 unidades enzimáticas de α -L-fucosidasa (tabla 2), la reacción se llevó a cabo a 60 °C por 15 h y se analizó posteriormente cada hora por HPLC.

Tabla 2. Cantidades de la reacción de hidrólisis

Sustrato	1.0 mg
Buffer pH= 5	800 μ L
Enzima (0.026 U/mg)	200 μ L

5.4 Estudio de la transferencia de fucosa. Reacción de transfucosilación

5.4.1 Reacción de Transfucosilación

Se mezcla cada donador (etilfucosa, isopropilfucosa, butilfucosa, isoamilfucosa y bencilfucosa) con un azúcar aceptor (lactosa) y buffer de fosfatos (0.01 M) a pH = 5 con la enzima α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* (tabla 3) para posteriormente incubar a 60 °C por 15 h y posteriormente se analizó por HPLC.

Tabla 3. Cantidades de la reacción de transfucosilación

Donador	1.0 mg
Buffer pH= 5	800 μ L
Enzima (0.026 U/mg)	200 μ L
Lactosa	50.0 mg

5.4.2 Reacción de Transfucosilación con diferentes aceptores

Se mezcla a cada donador (isoamilfucosa y bencilfucosa) con diferentes aceptores (glucosa y lactulosa) y buffer de fosfatos (0.01 M) a pH = 5 con la enzima α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* (tabla 4) para incubar a 60 °C por 15 h y se analizó por HPLC.

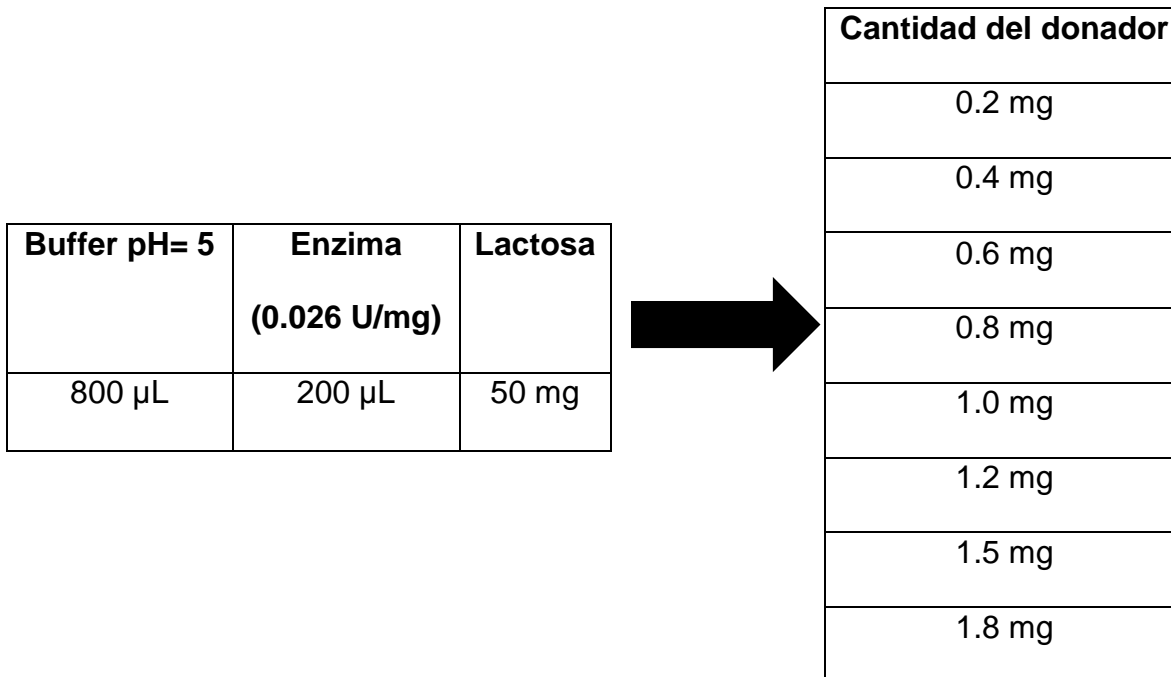
Tabla 4. Cantidades de la reacción de transfucosilación

Donador de fucosa	1 mg	1 mg
Buffer de fosfatos pH= 5	800 µL	800 µL
Azúcar aceptor	Glucosa 50 mg	Lactulosa 50mg

5.4.3 Efecto de la concentración de bencilfucosa en la transfucosilación

Se mezcla diferentes concentraciones del donador (bencilfucosa) con el aceptor de lactosa y buffer de fosfatos (0.01 M) a pH = 5 con la enzima α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* (figura 11) para incubar a 60 °C por 6 h y se analizó por HPLC.

Figura 10. Cantidades de la reacción de transfucosilación variando al donador



5.5 Actividad residual de la enzima α -L-fucosidasa

5.5.1 Actividad enzimática

La actividad de la enzima fue determinada empleando pNP-Fuc 3.5 mM y 0.67 U/mL de α -L-fucosidasa de *T. maritima* en un buffer de acetatos de 0.01 M, pH = 5 a 60 °C. El *p*-nitrofenol (pNP) liberado fue monitoreado mediante espectrofotometría visible a 410 nm (Shimadzu UV-160A, Japón) tomando mediciones cada minuto durante 40 minutos.

5.5.2 Actividad de la enzima después de tratamiento térmico

La actividad de la α -L-fucosidasa después de un tratamiento térmico fue determinada empleando pNP-Fuc y la liberación del *p*-nitrofenol fue seguida en el espectrofotómetro con las mismas condiciones descritas anteriormente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de los donadores de fucosa

Se realizó la síntesis de diferentes donadores de fucosa. A partir de una reacción de glicosilación de fucosa, con condiciones tipo Fischer: fucosa, alcohol y un medio ácido (Vermeer y col., 2001), en la figura 11 se muestra un esquema de los diferentes donadores que se sintetizaron.

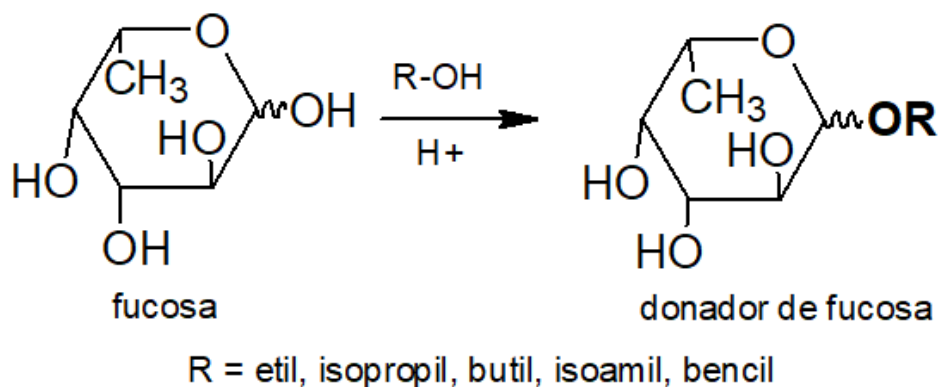


Figura 11. Esquema de la síntesis de los diferentes donadores

La reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina (CCF) a lo largo de la síntesis en donde se observó la desaparición del sustrato de fucosa y la formación de cada nuevo producto (figura 12). Después se realizó la purificación de cada uno de los donadores, eliminando el exceso de alcohol presente y recristalizando cada producto con una mezcla de diclorometano/metanol, estos coincidieron con tener una apariencia similar de polvo blanco, como lo reportó Vermeer y col. (2001).

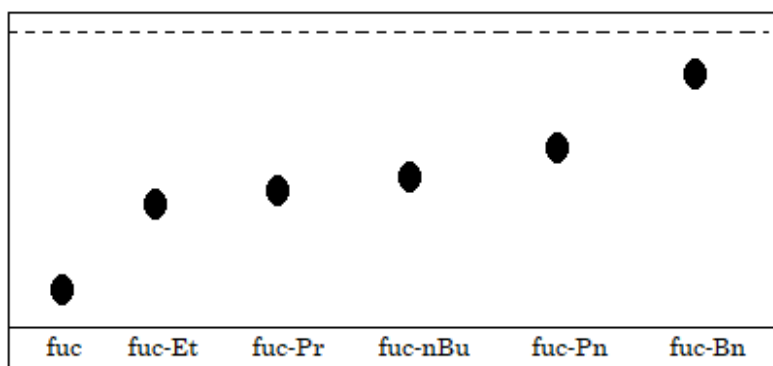


Figura 12. CCF, diclorometano/metanol 3:1, fuc: fucosa, fuc-Et: etilfucosa, fuc-Pr: isopropilfucosa, fuc-nBu: butilfucosa, fuc-Pn: isoamilfucosa y fuc-Bn: bencilfucosa

En la tabla 5 se observan los diferentes Rf, puntos de fusión (pf) obtenidos de manera experimental, el peso molecular (teórico), el rendimiento experimental y tiempo de reacción necesario para la obtención de cada donador sintetizado, estos resultados fueron comparados con el sustrato de fucosa. El donador de isoamilfucosa es el que se obtuvo en mayor cantidad en comparación con los demás debió a las características de los disolventes utilizados. En el caso de los donadores de bencilfucosa e isoamilfucosa se enviaron a un análisis de masas (anexo 1) y se comparó con el esperado, cumpliendo con estos valores. Estos datos sirvieron como parámetro de identificación de los productos sintetizados.

