



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS DE FUCOLIGOSACÁRIDOS
EMPLEANDO LA α -FUCOSIDASA
INMOVILIZADA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

MORAYMA RAMÍREZ DAMIÁN



CIUDAD DE MÉXICO,

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: PH. D. OSCAR HERNÁNDEZ MELÉNDEZ
VOCAL: M. EN C. HIRAM FERNANDO RAMÍREZ CAHERO
SECRETARIO: DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO
1er. SUPLENTE: DRA. CARMINA MONTIEL PACHECO
2° SUPLENTE: M. EN C. MARÍA DEL CARMEN ORTIZ TAFOYA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

ASESOR DEL TEMA:

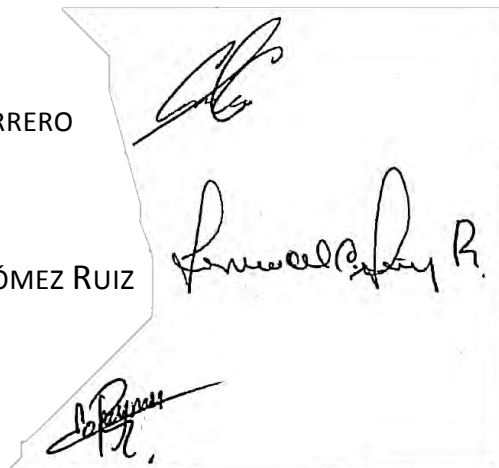
DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. LORENA DEL CARMEN GÓMEZ RUIZ

SUSTENTANTE:

MORAYMA RAMÍREZ DAMIÁN



The image shows three handwritten signatures in black ink, arranged vertically within a rectangular box. The top signature is the most stylized, the middle one is more legible and appears to be 'Lorena del Carmen Gómez Ruiz', and the bottom one is also stylized.

Contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Antecedentes (Marco teórico)	3
2.1	Oligosacáridos de la leche humana	3
2.1.1	Oligosacáridos fucosilados	4
2.1.2	Efectos beneficiosos de los oligosacáridos	5
2.1.2.1	Prebióticos	5
2.1.2.2	Antiadhesivos microbianos.....	6
2.1.2.3	Protección natural contra enterocolitis necrotizante.....	8
2.1.2.4	Efectos en la madre	8
2.1.3	Oligosacáridos en las fórmulas infantiles.....	9
2.2	Síntesis de oligosacáridos	11
2.2.1	Síntesis química	12
2.2.2	Síntesis enzimática.....	14
2.2.2.1	Glicosiltransferasas.....	15
2.2.2.2	Glicosidasas.....	15
2.2.2.2.1	α -L-Fucosidasas	16
2.2.2.2.1.1	α -L-Fucosidasa de <i>Thermotoga maritima</i>	17
2.3	Inmovilización de enzimas	19
2.3.1	Tipos de inmovilización.....	23
2.3.1.1	Adsorción	24
2.3.1.2	Atrapamiento.....	25
2.3.1.3	Entrecruzamiento	26

2.3.1.4	Unión covalente	29
2.3.2	Inmovilización en Eupergit®CM.....	32
3.	Objetivo	35
4.	Hipótesis	35
5.	Procedimiento experimental.....	36
5.1	Solución enzimática	36
5.2	Inmovilización de α -fucosidasa	36
5.2.1	Procedimiento 1.....	36
5.2.2	Procedimiento 2.....	36
5.2.3	Procedimiento 3.....	36
5.3	Determinación de actividad enzimática.....	37
5.3.1	Actividad de enzima libre.....	37
5.3.2	Actividad de enzima inmovilizada.....	37
5.4	Determinación de K_m y V_{max}	38
5.4.1	Enzima libre	38
5.4.2	Enzima inmovilizada	38
5.5	Síntesis de fucosil-lactosa.....	39
5.5.1	Reacción con enzima libre.....	39
5.5.2	Reacción con enzima inmovilizada.....	39
5.6	Identificación y cuantificación de productos de reacción.....	39
5.7	Cinética de síntesis del fucooligosacárido	40
5.7.1	Cinética de reacción con enzima libre	40
5.7.2	Cinética de reacción con enzima inmovilizada	40

5.8	Reutilización de la enzima y vida de anaquel	41
6.	Resultados y discusión.....	42
6.1	Condiciones de inmovilización	42
6.2	Determinación K_m y V_{max} de fucosidasa libre e inmovilizada	43
6.3	Síntesis del fucooligosacárido.....	46
6.3.1	Síntesis con enzima libre.....	46
6.3.2	Síntesis con enzima inmovilizada.....	47
6.4	Efecto de la concentración de sustratos en la síntesis del oligosacárido	49
6.4.1	Efecto de la concentración del sustrato aceptor	49
6.4.2	Efecto de la concentración del sustrato donador	50
6.4.3	Efecto de la concentración de ambos sustratos	51
6.5	Cinética de síntesis del fucooligosacárido	53
6.5.1	Cinética con la enzima libre	53
6.5.2	Cinética con la enzima inmovilizada	55
6.6	Reutilización de la enzima y vida de anaquel	57
7.	Conclusiones.....	60
8.	Bibliografía	61

Abreviaturas

Asp: Ácido aspártico

CLEAs: Entrecruzamiento de agregados de enzima

CLECs: Entrecruzamiento de enzimas cristalizadas

CLEs: Entrecruzamiento de enzimas

CLSDs: Entrecruzamiento de enzimas secadas por aspersion

FOS: Fructooligosacáridos

Gal-GlcNAc: N-Acetil-D-lactosamina

GH: Glicosidasas

Glu: Ácido glutámico

GOS: Galactooligosacáridos

GT: Glicosiltransferasas

HMO: Oligosacáridos de la leche humana

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia

OS: Oligosacáridos

pNP: *p*-Nitrofenol

pNP-F: 4-Nitrofenil- α -L-fucopiranosido

1. Introducción

Los oligosacáridos son componentes de la leche humana que están asociados a un efecto prebiótico, ya que funcionan como sustratos metabólicos para las bifidobacterias, favoreciendo la formación de una microbiota intestinal benéfica para la salud del recién nacido, además de prevenir la adherencia de microorganismos patógenos a la superficie del epitelio intestinal. Se ha demostrado que uno de los oligosacáridos predominantes durante el inicio de la lactancia relacionado con estos beneficios es la 2'-fucosil-lactosa con una concentración aproximada de 3 g/L al inicio de esta etapa y de 1.2 g/L hasta un año después del parto (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Bode, 2012; Smilowitz, Lebrilla, Mills, German, & Freeman, 2014).

Actualmente, existen múltiples factores post-parto que no permiten que algunos recién nacidos sean amamantados. Por ello, ha surgido un creciente interés por el estudio y la producción de oligosacáridos de la leche humana, en especial de los oligosacáridos fucosilados para su aplicación en las fórmulas lácteas, las cuales carecen de estos compuestos, debido a que están elaboradas con leche de animales de granja, que sólo los contienen en cantidades traza.

Por otro lado, la síntesis química de compuestos fucosilados requiere repetitivos y múltiples pasos de protección y desprotección de los grupos hidroxilo y la activación de carbonos anoméricos, lo cual reduce los rendimientos y la productividad. La producción de oligosacáridos utilizando enzimas o células microbianas completas es una alternativa para obtener productos regio- y estereoselectivos en una reacción en un solo paso, sin ninguna protección o activación química, dando como resultado procesos más eficientes (Han, Kim, Park, Kim, & Seo, 2012; Bankova, Bakalova, Petrova, & Kolev, 2006).

Las α -L-fucosidasas son enzimas que hidrolizan residuos fucosilados con enlaces α -(1-2) unidos a galactosa; α -(1-3), α -(1-4), y α -(1-6) unidos a *N*-acetilglucosamina y, además, pueden realizar síntesis de carbohidratos por transfucosilación, por ejemplo, la α -fucosidasa de la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima*, además de ser una

bacteria que produce α -fucosidasas similares a las de los mamíferos y comparte un 38% de identidad con las α -fucosidasas humanas, tiene alta actividad de transfucosilación para generar 4-nitrofenilgalactosa- α -1,2-fucosa a partir de 4-nitrofenilfucopiranosido como donador de fucosa (Sulzenbacher *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2012).

El objetivo de este proyecto fue realizar la síntesis de un oligosacárido fucosilado (fucosil-lactosa) mediante una reacción de hidrólisis de 4-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (*p*NP-F), que actúa como sustrato donador de fucosa a lactosa (sustrato aceptor), catalizada por la α -fucosidasa de *Thermotoga maritima* inmovilizada. La inmovilización de la enzima pretende obtener algunas ventajas sobre la utilización de la enzima libre, ya que, en general, se puede recuperar y reutilizar la enzima, debido a que conserva su actividad, lo que llevaría a una reducción de costos de la síntesis del fucósido.

De esta manera, se buscó determinar las mejores condiciones de inmovilización en esferas macroporosas de Eupergit®CM, conocer el efecto de la concentración de los sustratos (donador y aceptor), determinar la K_m y V_{max} , observar la cinética de la reacción y medir la vida de anaquel de la α -fucosidasa libre e inmovilizada.

2. Antecedentes (Marco teórico)

2.1 Oligosacáridos de la leche humana

La leche humana es el alimento primordial para los bebés durante el primer año de vida debido a que provee al infante de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales; lo que permite cubrir sus necesidades nutritivas, calóricas e inmunológicas (Yu *et al.*, 2013).

El principal carbohidrato de la leche humana es la lactosa, sin embargo, también contiene más de 130 oligosacáridos (OS) distintos que cumplen con una función inmunológica esencial para el recién nacido. Estas moléculas, HMO, por sus siglas en inglés, *Human Milk Oligosacharides*, pueden estar en forma libre o conjugada. Los conjugados incluyen glucoproteínas, glucolípidos y otros. Los oligosacáridos libres son el tercer componente en importancia de la leche humana tras la lactosa y los lípidos.

Los HMO se componen principalmente por 5 monosacáridos: D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina, L-fucosa y ácido siálico, siendo los fucooligosacáridos los que se encuentran en mayor proporción (Murata, Morimoto, Zeng, Watanabe, & Usui, 1999; Miñana, 2007; Bode, 2012. Han *et al.*, 2012).

2.1.1 Oligosacáridos fucosilados

No todas las mujeres sintetizan el mismo tipo de oligosacáridos. La composición de HMO refleja las características del grupo sanguíneo, el cual depende de la expresión de ciertas glucosiltransferasas humanas. Además de las variaciones genéticas, factores como los aspectos nutricionales, ambientales o incluso el curso de la lactancia también intervienen en esta variación (Bode, 2012).