Tabla 5. Rf, puntos de fusión, peso molecular y rendimiento.

Donador de fucosa	Rf	pf	Peso molecular	Rendimiento	Tiempo de reacción
fucosa	0.16	136-139 °C	164.16	-	-
etilfucosa	0.60	116-119 °C	192.21	45%	3.5 h
isopropilfucosa	0.66	140-142 °C	206.24	Nd	3.5 h
butilfucosa	0.70	118-120 °C	220.26	Nd	3.5 h

isoamilfucosa	0.78	178-182 °C	234.29	80%	4 h
bencilfucosa	0.90	164-166 °C	254.28	58%	4 h

Nd: No determinado, estos compuestos fueron sintetizados anteriormente y no se tiene información.

6.2 Identificación de los donadores de fucosa por HPLC

Una vez obtenidos los donadores y purificados se prepararon soluciones de 0.25 mg/mL de cada donador para inyectarse en el HPLC. En la tabla 6 se observa el tiempo de retención de cada uno de los donadores y el del sustrato de fucosa, estos van a servir como patrones de referencia para el análisis de las reacciones de transfucosilación. En la figura 13 se observa las diferentes estructuras de los donadores de fucosa sintetizados, para conocer la estructura exacta y el tipo de enlace que se forma es necesario un análisis más especializado.

Tabla 6. Tiempo de retención de los donadores sintetizados y fucosa.

Sustrato	Tiempo de retención (min)
fucosa	11.2
etilfucosa	13.0
isopropilfucosa	12.9
butilfucosa	18.1
isoamilfucosa	20.7
bencilfucosa	32.1

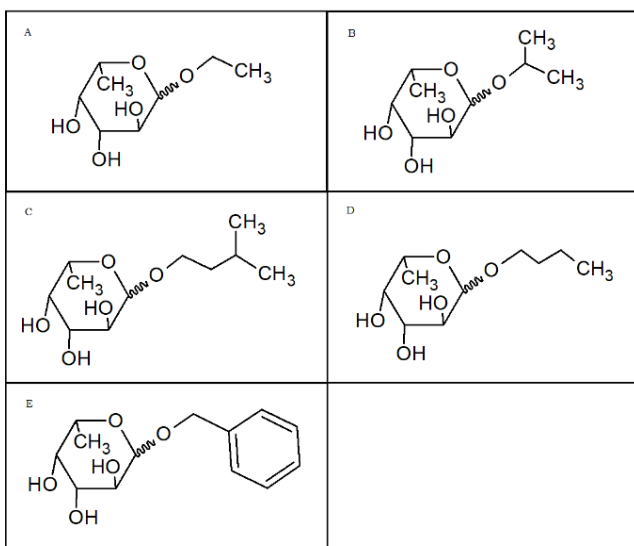


Figura 13. Estructuras de los donadores sintetizados: A) etilfucosa, B) isopropilfucosa, C) isoamilfucosa, D) butilfucosa, E) bencilfucosa.

6.3 Estudio del reconocimiento del sustrato

Una vez listos los donadores se realizó una mezcla con cada donador y la enzima α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* en un buffer de fosfatos y una incubación a 60 °C por 15 h. Esto se realizó con la finalidad de saber si la enzima es capaz de reconocer al donador, ejerciendo su actividad hidrolítica sobre éstos. Las reacciones se analizaron mediante HPLC en intervalos de tiempo de 1 h, cuantificándose la cantidad de fucosa liberada (Anexo 2).

Tabla 7. Resultados de la hidrólisis de cada donador.

Donador	Fucosa libre (%)	Tiempo (h)
etilfucosa	48 %	8 h
isopropilfucosa	25 %	15 h
butilfucosa	100 %	8 h
isoamilfucosa	60 %	1 h
bencilfucosa	55 %	8 h

La fucosa libre se cuantificó a partir del cromatograma de HPLC.

En la tabla 7 se observa el porcentaje de fucosa liberada para cada donador y el tiempo que tarda en hidrolizar esta cantidad, esto confirma que la enzima reconoce a los donadores. Pero no de la misma manera es decir algunos necesitan mayor tiempo de reacción, como en el caso de la isopropilfucosa que necesita más tiempo para hidrolizar al donador y libera muy poca fucosa, por lo que la enzima tiene una baja afinidad por este donador. Esto podría deberse a que proviene de un alcohol secundario, que es menos reactivo en comparación con los demás, que provienen de un alcohol primario (figura 13).

6.4 Estudio de la transferencia de fucosa. Reacción de transfucosilación

Teniendo el conocimiento de que la enzima α -L-fucosidasa reconoce a los donadores, se realizó la reacción de transfucosilación utilizando a la lactosa como aceptor (figura 14). Esto se realizó colocando a cada donador, excepto la isopropilfucosa con la enzima y a la lactosa en un buffer (0.01 M) a pH= 5 a 60 °C por 15 h, las reacciones se analizaron mediante HPLC en intervalos de 2 h, cuantificándose la cantidad de fucosa libera y el porcentaje de transferencia.

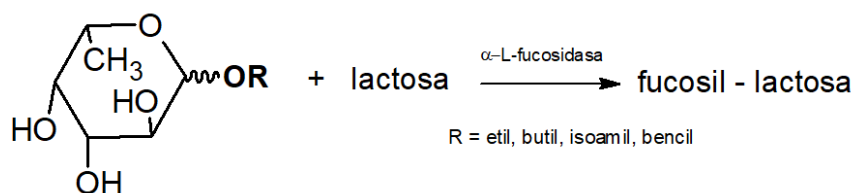


Figura 14. Esquema de la reacción de transfucosilación con el aceptor de lactosa

En la tabla 8 se encuentran los resultados de la reacción de transfucosilación, la transferencia de fucosa no fue posible con los donadores de etilfucosa y butilfucosa, solo se observó la presencia de fucosa libre y no la formación de un producto fucosilado. Estos dos donadores son los que poseen una cadena de menor tamaño

y además tienen un menor peso molecular, en comparación con los otros dos donadores (isoamilfucosa y bencilfucosa) que mostraron transferencia.

Tabla 8. Resultados de la reacción de transfucosilación.

Donador	Transferencia (%)	Fucosa libre (%)	Tiempo
etilfucosa	-	48%	8 h
butilfucosa	-	100%	8 h
isoamilfucosa	26%	73%	15 h
bencilfucosa	48%	52%	4 h

Con el objetivo de conocer la versatilidad de la enzima y la de los donadores, que sí lograron transferir la fucosa, se decidió experimentar con otros azúcares aceptores, como el monosacárido de glucosa y el disacárido de lactulosa.

6.5 Reacción de transfucosilación: isoamilfucosa y bencilfucosa

6.5.1 Isoamilfucosa

Conociendo que la enzima α -L-fucosidasa transfiere la fucosa a partir del donador de isoamilfucosa se realizó la reacción de transfucosilación con diferentes aceptores (lactulosa y glucosa) y se analizó en el HPLC. En la tabla 9 se observan los resultados de la transfucosilación con isoamilfucosa en donde existe transferencia de fucosa a los aceptores de glucosa y de lactosa, en el caso de la lactulosa no es posible la transferencia

Tabla 9. Resultados de la reacción de transfucosilación con isoamilfucosa a diferentes aceptores.

Aceptor	Transferencia (%)	Fucosa libre (%)	Tiempo
Glucosa	67%	33%	15 h
Lactulosa	-	100%	15 h
Lactosa	26%	73%	15 h

La transferencia se calculó por la relación molar que existe entre el donador y el aceptor (producto fucosilado = donador al inicio – fucosa libre – donador sin reaccionar).

Analizando la reacción con el aceptor de lactulosa, solo se observó la hidrólisis del donador, dejando la fucosa libre en el medio a lo largo de las 15 h de reacción (figura 15). Esto podría indicar que la α -L-fucosidasa de *T. maritima* no logra reconocer a la lactulosa, este es un disacárido de galactosa y fructosa (figura 16), pero en algunos otros estudios se encontró que empleando la enzima α -L-fucosidasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG sí se transfiere la fucosa a la lactulosa con 25% de rendimiento utilizando pNP-F como donador a un tiempo de 24 h (Escamilla, 2016), esto se debe a que la actividad enzimática depende del origen de esta.

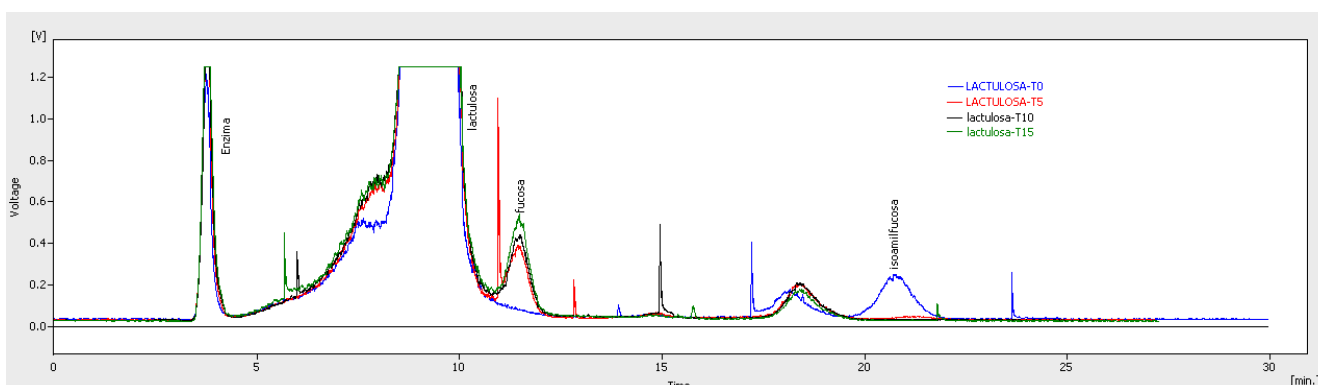


Figura 15. Cromatograma de la reacción de transfucosilación: isoamilfucosa con lactulosa.

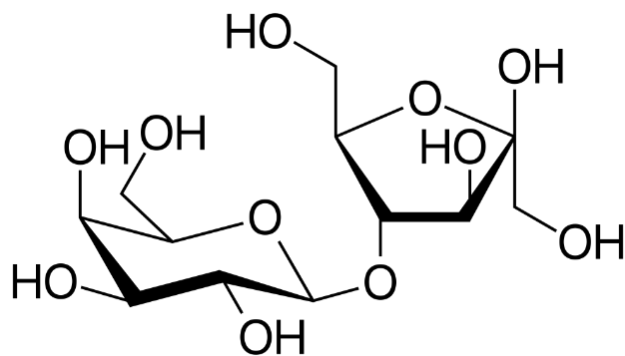


Figura 16. Estructura de la lactulosa.

La reacción de transfucosilación con el aceptor de glucosa tuvo transferencia del 67% al término de la reacción, en la figura 17 se representa la formación del producto fucosilado, la desaparición total del donador de isoamilfucosa y a la fucosa libre. Se logró transferir la fucosa al aceptor de glucosa formando fucosil-glucosa después de las 15 h de reacción, este producto se observó en los cromatogramas generados por el HPLC (anexo 3).

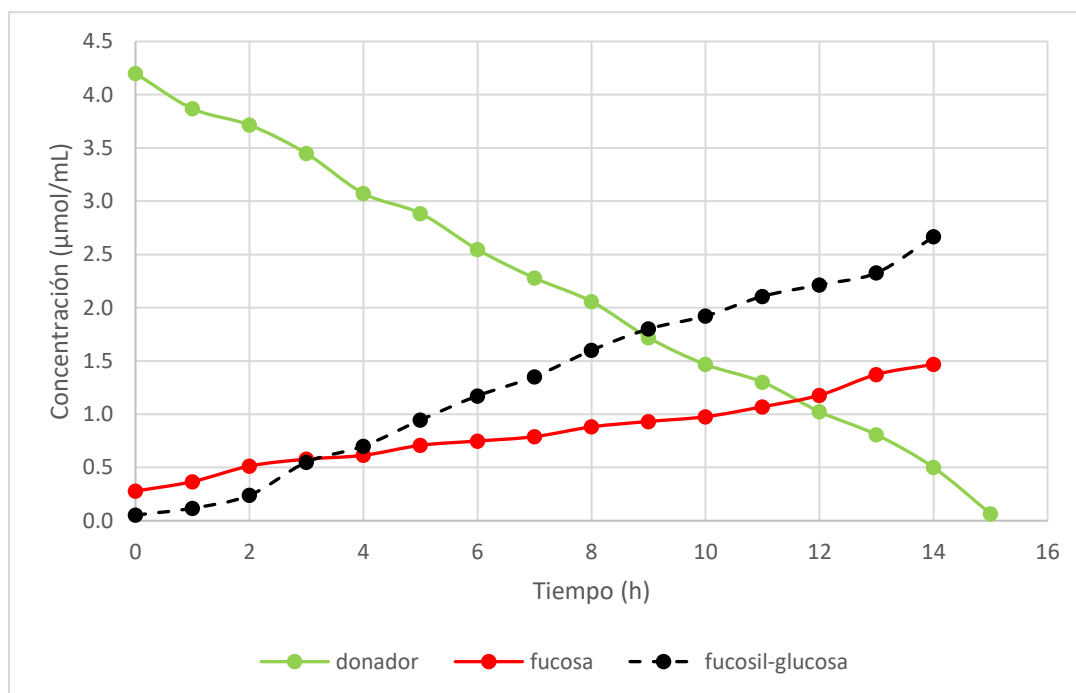


Figura 17. Reacción de transfucosilación: isoamilfucosa y glucosa.

En la figura 18 se representa la formación de fucosil-lactosa, la desaparición total del donador de isoamilfucosa y la fucosa libre. Para la reacción de transfucosilación con lactosa se obtuvo de transferencia del 26%, que en comparación con el aceptor de glucosa es menor. Con estos dos donadores se necesitó 15 h de reacción para que la enzima transfiera la fucosa a cada aceptor.

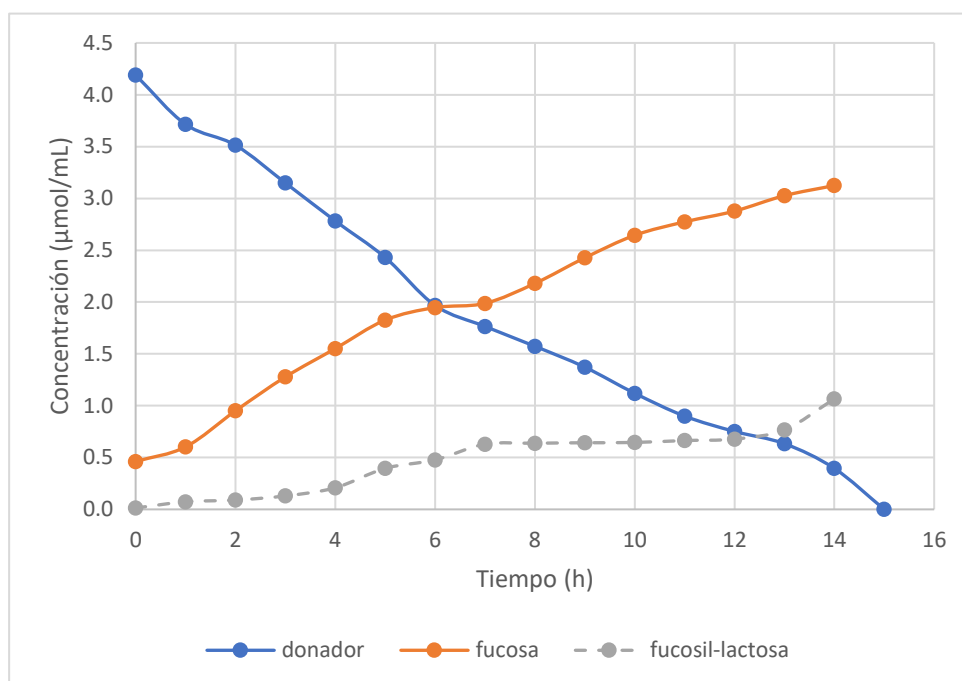


Figura 18. Reacción de transfucosilación: isoamilfucosa y lactosa.

6.5.2 Bencilfucosa

De igual manera se realizó la reacción de transfucosilación con el donador de bencilfucosa con los mismos aceptores utilizados anteriormente para comparar a los dos donadores empleados y si tiene algún efecto en la transferencia de fucosa. En la tabla 10 se observa que, como en el caso anterior del donador isoamilfucosa solo se logra la transferencia de fucosa al aceptor de glucosa y lactosa, no existe la

transferencia al aceptor de lactulosa. Por lo que se determinó que la enzima α -L-fucosidasa de *T. maritima* no reconoce a la lactulosa como aceptor.