Por ejemplo, la concentración total de los oligosacáridos disminuye a medida que avanza el curso de la lactancia, de modo que, después de un año, la leche humana contiene menos de la mitad de oligosacáridos que en las primeras semanas de vida. Los oligosacáridos fucosilados pueden tener un enlace 2-fucosa o 3-fucosa, esta composición también varía según la nacionalidad de las madres y el curso de la lactancia. La 2'-fucosil-lactosa, por ejemplo, está presente en el 100% de las mujeres mexicanas, el 91% de las francesas, 86% de las italianas, 83% de las alemanas y el 46% de las filipinas, y disminuye conforme avanza la lactancia, mientras que la 3'-fucosil-lactosa aumenta (Miñana, 2007).

El sustrato fucosilado de mayor interés comercial es el oligosacárido 2'-fucosil-lactosa, el cual se cree que protege a los infantes de agentes infecciosos (Albermann, Piepersberg, & Wehmeier, 2001).

2.1.2 Efectos beneficiosos de los oligosacáridos

Los HMO no juegan un papel apreciable para satisfacer las necesidades nutricionales del lactante, ya que no son digeribles por las enzimas intestinales de los mamíferos. Una vez ingeridos, resisten el bajo pH del estómago de los bebés, así como la digestión por enzimas pancreáticas, lo que les permite alcanzar la parte distal del intestino delgado y el colon en forma intacta. Aproximadamente el 97% de los oligosacáridos consumidos pasan intactos a las heces, mientras que aproximadamente el 0.5% son absorbidos y posteriormente excretados por la orina. Su sustrato intestinal favorece que cumplan una función prebiótica al promover el crecimiento de bifidobacterias y, a su vez, brinden protección contra la adhesión de patógenos y la enterocolitis necrotizante en el recién nacido, además de otorgar algunos efectos beneficiosos a la madre (Chaturvedi, Warren, Buescher, Pickering, & Newburg, 2001b; Miñana, 2007; Ashida *et al.*, 2009; Bode, 2012; Han *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013).

2.1.2.1 Prebióticos

Los HMO cumplen una función prebiótica estimulando el crecimiento de bifidobacterias, ya que en presencia de oligosacáridos fucosilados expresados en la superficie de la mucosa intestinal, se favorece el establecimiento de una comunidad microbiana normal beneficiosa en el intestino, lo que brinda protección frente a infecciones entéricas y se asocia con un menor riesgo de muchos tipos de diarrea en bebés alimentados con leche humana. Así, los oligosacáridos son un componente principal de sistema inmunológico innato con el que la madre protege a su hijo de patógenos durante la lactancia (Miñana, 2007; Yu *et al.*, 2013).

Un ejemplo de los microorganismos cuyo desarrollo se favorece con los componentes de la leche humana es *Bifidobacterium bifidum*. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* también crece bien cuando los HMO están disponibles como única fuente de carbohidratos, consume enteramente oligosacáridos incluyendo productos de la degradación de monosacáridos y disacáridos (Bode, 2012; Han *et al.*, 2012).

La presencia de una microbiota con predominio de bifidobacterias puede derivar en diferentes acciones beneficiosas, entre ellas, la fermentación de los OS con formación de ácidos grasos de cadena corta, y la síntesis de vitamina B₆, B¹², tiamina, ácido fólico y ácido nicotínico (Miñana, 2007).

2.1.2.2 Antiadhesivos microbianos

La mayoría de las bacterias intestinales, incluidas las patógenas que se encuentran en alimentos, no pueden crecer utilizando los HMO como única fuente de carbono. Algunos virus, bacterias y protozoarios patógenos necesitan adherirse a las superficies mucosas para colonizar o invadir al hospedero y causar enfermedades. Esta adhesión es comúnmente iniciada por interacciones lectina-glicano. Los HMO tienen una estructura semejante a los receptores específicos hidrocarbonados de bacterias, toxinas y virus, de modo que actúan como receptores competitivos en las células intestinales de superficie del huésped para prevenir la adherencia de patógenos y reducir el riesgo de infecciones parasitarias, bacterianas y virales. De esta manera, la inhibición de los HMO ha sido milenaria y no genera resistencia bacteriana como la observada con el uso de algunos antibióticos. Por ejemplo, se ha demostrado que los oligosacáridos fucosilados inhiben el enlace con ligandos de células del huésped con Calcivirus, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* (en células epiteliales, faríngeas y bucales) y *Helicobacter pylori* (Miñana, 2007; Bode, 2012; Han *et al.*, 2012).

Los HMO con enlaces terminales α -1,2-fucosilo tienen actividad contra *Campylobacter jejuni*, debido a que inhiben su unión a la mucosa intestinal *ex vivo*. La diarrea en bebés amamantados causada por *Campylobacter* es inversamente proporcional a la cantidad de estos oligosacáridos en la leche humana (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Han *et al.*, 2012).

Un estudio prospectivo de casi 100 pares de madres y niños de la Ciudad de México, realizado por Morrow *et al.* (2004), demostró que la diarrea causada por *C. jejuni* ocurre significativamente menos en niños en los que la leche humana contuvo altas

concentraciones de 2'-fucosil-lactosa. Además, se comprobó que la diarrea ocasionada por Calcivirus ocurría menos seguido en niños alimentados por leche humana con altas concentraciones de lacto-N-difucohexosa I, otro oligosacárido α -1-2-fucosilado (Bode, 2012).

En estudios *in vitro*, se ha demostrado que los HMO elevan la proporción de *Bifidobacterium spp.*, así como las concentraciones de lactato y ácidos orgánicos, disminuir el pH del medio y reducir la proporción de *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*. Los principales oligosacáridos relacionados con estas propiedades son 2'-fucosil-lactosa, lactodifucotetraosa y 3'-fucosil-lactosa (Yu *et al.*, 2013).

También se ha reportado la inhibición de la adhesión de *E. coli* a las células epiteliales de la vejiga. Y se conoce que los HMO interactúan con el receptor de guanilato ciclasa para la toxina estable de *E. coli*, inhibiendo así la unión de la toxina (Chaturvedi *et al.*, 2001a).

El efecto antiadhesivo microbiano probablemente aplique a ciertos parásitos protozoarios como *Entamoeba histolytica*, que causa disentería amebiana o absceso hepático amebiano, ya que la colonización e invasión de *E. histolytica* también requiere de la adherencia a la mucosa intestinal, de lo contrario, el parásito es excretado por las heces sin causar enfermedad.

Por otro lado, la leche humana cubre las superficies mucosas de las regiones nasofaríngeas de los infantes y, ocasionalmente, alcanza el tracto respiratorio superior durante los episodios de aspiración. Los bebés amamantados son menos propensos a desarrollar otitis media causada por *Streptococcus pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Haemophilus influenzae*. Y también, tienen menor riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria sincitial viral (RSV).

Del mismo modo, los HMO son absorbidos y posteriormente excretados en la orina; al transitar por el sistema urinario, reducen la hemaglutinación uropatogénica inducida por *E. coli*, lo que sugiere que también reducen infecciones del tracto urinario.

De acuerdo con lo anterior, los efectos antiadhesivos microbianos pueden contribuir a la menor incidencia de infecciones intestinales, respiratorias y del tracto urinario en bebés amantados en comparación con los alimentados con fórmula láctea (Bode, 2012).

2.1.2.3 *Protección natural contra enterocolitis necrotizante*

Se ha planteado que los HMO contribuyen a los efectos protectores de la lactancia humana contra la enterocolitis necrotizante (Bode, 2012).

2.1.2.4 *Efectos en la madre*

La leche humana contiene comunidades complejas de bacterias que son características de la mujer en lactación. Estas bacterias pueden ser consideradas como probióticos naturales que forman parte de la microbiota intestinal del bebé, pero también pueden considerarse comensales potenciales que modulan la composición de la leche humana o de patógenos que causan padecimientos como la mastitis. Los HMO pueden influir en las comunidades bacterianas de la leche en la glándula mamaria, sirviendo como prebióticos o antiadhesivos microbianos o modulando directamente la respuesta de las células epiteliales de la glándula mamaria o la respuesta inmune local (Bode, 2012).

2.1.3 Oligosacáridos en las fórmulas infantiles

Aunque la leche humana es la mejor opción nutricional para los bebés, la lactancia no siempre es posible, y las fórmulas lácteas son el resultado de más de 100 años de búsqueda de un sucedáneo apropiado cuyo beneficio principal sea satisfacer las necesidades nutricionales del bebé; sin embargo, dichas no logran cumplir todas las funciones de la leche humana, ya que esta última es única en su composición, debido a su gran cantidad y compleja gama de oligosacáridos. Se han identificado aproximadamente 200 de ellos, mismos que poseen características muy distintivas de la leche de otros mamíferos (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Bode, 2012).

Los oligosacáridos de la leche de los animales de granja son mucho menos abundantes y complejos estructuralmente que los de leche humana. La leche de vaca, cabra, cerda y oveja contiene solamente cantidades traza de estos compuestos (ver Tabla A) y, como consecuencia, tampoco están presentes de manera significativa en las fórmulas infantiles a base de leche de vaca. Además, no se cuenta con ningún otro recurso natural disponible para obtener HMO para formulas infantiles (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Miñana, 2007; Han *et al.*, 2012).

Tabla A. Macronutrientes y oligosacáridos en leche humana y bovina.

Componente	Leche humana	Leche bovina
Proteína (g/L)	8	32
Lípidos (g/L)	41	37
Lactosa (g/L)	70	48
Oligosacáridos (g/L)	5-15	0.05
Numero de oligosacáridos identificados	100	~40
Oligosacáridos fucosilados (%)	50-80	~1
Oligosacáridos sialilados (%)	10-20	~70

Fuente: Bode, 2012.

La presencia de HMO se ha relacionado con una menor tasa de morbilidad y mortalidad en bebés amamantados en comparación con bebés alimentados con fórmulas lácteas. Se ha observado que el intestino de niños alimentados con leche humana es mucho más resistente a alergias e infecciones, donde predominan las

bifidobacterias y lactobacilos en una relación 1000:1 frente a las enterobacterias, mientras que en el intestino de los niños alimentados con fórmulas infantiles predominan enterobacterias sobre las bifidobacterias en una relación de 10:1, hecho que refleja una microbiota menos estable como producto de una lactancia artificial.

Por esta razón, la búsqueda y producción de oligosacáridos tiene gran relevancia, en especial la de fucooligosacáridos, que puedan compensar esas deficiencias en las fórmulas lácteas (Miñana, 2007; Bode, 2012; Yu *et al.*, 2013).

Los HMO están ausentes en las fórmulas infantiles debido a la escasez de métodos industriales de producción. En su lugar, se añaden galactooligosacáridos (GOS) y/o fructooligosacáridos (FOS) con la expectativa de lograr el efecto prebiótico que promueve una microbiota similar a la de niños amamantados con leche humana. La ingesta de GOS y FOS influye en la composición de la microbiota y las heces de los infantes. Una mezcla definida de estos oligosacáridos reduce la incidencia de dermatitis atópica durante los primeros 6 meses de vida y, subsecuentemente, disminuyen manifestaciones alérgicas e infecciones durante los dos primeros años de vida (Bode, 2012; Han *et al.*, 2012).