Tabla 10. Resultados de la reacción de transfucosilación con bencilfucosa a diferentes aceptores.

Aceptor	Transferencia (%)	Fucosa libre (%)	Tiempo
Glucosa	22%	72%	15 h
Lactulosa	-	100%	6 h
Lactosa	48%	52%	4 h

La transferencia se calculó por la relación molar que existe entre el donador y el aceptor (producto fucosilado = donador al inicio – fucosa libre – donador sin reaccionar).

En el caso del aceptor de glucosa se obtuvo de transferencia del 22% y con el aceptor de lactosa se obtuvo una transferencia del 48%, en la figura 19 se representa la formación de fucosil-glucosa, la desaparición del donador de bencilfucosa y la fucosa libre al término de 15 h de reacción. En comparación con el otro donador (isoamilfucosa) este tiene un menor rendimiento con el aceptor de glucosa.

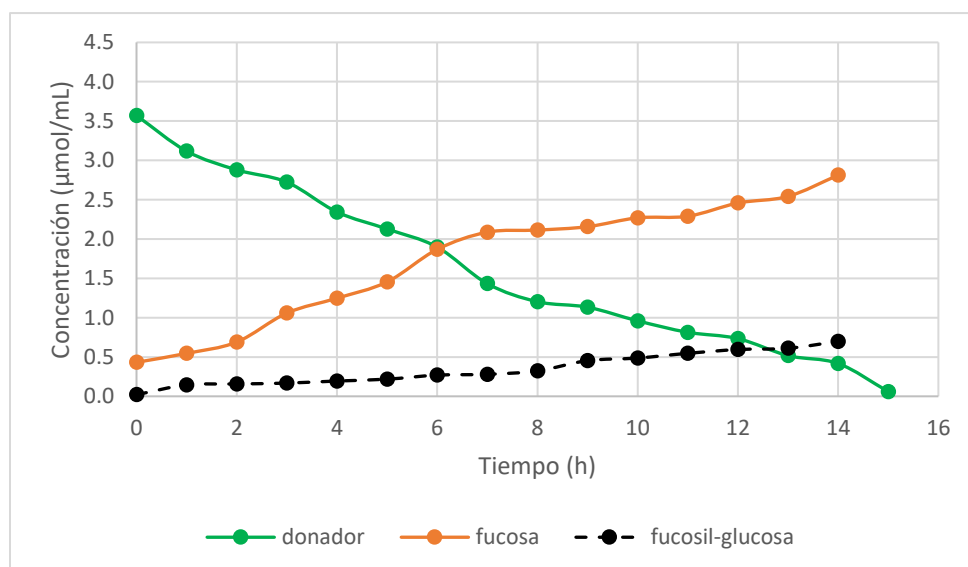


Figura 19. Reacción de transfucosilación: bencilfucosa y glucosa.

Para la reacción de transfucosilación con la lactosa se tiene un porcentaje de transferencia de 48%, en esta reacción solo se necesitó 4 h para que desapareciera el donador por completo, este al tener el mejor porcentaje de transferencia en un menor tiempo se decidió estudiar con mayor detenimiento, para lograr optimizar esta reacción.

Un reporte de síntesis de fucosil-lactosa es el de Guzmán-Rodríguez y col. (2018) donde utilizaron como donador *p*-nitrofenil fucosa, el aceptor de lactosa y la enzima α -L-fucosidasa de *T. maritima* con condiciones similares a las que se trabajaron, en donde se logró identificar el producto de síntesis como fucosil-lactosa con un rendimiento 32.5%, que es menor al reportado en este ensayo, además de que se obtuvo en un menor tiempo. El inconveniente del uso de este tipo de donador (*p*-nitrofenil fucosa) es que al hidrolizarse se libera nitrofenol al medio, que es considerado tóxico para la salud, además de no ser tan soluble.

6.5.3 Efecto de la concentración de bencilfucosa en la transfucosilación

Conociendo que es posible la transferencia de fucosa al aceptor de lactosa en un menor tiempo de reacción con el donador de bencilfucosa, se propuso la optimización de este proceso, analizando el efecto de la concentración del donador de bencilfucosa en la reacción de transfucosilación. Por lo que se realizaron diferentes ensayos de reacción de transfucosilación, con diferentes concentraciones de donador, con la misma cantidad de aceptor y con las mismas condiciones de reacción, donde se monitoreó cada 2 h a lo largo del procedimiento

Tabla 11. Resultados de la transferencia a diferentes concentraciones del donador.

Concentración de donador (mg/mL)	mM	Relación molar donador/aceptor	Transferencia (%)
0.2	0.79	0.005	-
0.4	1.57	0.010	-
0.6	2.36	0.016	-
0.8	3.15	0.022	40.51
1.0	3.93	0.027	48.12
1.2	4.72	0.032	36.03
1.5	5.90	0.040	43.32
1.8	7.08	0.049	1.98

En la tabla 11 se observan los resultados de la variación de la concentración del donador, aquí se nota que a menor concentración de 3.15 mM no existe la transferencia de fucosa, solo se hidroliza al donador y al aumentar esta concentración hasta 5.90 mM se transfiere la fucosa obteniendo de transferencia similar al término de las 6 h de reacción, pero al aumentar la concentración del donador disminuye la cantidad de producto y solo se observa a la fucosa libre.

Analizando con mayor detalle las concentraciones que tuvieron un alto rendimiento (3.15 mM a 5.90 mM), cada 2 h de reacción se observa en la figura 20 que al inicio de la reacción hay una mayor cantidad de producto, que se va perdiendo con el tiempo debido a la actividad enzimática, es decir la enzima hidroliza al producto.

Se observa que con 5.90 mM de concentración a las 2 h de reacción se obtiene la mayor cantidad del producto fucosilado con un 57.9% de transferencia, en comparación con las otras concentraciones, por lo cual se analizó esta concentración cada 15 min. de reacción.

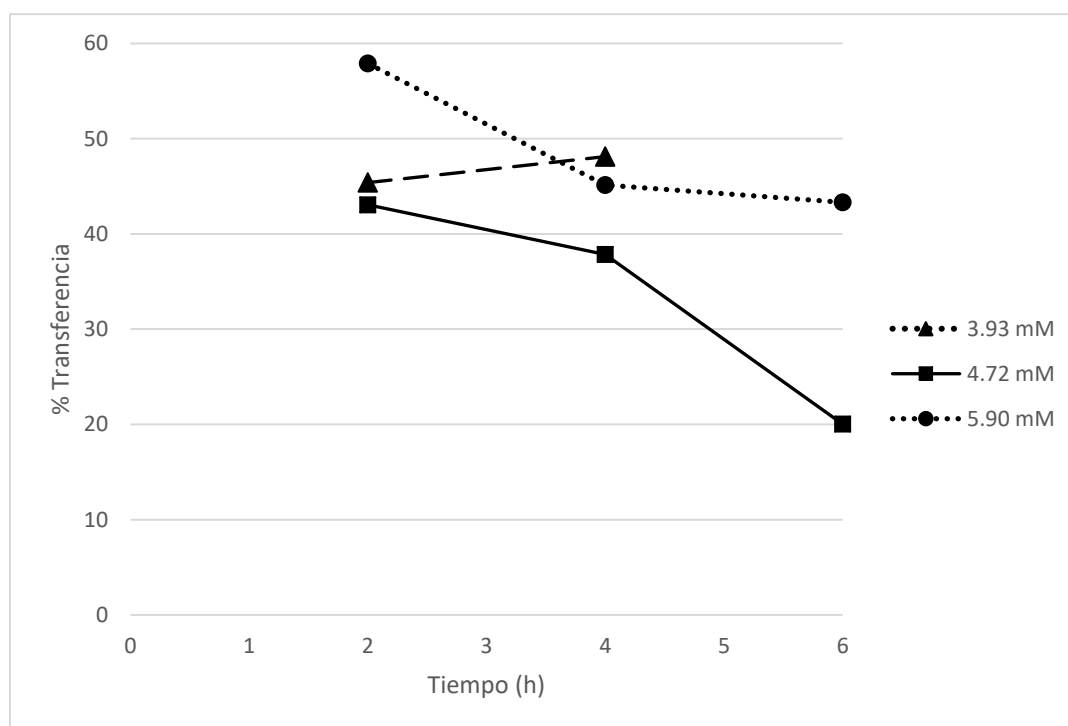


Figura 20. Esquema de porcentaje de transferencia a diferentes concentraciones.

En la figura 21 se observa la aparición del producto fucosil-lactosa, en donde sucede una rápida transferencia, a las 2 h es donde se obtiene la mayor cantidad de producto y a partir de ese momento empieza a disminuir esta cantidad. Esto demuestra que la enzima hidroliza al producto fucosilado.

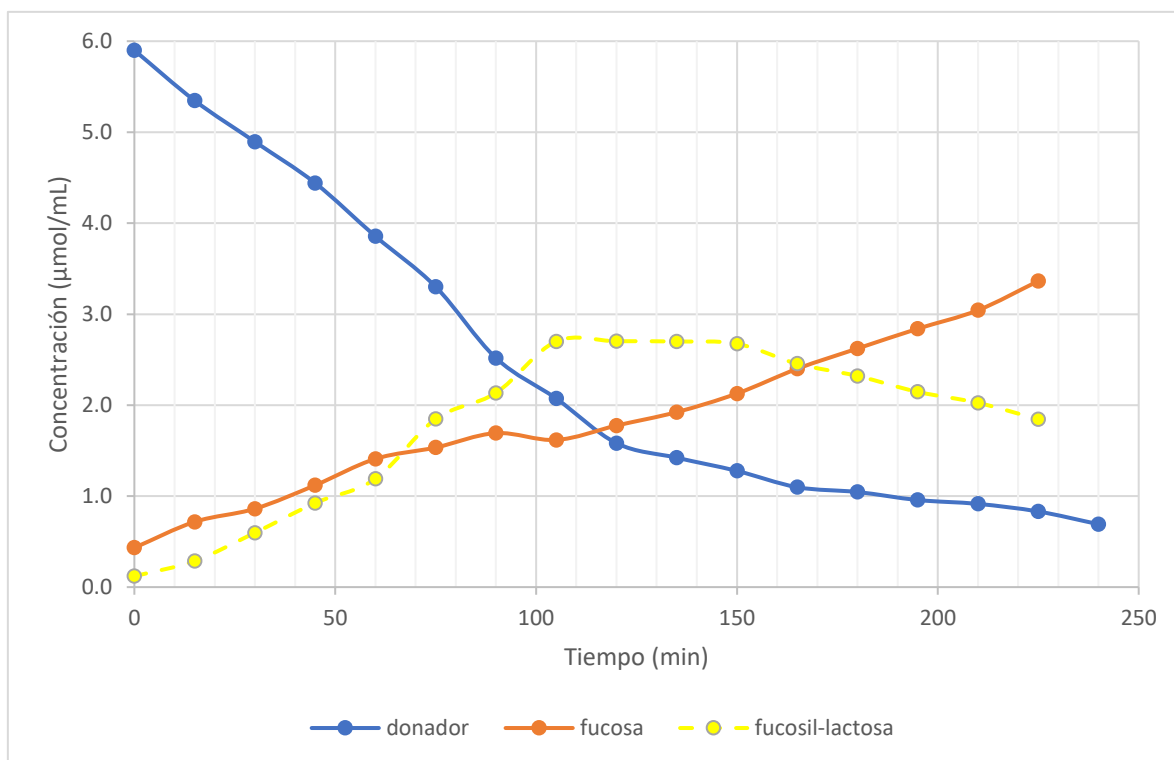


Figura 21. Reacción de transfucosilación con 5.90mM de bencilfucosa.

6.6 Actividad residual de la enzima α -L-fucosidasa

Por último, se buscó conocer la posible influencia que tendría el alcohol liberado por la acción de la enzima y del tratamiento térmico usado. De esta forma se realizó un análisis de actividad enzimática después de haber realizado una incubación a 60 °C por 6 h, ya que se observa un descenso de la actividad a lo largo de la síntesis de transfucosilación. Esto se logró comparando la velocidad inicial de la enzima sin ningún tratamiento previo (control) y la velocidad inicial de la enzima después de utilizarla en las condiciones de trabajo.

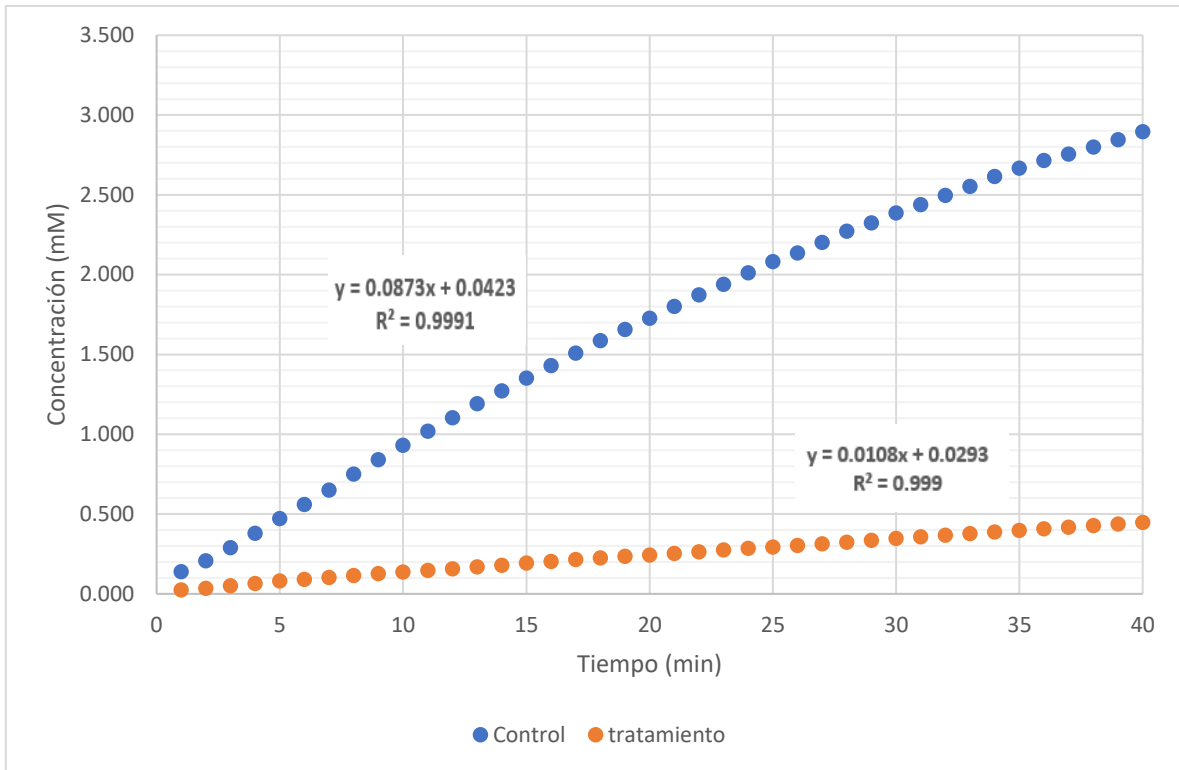


Figura 22. Resultados de la actividad enzimática.

En la figura 22 se observa que la velocidad inicial de la enzima después de haber pasado por un tratamiento es de 0.0108 mM/min y la del control es de 0.0873 mM/min. Esto demuestra que la enzima pierde un 87.6% de actividad, esto concuerda con lo propuesto, el efecto de la temperatura y la presencia de alcohol en el medio inhibe la actividad enzimática. Debido a esto la enzima pierde actividad hidrolítica.

7.CONCLUSIONES

La síntesis quimioenzimática es una nueva estrategia para la obtención de carbohidratos con estructuras complejas, se utilizó el método químico para realizar una modificación en un carbohidrato que servirá como bloque inicial para la construcción de oligosacáridos, para posteriormente usar enzimas que adicionen otro azúcar.

Se prepararon cinco diferentes donadores que se identificaron de diversas maneras, además se determinó la actividad hidrolítica con la enzima α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* sobre estos compuestos.

Se logró sintetizar quimioenzimáticamente oligosacáridos fucosilados, mediante la reacción de transfucosilación utilizando a la isoamilfucosa y bencilfucosa como sustrato donador de fucosa, la enzima α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* y diferentes aceptores y se definieron algunas condiciones de trabajo óptimas como: el tiempo de reacción y la concentración del donador, para obtener un mejor rendimiento.

La mezcla de isoamilfucosa y glucosa, con 15 h de reacción a 60 °C fueron las mejores condiciones para la síntesis de fucosil-glucosa, se obtuvo un rendimiento del 67%. La mezcla de bencilfucosa (5.90 mM) y lactosa, con 2 h de reacción a 60 °C fueron las mejores condiciones para obtener fucosil-lactosa, con un rendimiento del 57.9%.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Anatolitou, F., 2012, Human milk benefits and breastfeeding, *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine*,1,11-18.
2. Ballard, O., Morrow, A., 2013, Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors, *Pediatrics Clinics of North America*, 60, 49-74.
3. Bienenstock, J., Buck, R., Linke, H., Forsythe, P., Stanisz, A., Kunze, W., 2013. Fucosylated but Not Sialylated Milk Oligosaccharides Diminish Colon Motor Contractions. *PLOS ONE*, 8, e76236.
4. Bode, L., 2012, Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22, 1147-1162.
5. Chichlowski, M., German, J., Lebrilla, C., Mills, D., 2011. The Influence of Milk Oligosaccharides on Microbiota of Infants: Opportunities for Formulas. *The Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 331-351.
6. Coppa, G., Zampini, L., Galeazzi, T., Facinelli, B., Ferrante, L., Capretti R., Orazio, G., 2006. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatric Research*, 59, 377-382.
7. Doare, K., Holder, B., Bassett, A., Pannaraj, P., 2018. Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Frontiers in Immunology*,9, 1-10.