En los últimos años, con la finalidad de disponer de nuevos componentes antibacterianos y antivirales, ha aumentado el interés por los oligosacáridos de la leche humana, especialmente por los fucooligosacáridos, para prevenir, por ejemplo, la infección infantil por patógenos entéricos, en particular, durante el desarrollo temprano, por lo que se han realizado más estudios sobre estas moléculas (Chaturvedi *et al.*, 2001a; Han *et al.*, 2012).

2.2 Síntesis de oligosacáridos

Debido a la importancia de los oligosacáridos fucosilados en distintos procesos biológicos, ha surgido la necesidad de producir cantidades suficientes de estos compuestos para continuar la investigación sobre su función biológica y para estudiar sus posibles aplicaciones. Sin embargo, los fucooligosacáridos permanecen relativamente inaccesibles a la investigación científica y farmacéutica debido a las dificultades inherentes a su síntesis, por lo que se ha buscado desarrollar diferentes métodos para su obtención (Becerra, 2016; Osanjo *et al.*, 2007).

Los oligosacáridos se pueden sintetizar por métodos químicos o enzimáticos. Los procesos químicos implican el diseño cuidadoso de grupos protectores, catalizadores, condiciones de reacción, grupos donantes y aceptores. A pesar de estas dificultades intrínsecas, se han desarrollado diversas metodologías efectivas para su producción, que han contribuido a las investigaciones sobre sus funciones biológicas. Por otro lado, los métodos enzimáticos presentan algunas ventajas sobre los químicos, debido a que la glicosilación se lleva a cabo estereo- y regioselectivamente bajo condiciones de reacción suaves sin procedimientos elaborados tales como la protección y desprotección de grupos hidroxilo (Murata & Usui, 2006).

2.2.1 Síntesis química

Se han desarrollado diversos métodos químicos para la producción de oligosacáridos, no obstante, son complicados e involucran varias etapas. El número de etapas aumenta con el tamaño del oligosacárido, de modo que, aunque la síntesis de un disacárido puede requerir de cinco a siete etapas, un trisacárido puede requerir más de diez etapas, lo que hace de la síntesis un proceso largo. Lo anterior ocurre porque están implicados muchos pasos de protección y desprotección química para que la reacción sea regioselectiva, debido a que los carbohidratos tienen varios grupos hidroxilo de reactividad similar. Por ello, se requiere una colocación estratégica de grupos protectores que enmascaren los grupos hidroxilo. Además, se debe considerar la naturaleza estérica y electrónica de los grupos protectores, ya que influyen en gran medida en la reactividad de los bloques de construcción y en el resultado de las reacciones de glicosilación. Por lo anterior, la obtención del anómero correcto, α ó β , se vuelve difícil (Nilsson, 1988; Bartolozzi & Seeberger, 2001; Maitin & Rastall, 2013).

En ese contexto, se han desarrollado diferentes técnicas para mejorar la producción de oligosacáridos, como la síntesis en fase sólida y la síntesis automatizada:

- La síntesis de oligosacáridos en fase sólida consiste en ensamblar el residuo terminal del compuesto que se va a sintetizar a un soporte sólido insoluble para que el oligosacárido que se vaya formando esté anclado al soporte mediante una estrategia de elongación gradual. Se utiliza un exceso de reactivo en cada etapa para asegurar altos rendimientos, no requiere purificación después de cada transformación sintética, es automatizable, lo que resulta ventajoso. Las desventajas son la dificultad de dar seguimiento a la reacción y el análisis de los productos de reacción mientras permanecen unidos al soporte; la necesidad de introducir dos pasos extra en la estrategia sintética para la unión del material de partida al soporte y la separación del compuesto final, así como las dificultades para la producción a escala (Bartolozzi & Seeberger, 2001; Encinas, 2008).

-La síntesis automatizada de oligosacáridos se llevó a cabo basándose en el hecho de que la reactividad de un azúcar depende en gran medida de los grupos protectores y del grupo activador de los carbonos anoméricos, por lo que se estableció un perfil de reactividad de una serie de bloques de construcción, se desarrolló una base de datos, un buscador y un programa por computadora (Optimizer) que permite seleccionar las mejores combinaciones de una lista de reactivos para la síntesis de oligosacáridos de interés, junto con los rendimientos previstos. El programa se ha empleado con éxito para la síntesis controlada de trisacáridos y tetrasacáridos, permitiendo la posibilidad de crear una quimioteca de oligosacáridos (Maitin & Rastall, 2013).

A pesar de los avances, el área de síntesis química sigue siendo un desafío debido a su complejidad técnica y a la ausencia de procedimientos generales aplicables a la síntesis de una gama de oligosacáridos, lo que hace imposible su adaptación a escala industrial. Su aplicación se limita actualmente a la síntesis de algunos oligosacáridos bioactivos para fines de investigación. Por estas razones, existe un gran interés en desarrollar estrategias sintéticas basadas en el uso de enzimas (Nilsson, 1988; Rastall & Bucke, 1992; Maitin & Rastall, 2013).

2.2.2 Síntesis enzimática

Los oligosacáridos son generalmente sintetizados *in vivo* por glicosiltransferasas específicas que se expresan en las glándulas mamarias y que transfieren un solo azúcar nucleotídico activado a un aceptor o cadena de carbohidratos en crecimiento. La biosíntesis de oligosacáridos fucosilados en la glándula mamaria se efectúa por 4 tipos de reacciones (Albermann *et al.*, 2001; Cervantes, 2006):

- Las estructuras centrales se forman por la transferencia sucesiva de unidades de N-Acetil-D-lactosamina (Gal-GlcNAc) a lactosa.
- Los residuos GlcNAc se fucosilan por la acción de las enzimas α -3- ó α -3,4-fucosiltransferasa.
- Una α -2-fucosiltransferasa cataliza la transferencia de fucosa a residuos de galactosa.
- Una α -3-fucosiltransferasa cataliza la fucosilación del residuo de glucosa.

Debido a que la mayoría de oligosacáridos naturales son producidos por enzimas, se pensó que debía usarse la capacidad de síntesis de las enzimas *in vitro* para producir oligosacáridos (Maitin & Rastall, 2013).

La síntesis enzimática *in vitro* tiene diversas ventajas sobre la síntesis química, ya que se puede controlar la configuración anomérica, por lo que no se obtiene una mezcla de isómeros; permite diferentes condiciones de reacción; las enzimas presentan alta regio- y estereoespecificidad para formar enlaces glicosídicos sin la necesidad de protección de grupos reactivos (OH); las enzimas se pueden obtener por fermentación, y se pueden inmovilizar, lo que posibilita su reutilización posterior, haciendo el proceso más económico (Hancock, Vaughan, & Withers, 2006; Maitin & Rastall, 2013).

Se han utilizado dos tipos de enzimas para la preparación de oligosacáridos complejos *in vitro*, las glicosidasas o glicosil-hidrolasas (GH), que son útiles para la síntesis de

oligosacáridos más cortos y las glicosiltransferasas (GT), que son adecuadas para la síntesis de oligosacáridos mayores (Nilsson, 1988).

2.2.2.1 Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas son responsables de la biosíntesis de oligosacáridos y compuestos glicoconjugados, catalizan la transferencia estereo- y regiospecífica de un monosacárido desde un sustrato donador de azúcar-nucleótido a un sustrato aceptor. Se clasifican por el azúcar transferido del donante al aceptor y por la especificidad del aceptor (Nilsson, 1988).

La especificidad de las glicosiltransferasas por el sustrato puede mejorarse o cambiarse para crear enzimas que tengan una nueva especificidad por sustratos aceptores y/o donadores no naturales. Los oligosacáridos no naturales se podrían sintetizar utilizando un azúcar modificado que se transfiere por glicosiltransferasas con una especificidad de sustrato más amplia o diseñada, o usando un aceptor no natural para el monosacárido transferido (Albermann *et al.*, 2001).

Algunas glicosiltransferasas que se han purificado y aplicado a la síntesis de diferentes oligosacáridos *in vitro* son galactosiltransferasa, fucosiltransferasa, sialiltransferasa y N-acetilglucosaminiltransferasa (Rastall & Bucke, 1992).

2.2.2.2 Glicosidasas

La función normal de las glicosidasas es hidrolizar sustratos que contienen un monosacárido unido por un enlace α ó β . Sin embargo, con ciertas condiciones, las mismas enzimas también catalizan la reacción de transglicosilación y sintetizan oligosacáridos. El principal inconveniente de la síntesis de oligosacáridos por estas enzimas es que el equilibrio de la reacción se desplaza para favorecer la hidrólisis sobre la síntesis en sistemas acuosos, lo que conduce a un bajo rendimiento en la producción de oligosacáridos. En contraste, están fácilmente disponibles, ya que se producen ampliamente en virus, microorganismos, plantas y células animales; no

requieren cofactores y pueden utilizarse sustratos sencillos y fácilmente disponibles como los compuestos formados por un *p*-nitrofenol y un azúcar. Por lo tanto, las glicosidasas han sido consideradas como una herramienta potente para la síntesis práctica de oligosacáridos (Nilsson, 1988; Maugard, Gaunt, Legoy, & Besson, 2003; Murata & Usui, 2006).

2.2.2.2.1 α -L-Fucosidasas

Las α -L-fucosidasas son exoglicosidasas capaces de hidrolizar residuos terminales α -L-fucosilo de compuestos glicoconjugados involucrados en una amplia variedad de procesos biológicos. La L-fucosa es uno de los monosacáridos más comunes presentes en el extremo no reductor de muchos glicanos en superficies celulares de mamíferos, antígenos de grupos sanguíneos y oligosacáridos de la leche humana (Osanjo *et al.*, 2007)

Existen dos familias de α -L-fucosidasas: GH29 y GH95.

- En la familia GH95, las 1,2- α -fucosidasas sólo hidrolizan enlaces fucosa- α -1-2-galactosa presentes en los extremos no reductores de los oligosacáridos. Estas fucosidasas no pueden sintetizar carbohidratos por transglicosilación.
- En la familia GH29, las α -L-fucosidasas hidrolizan residuos fucosilados con enlaces α -(1-2) unidos a galactosa; α -(1-3), α -(1-4) y α -(1-6) unidos a *N*-acetilglucosamina y, además, pueden realizar síntesis de carbohidratos por transglicosilación.

La reacción de transglicosilación realizada por α -L-fucosidasas se denomina transfucosilación. Entre los microorganismos utilizados para la obtención de α -L-fucosidasas están *Aspergillus niger*, *Penicillium multicolor*, *Thermotoga maritima* y *Paenibacillus thiaminolyticus* (Becerra, 2016).

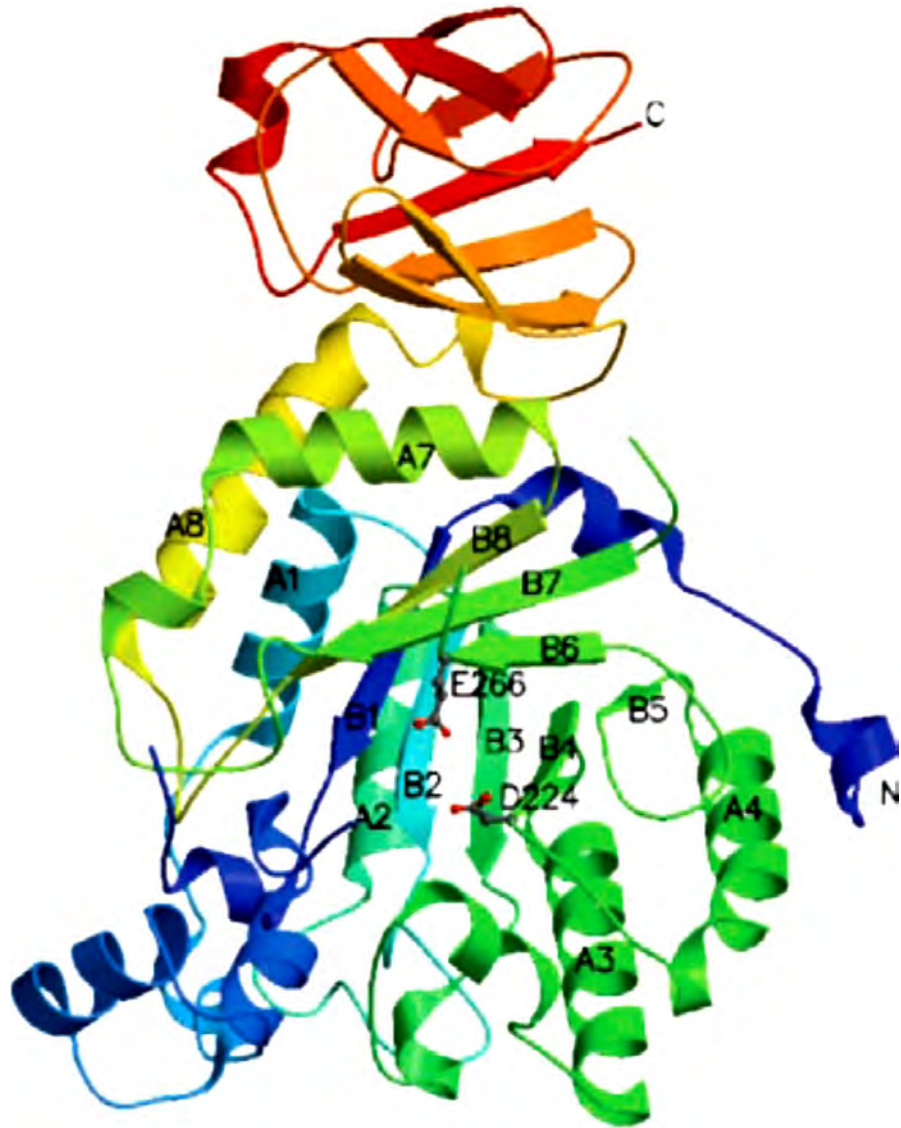
2.2.2.2.1.1 α -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*

Los miembros del *phylum Thermotogae* comprenden un grupo de bacterias Gram negativas, termófilas, en forma de varilla, no esporuladas, con una envoltura exterior tipo vaina, también conocida como toga. Estos microorganismos presentan temperaturas de crecimiento altas (65-90°C).

La bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* fue originalmente aislada de una característica geotérmica de la isla de Vulcano, Italia (Connors, Mongodi, Johnson, Montero, Nelson, & Kelly, 2006). Esta enzima es el pariente bacteriano más cercano a las α -fucosidasas de los mamíferos y comparte un 38% de identidad con las α -fucosidasas humanas. Es una proteína con estructura hexamérica de dos dominios (N-terminal y C-terminal) con dimensiones totales de 75 x 65 x 55 Å y una masa molecular relativa de 300 000 Da (Ver Figura A). El dominio N-terminal adopta una estructura de barril (β/α)₈ con ocho láminas β paralelas empaquetadas alrededor de un eje central y rodeados por seis hélices. El sitio activo se localiza en un pequeño bolsillo formado por los extremos C-terminales de las hojas β centrales del dominio (β/α)₈. El tamaño del bolsillo permite la unión de un solo residuo de L-fucosa.

El mecanismo catalítico se lleva a cabo a través de un doble desplazamiento que se basa en dos grupos carboxilo estratégicamente localizados a 5,5 Å de distancia, ya sea Asp o Glu. En la primera etapa, un grupo carboxilo actúa como un ácido, ayudando a la salida de la aglicona, mientras que el segundo ataca al carbono anomérico generando un intermediario covalente fucosil-enzima. En la segunda etapa, el primer grupo carboxilo actúa como base, activando una molécula de agua entrante (u otro grupo aceptor) para un ataque nucleófilo sobre el carbono anomérico del intermediario fucosil-enzima, resultando en hidrólisis o transfucosilación (Sulzenbacher *et al.*, 2004).

Figura A. Vista general de la α -fucosidasa de *Thermotoga maritima*. Diagrama de cintas coloreado en un gradiente a lo largo de la secuencia de aminoácidos desde el extremo N (azul) hasta el extremo C (rojo). Se indican los elementos estructurales secundarios correspondientes a la estructura $(\beta/\alpha)_8$ -plegada. El nucleófilo catalítico Asp²²⁴ ácido y Glu²⁶⁶ base se muestran en forma de bola y palo, con átomos de carbono de color gris y oxígenos de color rojo (Adaptada de Sulzenbacher *et al.*, 2004).



Se ha informado que la α -fucosidasa de *Thermotoga maritima*, bajo ciertas condiciones, es capaz de hidrolizar el enlace 4-Nitrofenil- α -L-fucopiranosido (pNP-F), liberando fucosa en el medio, y también realiza la reacción de fucosilación para generar un oligosacárido fucosilado (Escamilla, 2016).

2.3 Inmovilización de enzimas

Para llevar a cabo procesos en los que se utilizan enzimas, es necesario considerar su estabilidad estructural para lograr un aumento en la eficiencia de reacción (Romero, Mejía, Sánchez, Balagurusamy, & Luévanos, 2014).

Generalmente, el componente más caro de la reacción de síntesis enzimática de oligosacáridos es la enzima misma. Sin embargo, la economía del proceso biocatalítico puede ser mejorada por la reutilización de la enzima gracias a su inmovilización en un soporte inerte (Rastall & Bucke, 1992; Tu, Zhang, Kurabi, Gilkes, Mabee, & Saddler, 2006; Brady & Jordaan, 2009).

Una enzima inmovilizada es aquella que se encuentra confinada en un espacio definido y retiene su actividad catalítica. Los componentes principales de un sistema de inmovilización enzimáticos son la enzima, la matriz o soporte y el método de fijación (Romero *et al.*, 2014).

Las enzimas inmovilizadas pueden recuperarse e implementar sistemas de producción continua con ganancias expresivas de productividad. Además, el uso de una enzima inmovilizada permite simplificar el diseño de los reactores y evitar pasos subsecuentes del proceso, es decir, controlar la reacción al tener la capacidad de detenerla mediante la eliminación de la enzima a partir de la solución de reacción (Mateo, Palomo, Fernandez-Lorente, Guisan, & Fernandez-Lafuente, 2007; Brady & Jordaan, 2009; Elnashar, 2010; Da Silva, Aguirre, Vieira, Fernandes de Medeiros, & Veiga, 2012).

La capacidad de retener o recubrir enzimas permite la separación del producto, que no se contamina con la enzima (Brady & Jordaan, 2009; Elnashar, 2010).

La inmovilización dentro de las estructuras porosas de un sólido ayuda a mantener las moléculas de la enzima totalmente dispersas, sin la posibilidad de interactuar con alguna interfase externa (Mateo *et al.*, 2007).

La inmovilización de la enzima concede algunas ventajas sobre la utilización de la enzima libre, ya que altera significativamente su comportamiento. En primer lugar, se producen cambios en su estabilidad. En segundo, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno, como consecuencia de que la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima (Arroyo, 1998; Tu *et al.*, 2006; Vu & Le, 2008).

Se ha presentado una mejora en la estabilidad de la enzima frente a pH, temperatura, disolventes, contaminantes e impurezas después de su inmovilización, que se debe principalmente a lo siguiente (Arroyo, 1998; Elnashar, 2010):

- Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Esto se presenta en métodos en los que intervienen enlaces covalentes, como el entrecruzamiento o la unión a soportes activados, o incluso en métodos mixtos que combinan la unión covalente con la adición de reactivos bifuncionales que dan mayor rigidez a la estructura de la enzima.
- Una protección frente a proteasas. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.
- Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.
- Existe una alteración del microentorno de la enzima debido a la interacción de la enzima con el soporte. Por ejemplo, si una enzima sensible al oxígeno se sitúa en la superficie de un soporte cargado, la fuerza iónica efectiva en el microentorno de la enzima será muy alta y, como consecuencia, la

concentración de oxígeno disuelto será mucho menor en esa zona que en el medio de reacción. En otros casos, el soporte tiene un efecto amortiguador del pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes. Por otro lado, en las reacciones en presencia de disolventes orgánicos, la capacidad para retener agua del soporte regula la actividad de la enzima, es decir, a mayor capacidad de retención, la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

Sin embargo, existen algunos inconvenientes en la inmovilización, como la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte e incluso puede haber una pérdida parcial o total de actividad enzimática (Arroyo, 1998; Romero *et al.*, 2014).

La pérdida total de la actividad enzimática puede deberse a que;

- La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido;
- Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forma parte del centro activo o que es esencial para la actividad catalítica de la enzima;
- La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva;
- Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima (Arroyo, 1998).

Cuando la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, se puede atribuir principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno, como los siguientes:

- Efectos difusionales: la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo (la película líquida estacionaria o capa de Nernst que rodea el soporte) e interno (el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada). Para minimizar estos efectos, se puede reducir el grosor de la capa de Nernst al disminuir el tamaño del biocatalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor.
- Efectos electrostáticos entre el sustrato y el soporte. Si ambos tienen la misma carga, existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción; lo que mejora la afinidad de la enzima por el sustrato.
- Impedimentos estéricos. Si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente, lo que se puede evitar mediante una inmovilización covalente a través de un brazo espaciador enzima-soporte más largo.
- Efectos en el microentorno. La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno particular, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. Generalmente, se produce un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la reacción y, en ocasiones, aumenta el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar. Una enzima unida a un soporte cargado negativamente tendrá en su microentorno una concentración mayor de protones que en el medio de reacción, lo que la hará más activa a un pH más alcalino. La enzima sería más activa a pH más ácido si estuviera unida a un soporte cargado positivamente (Arroyo, 1998).