8. Domínguez, A., Vázquez, L., Ramos, G., 2009. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. Archivos Latinoamericanos de nutrición, 4, 358-368.

9. Escamilla, Y. 2016. Estudio de fucosidasas microbianas y su aplicación en la síntesis de oligosacáridos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

10. Farkas, E., Thiem, J., Ajsaka, K., 2000. Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified α -L-fucosidase from *Penicillium multicolor*. Carbohydrate Research, 328, 293-299.

11. Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia. 2016. UNICEF México. [En línea]

Disponible en:

https://www.unicef.org/mexico/spanish/noticias_33777.html [Último acceso el 13 de agosto de 2018]

12. Fügedi, P. (2006). Chapter 5. Oligosaccharides Synthesis. En Levy, D. (Ed). The Organic Chemistry of Sugars (pp. 181-221). Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

13. German, J., Freeman, S., Lebrilla C., Mills, A., 2008. Human Milk Oligosaccharides: Evolution, Structures and Bioselectivity as Substrates for Intestinal Bacteria. Nestle Nutrition Workshop Series Paediatric Programme, 62, 205-222.

14. Gómez-Álvarez, S., 2002. Fórmulas infantiles Alimentación adaptada. *Farmacia Profesional*, 16, 72-82.
15. Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., Cruz-Guerrero, A., 2018. Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by α -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186, 681-691.
16. Han, NS., Kim, T., Park, Y., Kim, J., Seo, J., 2012. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 30, 128-1278.
17. Hofvander, Y., 1991. Chapter 1. Extent and Benefits of Breast-Feeding. En Jensen, A., Slorach, S. (Ed). *Chemical Contaminants in Human Milk* (pp. 1-8). Boca Raton: CRC Press, Inc.
18. Kanie, O., Ogawa, T., Ito, Y., 1998. Chemical Synthesis of Oligosaccharides: Efficiency and Selectivity. *Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan*, 56, 952-962.
19. Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S., 2000. Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. *Annual Review of Nutrition*, 20, 699-722.
20. La Ferla, B., Properi, D., Lay, L., Russo, G., Panza, L., 2002. Synthesis of building blocks of human milk oligosaccharides. Fucosylated derivatives of the lacto- and neolacto-series. *Carbohydrate Research*, 337, 1333-1342.
21. Lawrence, R., Lawrence, R., 2004. Breast milk and infection. *Clinics in Perinatology*, 31, 501-528.

22. Lezyk, M., Jers, C., Kjaerulff, L., Gotfredsen, C., Mikkelsen, M., Mikkelsen, J., 2016. Novel α -L-Fucosidases from a Soil Metagenome for Production of Fucosylated Human Milk Oligosaccharides. PLoS ONE 11(1).

23. Li, W., McArthur, J., Chen, X., 2019. Strategies for chemoenzymatic of carbohydrates. Carbohydrate Research, 472, 86-97.

24. Martínez, T., Cordero, S., 2016. Lactancia materna en México: Recomendaciones para el diseño e implementación de una política nacional multisectorial de promoción, protección y apoyo de la lactancia materna en México. Primera edición. México: Academia Nacional de Medicina de México.

25. Muthana, S., Cao, H., Chen, X., 2009. Recent progress in chemical chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. Current Opinion in Chemical Biology, 13, 573-581.

26. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. 2002. Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo. Lactancia Materna. [En línea].

Disponible en:

<http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0b.htm#bm11x> [Último acceso el 13 de agosto de 2018]

27. Organización Mundial de la Salud. 2018. Alimentación del lactante y del niño pequeño. [En línea].

Disponible en:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/es/> [Último acceso el 11 de agosto del 2018].

28. Oliveira, D., Wilbey, A., Grandison A., Roseiro, L., 2015. Milk oligosaccharides: A review. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 305-321.

29. Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C., Tellier, C., 2007. Directed Evolution of the α -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* into an α -L-Transfucosidase. *Biochemistry*, 46, 1022-1033.

30. Rencurosi, A., Poletti, L., Russo, G., Lay, L., 2003. Lipase-Catalysed Regioselective Acylations in Combination with Regioselective Glycosylations as a Strategy for the Synthesis of Oligosaccharides: Synthesis of a Series of Fucosyllactose Building Blocks. *European Journal of Organic Chemistry*, 1672-1680.

31. Smilowitz, J., Lebrilla, C., Mills D., German, J., Freeman, S., 2014. Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate. *Annual Review of Nutrition*, 34, 143-169.

32. Thomson, P., Medina, D., Garrido, D., 2018. Human milk oligosaccharides and infant gut bifidobacteria: Molecular for their utilization. *Food Microbiology*, 75, 37-46.

33. Vermeer, H., Dijk, C., Kamerling, J., Vliegenthart, J., 2001. Fucosylation of Linear Alcohols: A Study of Parameters Influencing the Stereochemistry of Glycosylation. *European Journal of Organic Chemistry*, 193-203.

34. Ward, R., Niñonuevo, M., Mills, D. Lebrilla, C., German, J., 2007. In vitro fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 1398-1405.

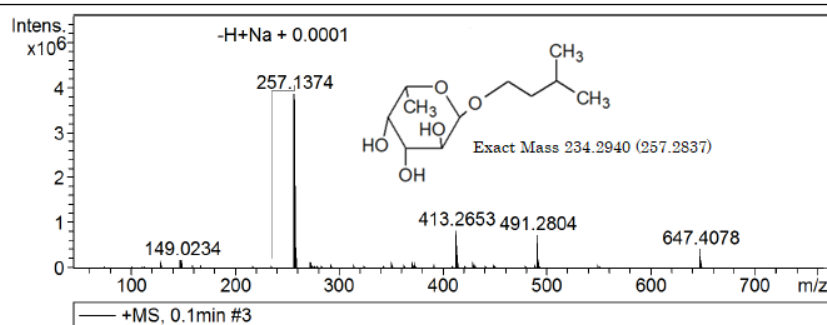
35. Xi, C., 2015. Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 72, 113-190.
36. Xia, J., Alderfer, J., Matta, K., 2000. Chemical Synthesis of a Core 2 Branched Pentasaccharide Containing a Carboxylate Group. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, 2485-2487.
37. Yu, Z., Chen, C., Kling, D., Liu, B., McCoy, J., Merighi, M., Heidtman, M., Newburg, D., 2013. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology*, 23, 169-177.
38. Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J., Meyer, A., 2014. Methods for Improving Enzymatic Trans-glycosylation for Synthesis of Human Milk Oligosaccharide. *Biomimetics*, 62, 9615-9631.

9. ANEXO

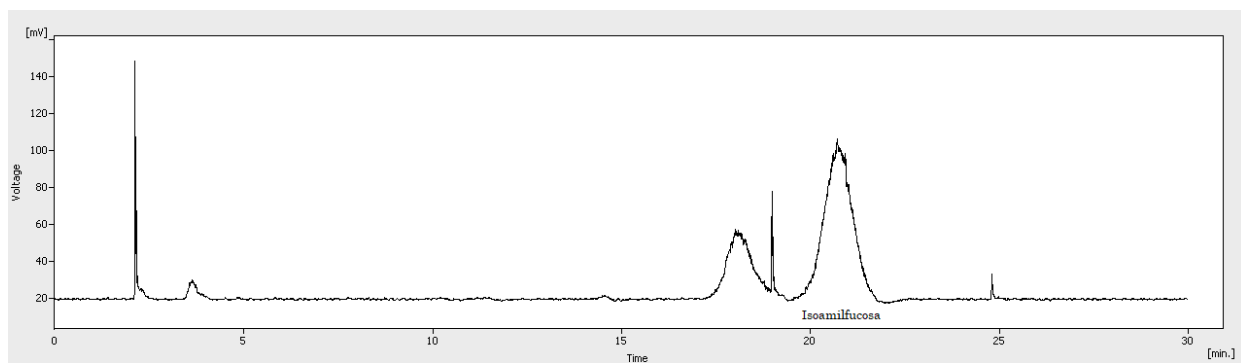
Anexo 1: Espectros de masas y cromatogramas para los donadores: isoamilfucosa y bencilfucosa.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	160 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	0 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C



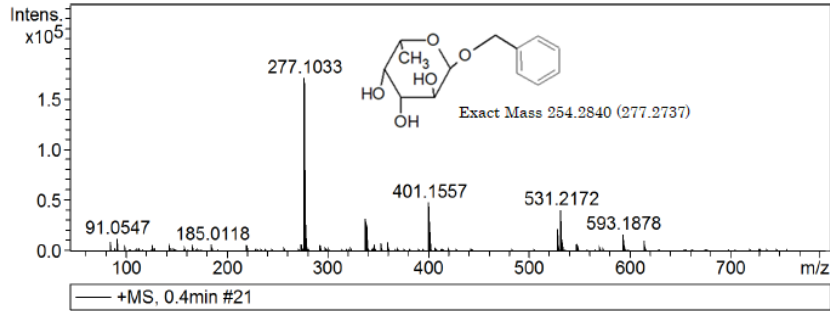
Espectro de masas para isoamilfucosa formando un aducto con Na⁺.