2.3.1 Tipos de inmovilización

Existen diferentes tipos de inmovilización, la elección del método adecuado debe considerar las condiciones de la reacción biocatalizada, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado y otros factores.

Un soporte ideal para la inmovilización debe tener un área superficial larga con alto contenido de grupos reactivos, buena estabilidad mecánica y química y buenas propiedades de flujo. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, se amplíe el intervalo de pH óptimo y se reduzcan las posibles contaminaciones microbianas. Además, el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado (Arroyo, 1998; Bezbradica, Čorović, Prodanović, Milosavić, & Knežević, 2005).

Por otro lado, el costo del soporte se traducirá en un aumento en el costo final del biocatalizador, y debe considerarse durante el diseño del biocatalizador. Se ha utilizado una gran variedad de materiales como soportes para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma (Arroyo, 1998; García-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente, & Rodrigues 2011).

Las técnicas de inmovilización de enzimas pueden ser realizadas por (Contesini *et al.*, 2013):

- La unión de la enzima a un portador prefabricado.
- El atrapamiento o encapsulación de la enzima en una red polimérica tridimensional formada *in situ*.

- Las metodologías de portadores libres que se basan en el entrecruzamiento de cristales de enzima (CLEC) o agregados enzimáticos (CLEAs) con reactivos bifuncionales para producir macropartículas.

2.3.1.1 Adsorción

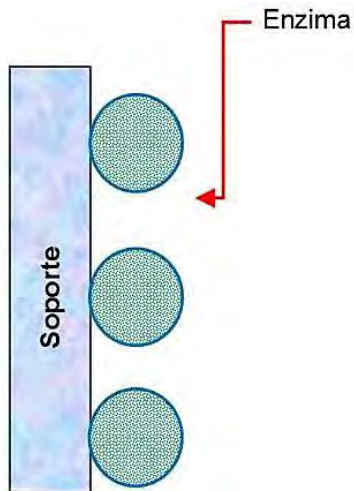


Figura B. Inmovilización por adsorción (Romero, 2014).

Se basa en la formación de enlaces débiles entre la enzima y el soporte, intervienen fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Ver Figura B).

Los principales factores que influyen en este método son el pH del medio, que controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido; la fuerza iónica, que puede producir la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína; el diámetro de poro, que debe ser

aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima; y la presencia de iones, que actúan como cofactores que pueden incrementar la carga enzimática. Las ventajas de este método son su fácil preparación, su bajo costo, en ocasiones el soporte se puede recargar, y los derivados enzima-soporte de la inmovilización son estables en medios de trabajo con bajo contenido de agua. Sin embargo, debido a que la unión de la enzima al soporte es débil, se produce un enlace inestable y reversible, por lo que hay una tasa alta de fuga del biocatalizador, y sólo es posible la evaluación de la reacción por periodos cortos. Por otro lado, este método es susceptible a cambios que se producen en el ambiente, como son las modificaciones de pH, temperatura y fuerza iónica, por lo que tiene un índice de reproducibilidad bajo (Arroyo, 1998; Datta, Christena, & Sriramulu, 2013; Romero *et al.*, 2014).

2.3.1.2 Atrapamiento

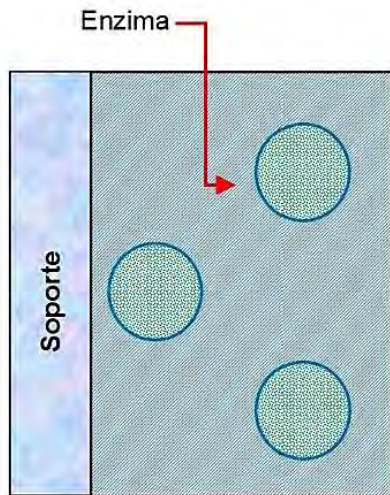


Figura C. Inmovilización por atrapamiento (Romero, 2014).

Consiste en la retención física de la enzima, por unión covalente o no, en el interior de una matriz sólida porosa, ya sean geles o fibras (Ver Figura C).

El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del soporte. Posteriormente, se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. En los geles, la enzima queda atrapada en el interior, mientras que en las fibras, la enzima se encuentra ocluida dentro de microcavidades. Generalmente, las fibras son más resistentes que los geles. Este

método minimiza la lixiviación de la enzima y mejora su estabilidad, además, permite adaptar el material de encapsulación para proporcionar el microambiente óptimo para su actividad. El proceso experimental es sencillo, se requiere poca cantidad de enzima, la cual no sufre ninguna alteración en su estructura. No obstante, se producen limitaciones de transporte de sustrato/analito al sitio activo de la enzima debido a su localización en el interior del soporte (Arroyo, 1998; Brady & Jordaan, 2009; Romero *et al.*, 2014).

2.3.1.3 Entrecruzamiento

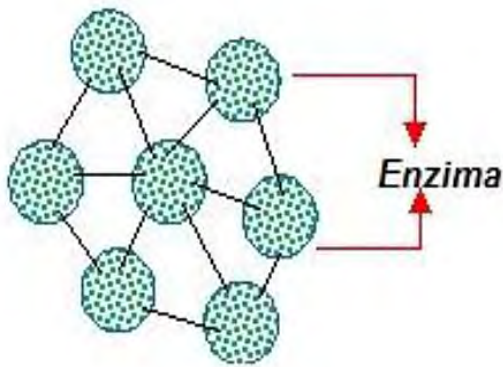


Figura D. Inmovilización por entrecruzamiento (Romero, 2014).

También denominado *cross-linking*, es un método de inmovilización sin soporte, consiste en la formación de una gran estructura tridimensional compleja entre las mismas moléculas de la enzima (Ver Figura D) por medios físicos (por medio de agentes floculantes) o químicos (por formación de enlaces covalentes).

El resultado son enlaces irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. Además, entre las principales ventajas, se puede tener una alta actividad enzimática con bajo costo, al no requerir soporte externo.

Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina de intercambio iónico o un soporte polimérico, con lo que se consigue una elevada carga enzimática y, posteriormente, se añade un reactivo bifuncional que produce el entrecruzamiento (Arroyo, 1998; Brady & Jordaan, 2009; Romero *et al.*, 2014).

Los métodos de inmovilización por entrecruzamiento pueden incluir desde la utilización de enzimas crudas hasta cristales de enzima altamente purificados.

El más simple, **CLEs (Cross-linked enzymes)**, es preparado mediante el entrecruzamiento de enzimas disueltas (Ver Figura E). Este procedimiento puede mejorar la estabilidad térmica de la enzima, pero estas preparaciones tienen algunos inconvenientes como la pérdida de actividad, estabilidad mecánica deficiente y dificultades para su manipulación debido a su naturaleza gelatinosa.

Los **CLECs** (***Cross-linked enzyme crystals***) son producidos por el entrecruzamiento de enzimas cristalizadas que para su obtención se requiere que tengan alta pureza (Ver Figura E). Este proceso tiene una mayor estabilidad térmica y mecánica y son más tolerantes a los disolventes orgánicos. Este aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera, la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria se estabiliza por las uniones covalentes intermoleculares.

Los **CLSDs** (***Cross-linked spray-dried enzymes***) son sintetizados por el entrecruzamiento de enzimas secadas por aspersión (Ver Figura E). Aunque es técnicamente posible controlar diferentes parámetros como el tamaño de partícula de la enzima, las aplicaciones son limitadas debido a la desactivación de algunas enzimas que sucede durante el proceso de secado.

Como una alternativa al método de CLECs, se desarrolló **CLEAS** (***Cross-linked enzyme aggregate***), que consiste en utilizar, en lugar de enzima pura, agregados de enzima producidos a través de la precipitación de proteína de las soluciones enzimáticas (Ver Figura E). Este método permite el uso de la enzima cruda sin necesidad de cristalizarla (Arroyo, 1998; Sukimaran *et al.*, 2016).

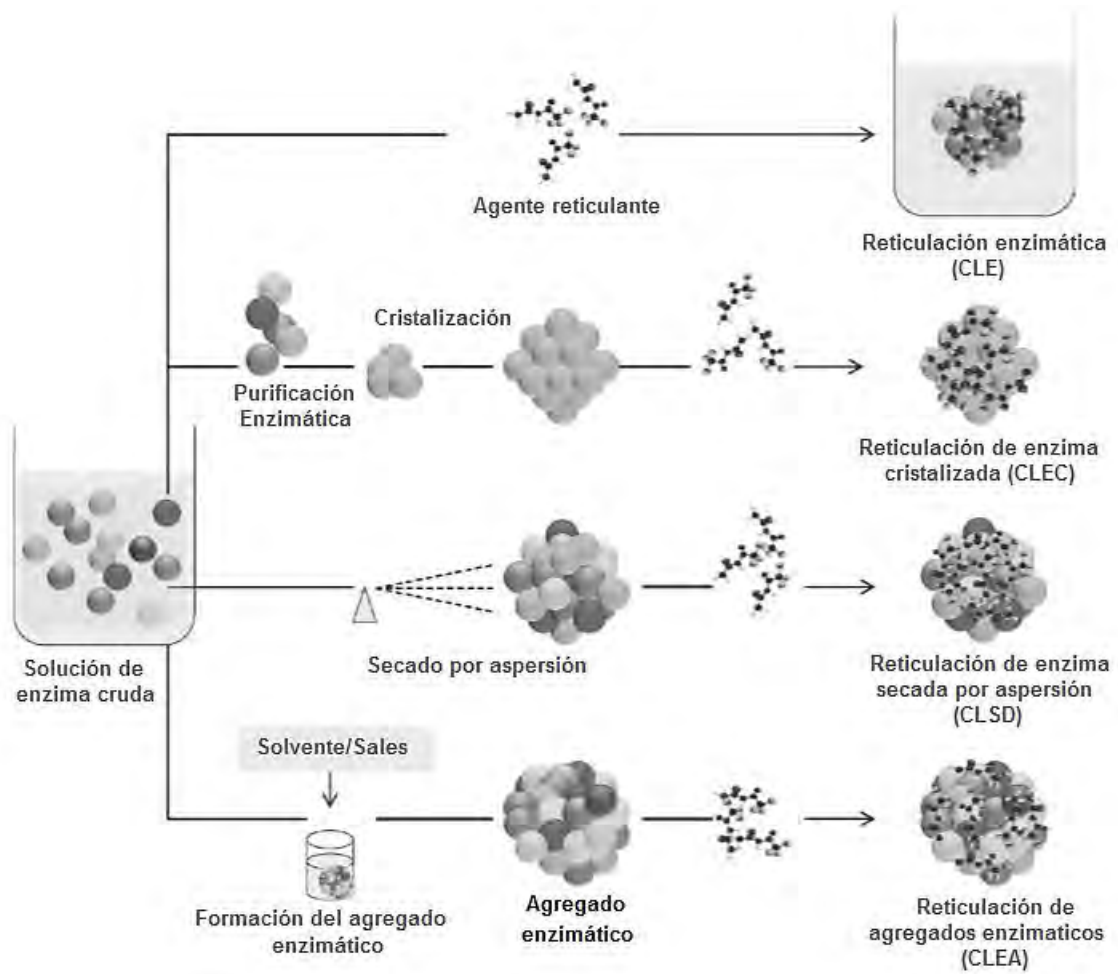


Figura E. Diferentes formas de inmovilización por entrecruzamiento (Modificada de Sukimaran et al., 2016).