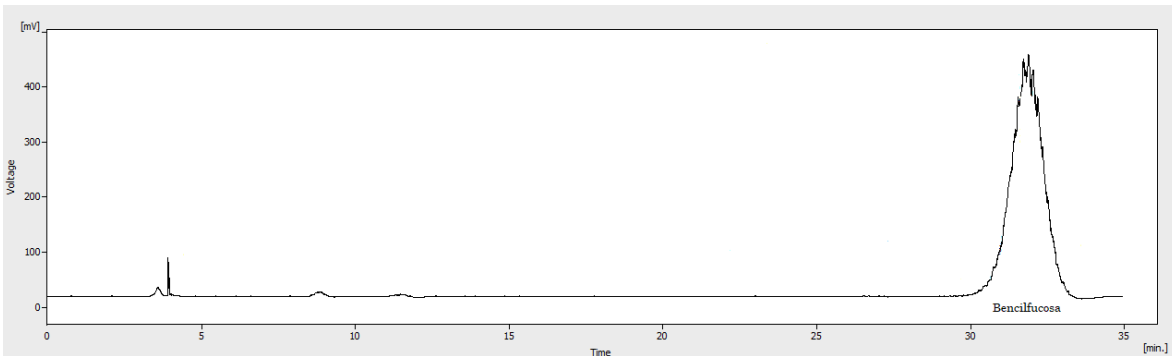
Cromatograma para isoamilfucosa parcialmente purificado, Tr = 20.7 min.

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.5 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	160 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Charging Voltage	0 V	Set Divert Valve	Source
		Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0 °C

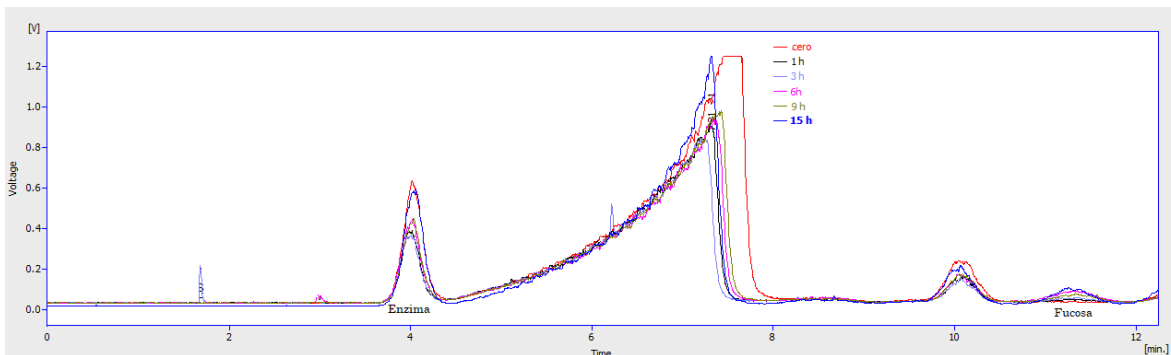


Espectro de masas para bencilfucosa formando un aducto con Na⁺.

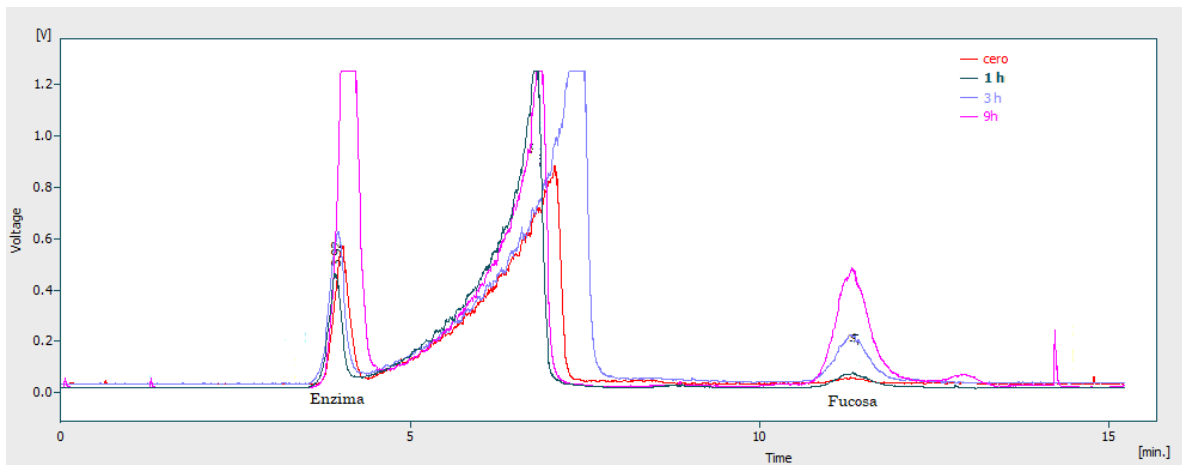


Cromatograma para bencilfucosa Tr = 32.1 min.

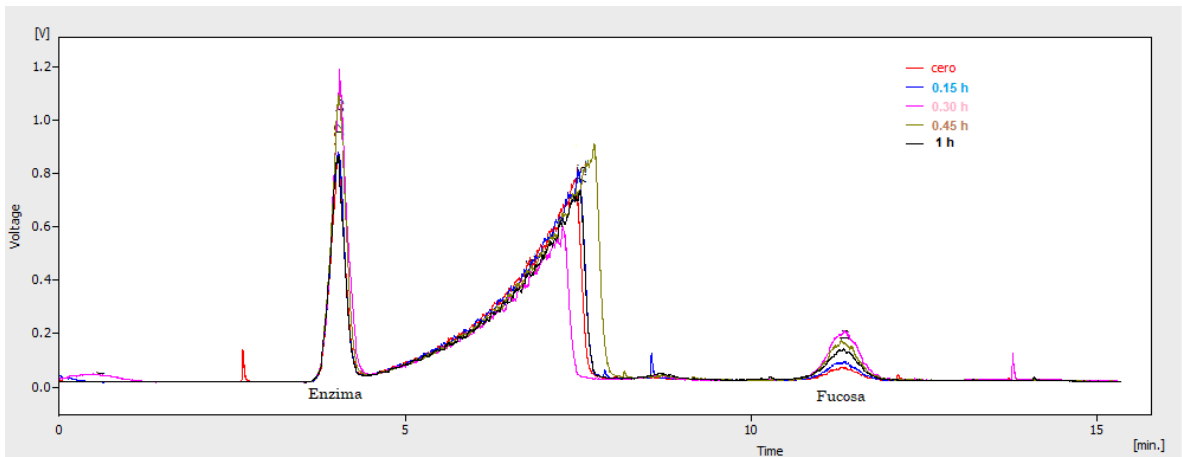
Anexo 2: Cromatogramas de hidrólisis de los donadores.



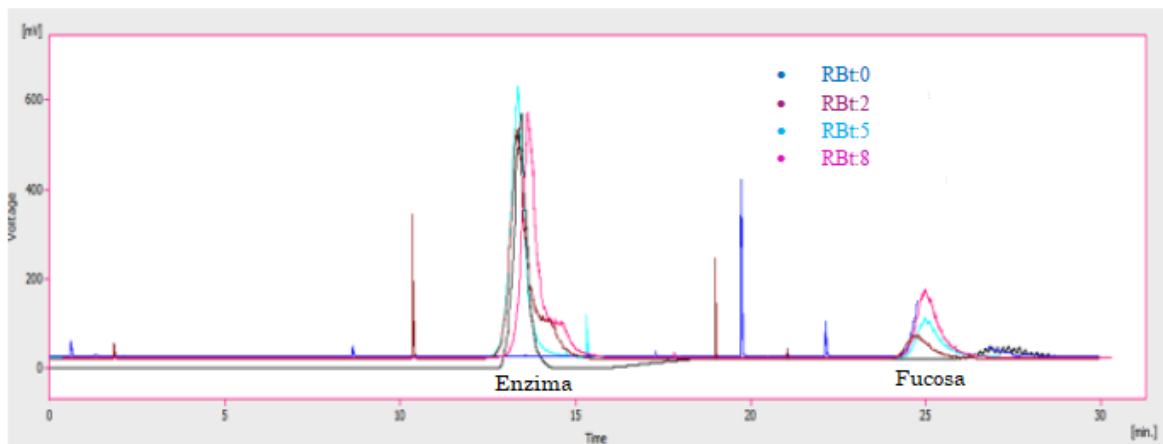
Cromatograma para la hidrólisis de la isopropilfucosa.