2.3.1.4 Unión covalente

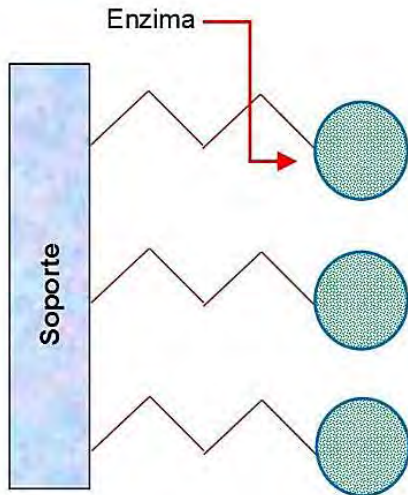


Figura F. Inmovilización por enlace covalente (Romero, 2014).

Se basa en la unión entre los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y aquellos pertenecientes a los residuos de aminoácidos en la superficie de la enzima (Ver Figura F).

De entre los 20 aminoácidos, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son la lisina, cisteína, tirosina e histidina y, en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran en la superficie proteínica, y no

pueden intervenir en la unión covalente (Romero *et al.*, 2014).

La principal ventaja de la inmovilización covalente sobre otras estrategias de inmovilización es la ausencia de una barrera entre la enzima y la reacción y, consecuentemente, la ausencia de las limitaciones de difusión. Además de que la enzima permanece con una carga constante después del proceso y presenta una mayor resistencia a la desactivación por efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, lo que permite su utilización en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado (Bezbradica *et al.*, 2005).

La inmovilización de la enzima mediante la unión a un soporte covalente es particularmente recomendable cuando la ausencia de la enzima en el producto final es un requisito estricto, como es el caso de los alimentos (Contesini *et al.*, 2013).

Por otro lado, es necesario activar la enzima o el soporte para lograr la inmovilización, debido a la baja afinidad hacia la formación de enlaces covalentes de los grupos funcionales de ambas moléculas (Bezbradica *et al.*, 2005).

El procedimiento experimental requiere dos pasos: el primero es la activación del material de soporte que se lleva a cabo por la adición de un compuesto reactivo; y el segundo es la modificación del esqueleto del polímero para activar la matriz. El paso de activación produce un grupo electrofílico en el material del soporte, de esta forma el soporte reacciona con los nucleófilos de las proteínas.

Un inconveniente es que frecuentemente implica el uso de productos químicos y/o condiciones operativas riesgosas para la actividad enzimática, características particularmente notables en los primeros portadores y métodos desarrollados, lo que ha sido superado mediante el uso de técnicas menos drásticas y soportes pre-activados.

Actualmente, se dispone de soportes comerciales pre-activados con grupos epóxido, que son matrices adecuadas para la inmovilización de enzimas a través de un proceso sencillo: una adsorción física rápida y tenue de la enzima al soporte, seguida por la unión covalente entre las moléculas de la enzima adsorbida y los grupos epóxido vecinos (Arroyo, 1998; Brady & Jordaan, 2009; Contesini *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2014).

A continuación se presenta una Tabla que compara los 4 métodos de inmovilización anteriormente expuestos (Ver Tabla B).

Tabla B. Diferentes tipos de inmovilización.

	Adsorción	Atrapa- miento	Entrecruza- miento	Unión covalente
Fundamento	Formación de enlaces débiles entre la enzima y el soporte (fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas y puentes de hidrógeno)	Inclusión de la enzima por unión covalente o no, dentro de geles o fibras	Formación de una gran estructura tridimensional compleja entre las mismas moléculas de la enzima por medios físicos o químicos	Formación de un enlace covalente entre el grupo funcional de la matriz del soporte y la superficie de la enzima que contiene residuos de aminoácidos
Ventajas	Fácil preparación, bajo costo, el soporte se puede recargar	Minimiza la lixiviación de la enzima y mejora su estabilidad	La propia enzima actúa como soporte y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares	Ausencia de las limitaciones de difusión
Desventajas	Enlace reversible, alta tasa de fuga del biocatalizador, índice de reproducibilidad bajo Susceptible a cambios en el ambiente	Limitaciones de transporte de sustrato/analito al sitio activo de la enzima	Puede provocar cambios significativos en el sitio activo de la enzima	Algunos soportes implicaban el uso de productos químicos y/o condiciones operativas que son riesgosos para la actividad enzimática
Soportes o agentes utilizados	Carboximetilcelulosa, almidón, colágeno, sefarosa modificada, resinas de intercambio iónico, sílica gel, óxido de aluminio, titanio, tierra de diatomeas, cerámica, hidroxiapatita, tanino- quitosano y tanino- sefarosa	Alginato de calcio, nanomateriales, quitosano, carragenina	Métodos químicos: glutaraldehído, ácido dicarboxílico o disocianato de tolueno Métodos físicos: poliaminas, polietilnamina, sulfonatos de poliestireno y fosfatos	Poliacrilamida, agarosa y sílica

2.3.2 Inmovilización en Eupergit®CM

El Eupergit® se desarrolló entre 1974 y 1980 por Otto Röhm, quien fue el primero en introducir tecnología enzimática hace aproximadamente 100 años en aplicaciones prácticas como curtido de cuero, detergentes para ropa y cicatrización de heridas y, alrededor de 1930, inventó el arte de polimerizar el metacrilato de metilo, conocido en la actualidad como vidrio acrílico (plexiglass). Gracias a sus investigaciones anteriores, Röhm desarrolló un soporte para la inmovilización de enzimas basado en la polimerización de metacrilato (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000).

El Eupergit®CM consiste en esferas macroporosas con diámetros de 100-250 µm que se producen por copolimerización de glicidil metacrilato, alil glicidil éter, metacrilamida y N,N'-metilen-bis-(metacrilamida). Este soporte contiene grupos epóxido como componentes reactivos los cuales permiten ligar compuestos con enlaces covalentes con moléculas que contienen grupos amino o hidroxilo (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000; Boller, Meier, & Menzler, 2002; Brady & Jordaan, 2009; Alptekin, Tukel, Yildirim & Alagoz, 2010; Uzun, Çevik, & Şenel, 2011; Braga, Silvab, Oliveirac, Treicheld & Kalil, 2014).

Los enlaces O-C y N-C formados por los grupos epóxido (Ver figura G) son extremadamente estables, por lo tanto, los polímeros que los contienen pueden ser utilizados para la inmovilización de enzimas y proteínas (Hernaiz & Crout, 2000).

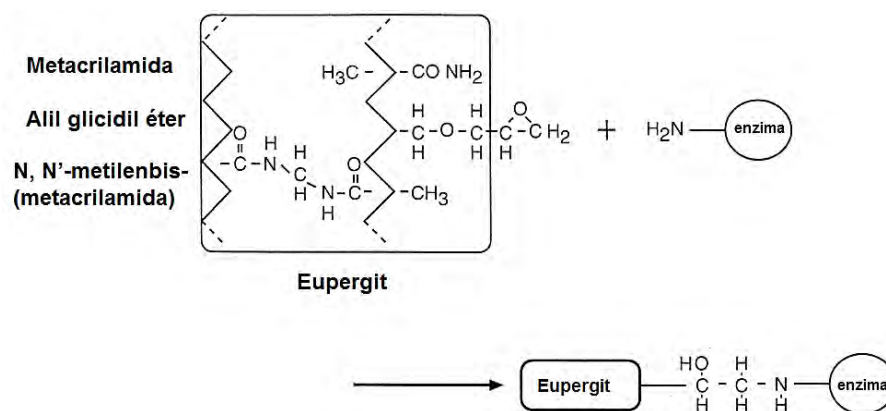


Figura G. Estructura del Eupergit® y la inmovilización de la enzima por enlace covalente (Adaptada de Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000).

Se ha demostrado que el Eupergit® ha permitido entre 15-100% de retención de actividad para un amplio intervalo de enzimas. Debido a la alta densidad de los grupos reactivos sobre la superficie de las perlas, las enzimas pueden ser inmovilizadas en varios sitios de su estructura, lo que se conoce como uniones multipuntuales, a esto se le considera un factor importante para la alta actividad operativa de las enzimas unidas al Eupergit® (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000; Brady & Jordaan, 2009). Estas esferas macroporosas han sido identificadas como uno de los soportes más adecuados para la inmovilización covalente de enzimas para aplicación industrial debido a que tienen las siguientes ventajas:

- Es un sistema casi ideal para desarrollar protocolos muy sencillos de inmovilización.
- Es extremadamente estable y tiene buenas propiedades mecánicas.
- Posee alta capacidad de formación de enlaces, baja absorción de agua y productos químicos.
- Permite un buen rendimiento al utilizarse en reactores con alta temperatura y agitación.
- Es muy estable dentro de un intervalo de pH de 0 a 14 y no se hincha ni encoge incluso después de cambios drásticos. Puede enlazar a una enzima dada en un intervalo de pH en el cual la enzima es estable sin pérdida de actividad.
- Muestra resistencia contra ataques microbianos por ser un polímero sintético.
- La unión multipuntual promueve un incremento en la estabilidad conformacional de la enzima y, por lo tanto, mejora la estabilidad del biocatalizador en operaciones a largo plazo, además, incrementa la termoestabilidad y aumenta su resistencia a la desnaturalización por disolventes orgánicos polares (Hernaiz

& Crout, 2000; Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000; Mateo, Fernández-Lorente, Abian, Fernández-Lafuente, & Guisán, 2000; Boller *et al.*, 2002; Alptekin *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2014).

La inmovilización de la enzima en este soporte es producida a través de un mecanismo de dos pasos. En el primero, se alcanza una rápida y tenue adsorción física de la enzima en el soporte. En el segundo, ocurre una reacción covalente entre la enzima adsorbida y los grupos epóxido vecinos (Braga *et al.*, 2014).

De esta manera, la inmovilización de enzimas en estas resinas es rápida y fácil tanto en el laboratorio como a escala industrial. Además, no requiere agentes adicionales o equipo especial.

Como procedimiento estándar, la enzima simplemente se disuelve en amortiguador y se mezcla con las esferas de Eupergit®, dejando reposar a una temperatura de 4°C ó 20-25°C por 12-72 horas. La enzima inmovilizada se lava con agua y amortiguador para ser usada posteriormente.

La capacidad de unión de una enzima es alrededor de 100 mg de proteína/g de Eupergit®C (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000; Boller *et al.*, 2002).

3. Objetivo

Realizar la síntesis del oligosacárido fucosil-lactosa mediante una reacción de transfucosilación de 4-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (p NP-F), que actúa como sustrato donador en presencia de lactosa (sustrato aceptor), empleando la enzima inmovilizada α -fucosidasa de *Thermotoga maritima*.

4. Hipótesis

La inmovilización de α -fucosidasa de *Thermotoga maritima* en las esferas macroporosas de Eupergit®CM, permitirá su reutilización, debido a la unión covalente que establece con dicho soporte, lo que favorecerá la reacción y aumentará el rendimiento de fucosil-lactosa con una baja cantidad de enzima.

5. Procedimiento experimental

5.1 Solución enzimática

Se preparó una solución enzimática con 100 μL de α -fucosidasa de *Thermotoga maritima* (Megazyme) y 900 μL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 0.05 M), a partir de la cual se llevó a cabo el resto de la metodología.

5.2 Inmovilización de α -fucosidasa

Se evaluaron tres procedimientos para inmovilizar la enzima.

5.2.1 Procedimiento 1

Se adicionaron 100 μL de la solución de α -fucosidasa de *Thermotoga maritima* a 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 1.5 M) y 400 mg de Eupergit®CM, manteniéndose en agitación magnética suave durante 24 horas a 4°C.

5.2.2 Procedimiento 2

Se adicionaron 100 μL de la solución de α -fucosidasa de *Thermotoga maritima* a 10 mL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 1.5 M) y 400 mg de Eupergit®CM, manteniéndose en agitación orbital a 150 rpm durante 24 horas a 25°C.

5.2.3 Procedimiento 3

Se utilizaron las mismas condiciones que en el procedimiento 2 con una modificación en el pH del amortiguador de fosfatos a pH 7.

Después de la inmovilización, las muestras fueron filtradas y lavadas con amortiguador de fosfatos (0.05 M, pH 5) para la determinación de actividad enzimática. A continuación, se almacenaron en amortiguador de fosfatos (0.05 M, pH 5) a 4°C para su posterior utilización.

5.3 Determinación de la actividad enzimática

En este caso, una unidad enzimática está definida como la cantidad de α -fucosidasa requerida para liberar 1 μ mol de *p*-Nitrofenol (*p*NP) por minuto a partir de *p*-Nitrofenil- α -L-fucopiranosido (*p*NP-F) a pH 5 y 60°C.

5.3.1 Actividad de enzima libre

La actividad enzimática de la α -fucosidasa libre se cuantificó utilizando 1 mg de *p*NP-F en 1 mL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 0.05 M) y 10 μ L de solución enzimática. Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 a una longitud de onda de 410 nm manteniendo una temperatura de 60°C, durante 15 minutos para la cuantificación del *p*NP liberado.

5.3.2 Actividad de enzima inmovilizada

La determinación de la actividad de la enzima inmovilizada se realizó utilizando 40 mg de Eupergit®CM con α -fucosidasa (4.8 U/mL) y 1 mg de *p*NP-F en 1 mL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 0.05 M); la reacción se llevó a cabo a 60°C en agitación orbital mediante un sistema adaptado con un rotavapor. Posteriormente, el líquido de la reacción fue separado del soporte con ayuda de una jeringa para insulina y se cuantificó el *p*NP liberado con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 a una longitud de onda de 410 nm cada 2 minutos durante 10 minutos.

5.4 Determinación de K_m y V_{max}

5.4.1 Enzima libre

Se cuantificó la velocidad de reacción de la α -fucosidasa libre, en 1 mL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 0.05 M) y 10 μ L de solución enzimática, utilizando diferentes concentraciones de pNP-F: 0.25 mg (0.87 mM), 0.1 mg (0.35 mM), 0.05 mg (0.17 mM), 0.03 mg (0.1 mM), 0.02 mg (0.07 mM) y 0.01 mg (0.03 mM). Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 a una longitud de onda de 410 nm manteniendo una temperatura de 60°C, cada 0.2 min durante 2 minutos para la cuantificación del pNP liberado. Posteriormente, con los datos obtenidos, se graficó el modelo de Michaelis-Menten y, a continuación, se determinó la K_m y la V_{max} con base en el modelo de Lineweaver-Burk.

5.4.2 Enzima inmovilizada

Se cuantificó la velocidad de reacción de la α -fucosidasa inmovilizada, en 1 mL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 0.05 M) y 10 μ L de solución enzimática a 60°C en agitación orbital mediante un sistema adaptado con un rotavapor, utilizando diferentes concentraciones de pNP-F: 0.25 mg (0.87 mM), 0.1 mg (0.35 mM), 0.05 mg (0.17 mM), 0.03 mg (0.1 mM), 0.02 mg (0.07 mM) y 0.01 mg (0.03 mM). Posteriormente, el líquido de la reacción fue separado del soporte con ayuda de una jeringa para insulina y se cuantificó el pNP liberado con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 a una longitud de onda de 410 nm cada 0.5 min durante 3 minutos. Posteriormente, con los datos obtenidos, se graficó el modelo de Michaelis-Menten y, a continuación, se determinó la K_m y la V_{max} con base en el modelo de Lineweaver-Burk.

5.5 Síntesis de fucosil-lactosa

5.5.1 Reacción con enzima libre

La síntesis se llevó a cabo en 1 mL de agua a pH 5 con 1 mg de pNP-F, 10 mg de lactosa y 10 µL de la solución de α-fucosidasa a 60°C durante 3 horas en agitación magnética. Los productos se cuantificaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) y espectrofotometría.

5.5.2 Reacción con enzima inmovilizada

Se realizó en 1 mL de agua a pH 5 con 1 mg de pNP-F, 10 mg de lactosa, al cual se adicionó la enzima inmovilizada en 40 mg de Eupergit®CM calentándose a 60°C durante 24 horas con agitación orbital. Los productos se cuantificaron mediante HPLC y espectrofotometría.

5.6 Identificación y cuantificación de los productos de reacción

La identificación y cuantificación del oligosacárido se llevó a cabo mediante un sistema de HPLC con detector de dispersión de luz SOFTA 300s, Kromatek, con un flujo de nitrógeno de 62.5 psi, una temperatura de nebulizador de 10°C y una temperatura de evaporación de 45°C; una bomba LAB Alliance con un flujo de 0.3 mL/min de agua desionizada como fase móvil, y una columna para monosacáridos Hamilton HC-75 a un temperatura de 75°C.

La cuantificación del pNP liberado se realizó por espectrofotometría con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 a una longitud de onda de 410 nm.

5.7 Cinética de síntesis del fucooligosacárido

5.7.1 Cinética de reacción con enzima libre

Para realizar la síntesis, se utilizó una concentración de 146 $\mu\text{mol/mL}$ de lactosa y 10.5 $\mu\text{mol/mL}$ de *p*NP-F en 2 mL de agua a pH 5, a los cuales se adicionaron 20 μL de la solución de α -fucosidasa a 60°C durante 3 horas en agitación magnética.

Se tomaron muestras de 250 μL de la reacción a los 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 min; se apartaron 100 μL para la cuantificación de productos mediante HPLC y, a partir del resto de la muestra, se hizo una dilución 1:100 para cuantificar *p*NP por espectrofotometría.

5.7.2 Cinética de reacción con enzima inmovilizada

Se utilizó una concentración de 146 $\mu\text{mol/mL}$ de lactosa y 10.5 $\mu\text{mol/mL}$ de *p*NP-F en 2 mL de agua a pH 5, a los cuales se adicionaron 80 mg de Eupergit®CM con α -fucosidasa calentando a 60°C durante 24 horas con agitación orbital.

Se tomaron muestras de 250 μL de la reacción con ayuda de una jeringa para insulina a las 3, 5, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 h; se apartaron 100 μL para la cuantificación de productos mediante HPLC y, a partir del resto de la muestra, se hizo una dilución 1:100 para cuantificar *p*NP por espectrofotometría.

5.8 Reutilización de la enzima y vida de anaquel

Se realizó una síntesis en 1 mL de agua a pH 5 con 1 mg de *p*NP-F, 10 mg de lactosa y 40 mg de Eupergit®CM con la enzima inmovilizada a 60°C durante 24 horas con agitación orbital. Al término de la reacción, las esferas fueron filtradas y lavadas con amortiguador de fosfatos (0.05 M, pH 5) para, posteriormente, realizar la determinación de la actividad enzimática, en la cual se utilizó 1 mg de *p*NP-F en 1 mL de amortiguador de fosfatos (pH 5, 0.05 M) y una temperatura de 60°C, en agitación orbital mediante un sistema adaptado con un rotavapor. A continuación, el líquido de la reacción fue separado del soporte con ayuda de una jeringa para insulina, posteriormente, se cuantificó el *p*NP liberado con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 a una longitud de onda de 410 nm cada 2 minutos durante 10 minutos. Este procedimiento se realizó 3 veces más con las mismas esferas de Eupergit®CM utilizadas inicialmente.

Las esferas restantes fueron almacenadas en amortiguador de fosfatos (0.05 M, pH 5) a 4°C y, del mismo modo, se determinó la actividad enzimática a los 7, 14, 21, 28 y 35 días.

6. Resultados y discusión

6.1 Condiciones de inmovilización

Se realizó la inmovilización de la α -fucosidasa en Eupergit®CM en amortiguador de fosfatos 1.5 M a pH 5, 4°C y agitación magnética tenue durante 24 h (Procedimiento 1). Se calculó la actividad de la fucosidasa inmovilizada utilizando 4-nitrofenil- α -L-fucopiranosido (p NP-F) como sustrato y se determinó que el rendimiento de inmovilización era muy bajo (ver Tabla 1). Las esferas de Eupergit®CM fueron observadas en el microscopio óptico, donde se reveló que la mayoría de éstas estaban rotas, por lo cual se buscó modificar las condiciones del proceso de inmovilización.

Con base en la literatura, se llevaron a cabo inmovilizaciones en amortiguador de fosfatos 1.5 M a pH 5 y pH 7 (Procedimiento 2 y 3, de manera respectiva), ambas con agitación orbital (150 rpm) a 25°C. El movimiento orbital permitió que la agitación se realizara adecuadamente sin que las esferas del soporte sufrieran daño aparente. Los rendimientos alcanzados en estas condiciones mejoraron notablemente con respecto al proceso anterior, siendo la inmovilización en pH 7 la que mostró un mejor rendimiento (ver Tabla 1).