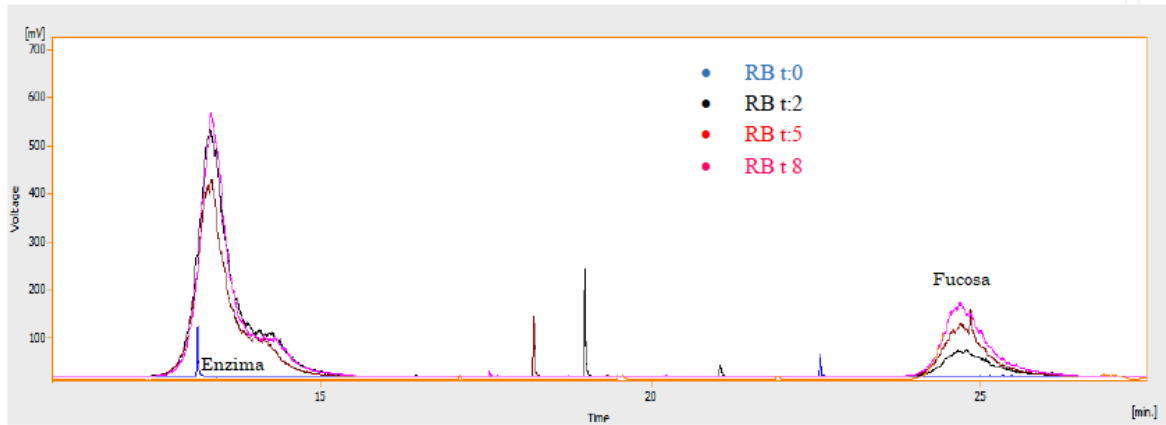
Cromatograma para la hidrólisis de la butilfucosa.



Cromatograma para la hidrólisis de la isoamilfucosa.

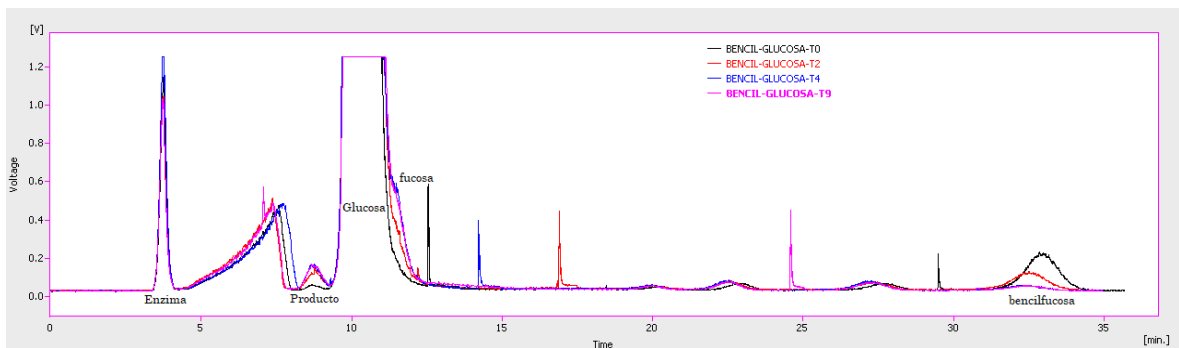


Cromatograma para la hidrólisis de la etilfucosa. Columna HC75-H+

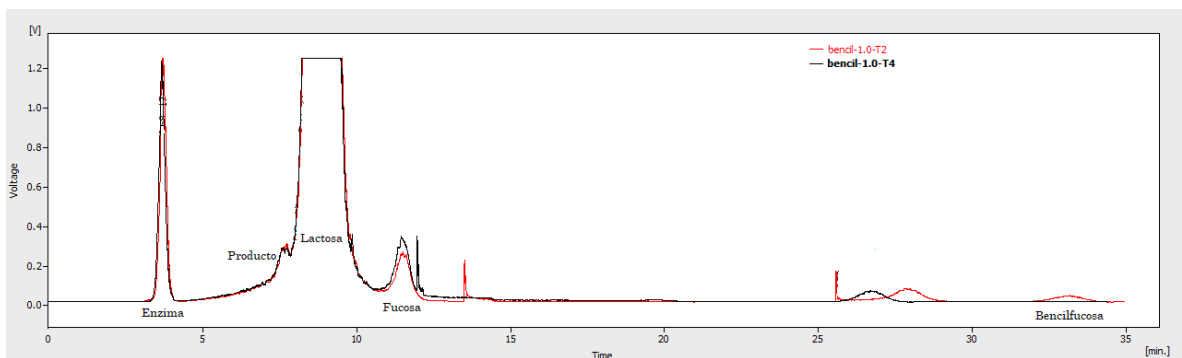


Cromatograma para la hidrólisis de la bencilfucosa. Columna HC75-H+

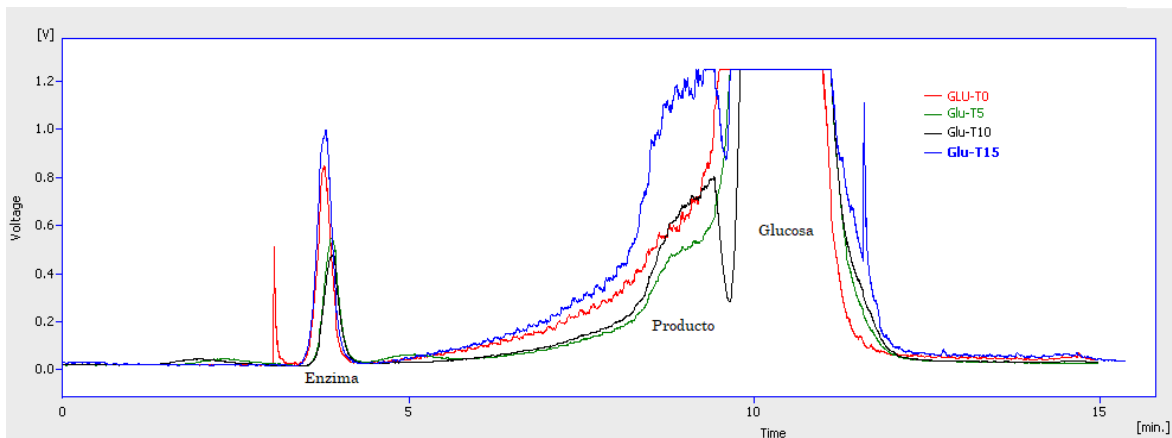
Anexo 3: Cromatogramas de la reacción de transfucosilación.



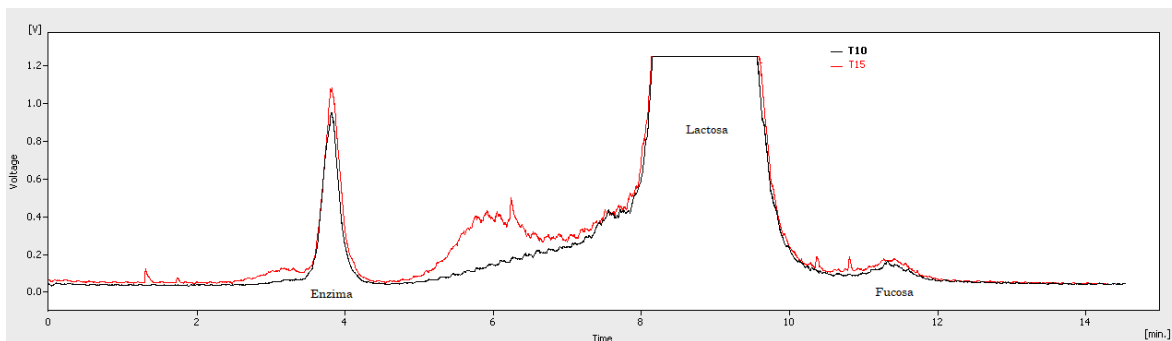
Cromatograma de la reacción de transfucosilación: bencilfucosa y glucosa.



Cromatograma de la reacción de transfucosilación: bencilfucosa y lactosa.



Cromatograma de la reacción de transfructosilación: isoamilfucosa y glucosa.



Cromatograma de la reacción de transfructosilación: isoamilfucosa y lactosa.