Da Silva *et al.* (2012) informan un rendimiento de inmovilización de 85.02% para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en Eupergit®C, mientras que Brandi, D'Annibale, Galli, Gentili y Nunes (2006) reportaron un valor del 84% para la lacasa de *Trametes villosa* en el mismo soporte, por lo que se concluye que los rendimientos obtenidos para la α -fucosidasa de *Thermotoga maritima* son buenos, y que los Procedimientos 2 y 3 son eficientes para llevar a cabo la inmovilización.

Tabla 1. Rendimiento de inmovilización de fucosidasa en Eupergit®CM en las diferentes condiciones de inmovilización.

Inmovilización	V_0 ($\mu\text{mol}/\text{mL}\cdot\text{min}$)	Unidades enzimáticas ($\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\mu\text{L}$)	Rendimiento de inmovilización (%)
Procedimiento 1	0.0156	0.00125	19.6
Procedimiento 2	0.0585	0.00468	81.4
Procedimiento 3	0.0599	0.00479	89.9

6.2 Determinación K_m y V_{max} de fucosidasa libre e inmovilizada

Se determinó la velocidad de reacción a diferentes concentraciones de sustrato para la enzima libre (ver Figura 1) y la inmovilizada (ver Figura 2) para obtener el K_m de la enzima en ambas condiciones y conocer el efecto de la inmovilización de la fucosidasa en la afinidad por el sustrato.

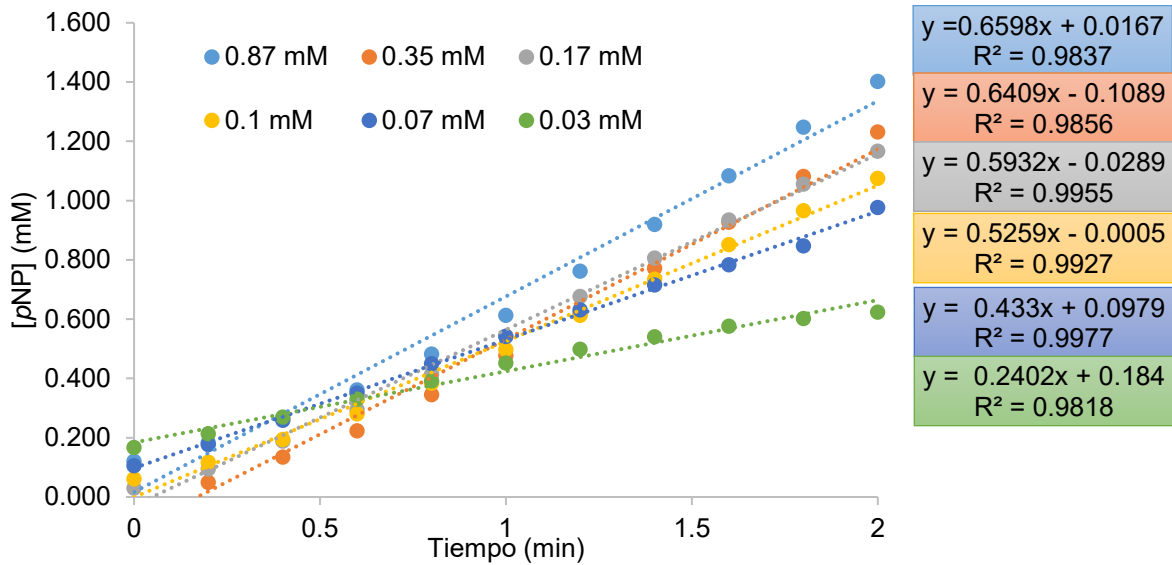


Figura 1. Velocidad de reacción de fucosidasa libre a diferentes concentraciones de pNP-F.

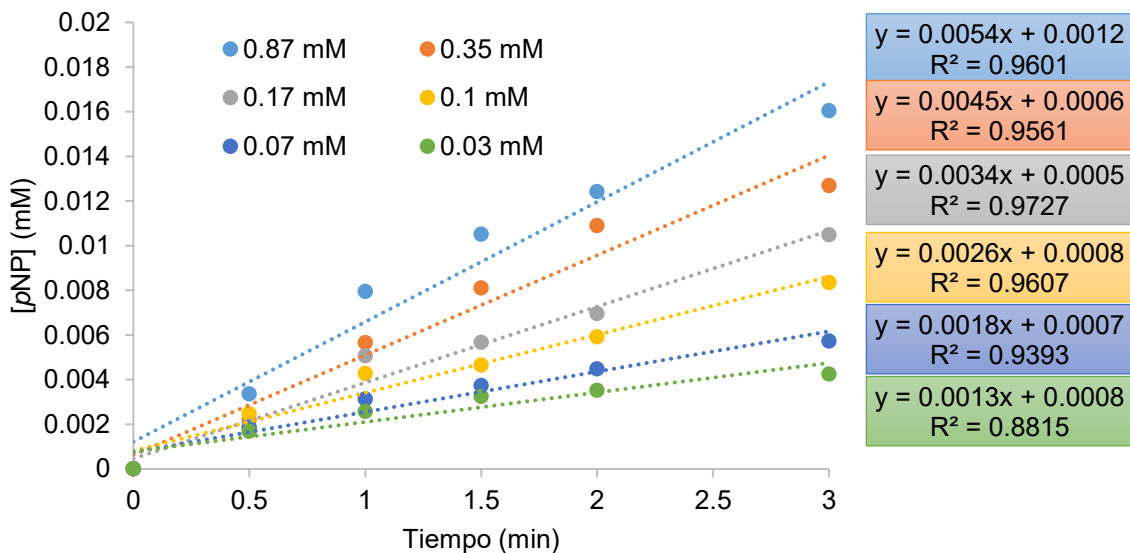


Figura 2. Velocidad de reacción de fucosidasa inmovilizada a diferentes concentraciones de pNP-F.

Con los datos obtenidos, se aplicó el modelo de Michaelis-Menten para ambas condiciones de la enzima (ver Figura 3).

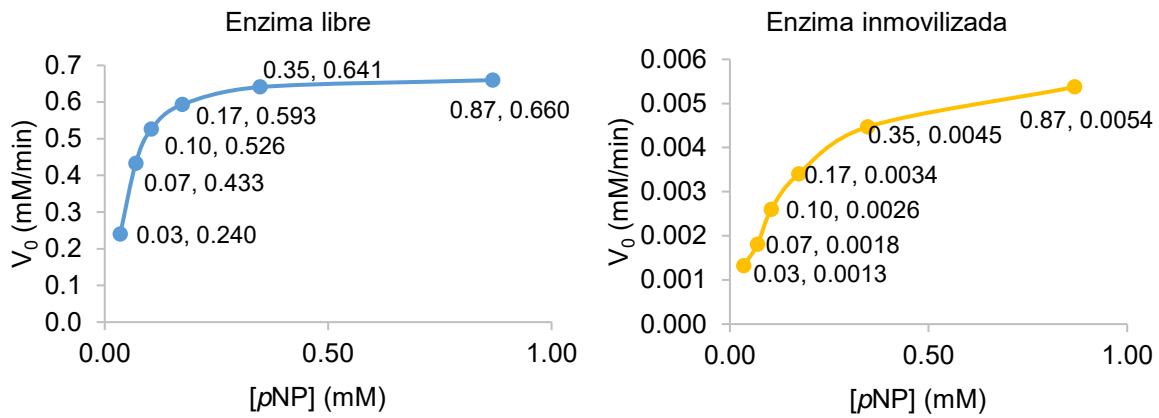


Figura 3. Representación gráfica del modelo de Michaelis-Menten.

Y, posteriormente, se graficó el inverso de la velocidad contra el inverso de la concentración de sustrato para obtener una recta según el modelo de Lineweaver-Burk y así estimar el K_m (ver Figura 4).

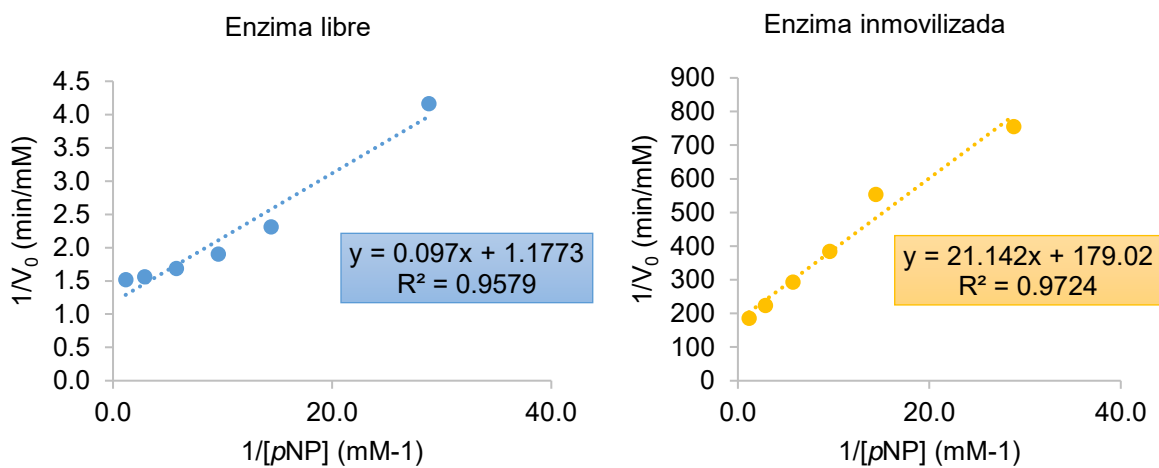


Figura 4. Representación gráfica del modelo de Lineweaver-Burk.

Tarling *et al.* (2003) reportan un valor de K_m de 0.032 mM para la α -fucosidasa de *Thermotoga maritima* en su forma silvestre a pH=5 y 60°C, mientras que el valor obtenido para la α -fucosidasa utilizada en el presente estudio es ~2.6 veces más alta (Ver Tabla 2).

Por otro lado, el valor de K_m para la enzima inmovilizada en Eupergit®CM es ~1.4 veces más grande que el valor de la fucosidasa libre, lo que concuerda con resultados anteriores sobre enzimas inmovilizadas en Eupergit®, por ejemplo, Hernaiz & Crout (2000) reportaron un aumento del valor de K_m para la β -galactosidasa de *B. circulans*, de 5 a 14.2 mM (2.84 veces más grande), después de la inmovilización, y Da Silva *et al.* (2012), por su parte, señalaron un incremento de K_m , de 30.33 a 104 mM (~3.4 veces más grande), después de la inmovilización de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. Este aumento se debió probablemente a cambios conformacionales de la enzima durante el proceso de inmovilización, los cuales resultaron en una menor posibilidad de formar el complejo enzima-sustrato o menor accesibilidad del sustrato a los sitios activos de la enzima inmovilizada.

Tabla 2. V_{max} y K_m de la enzima inmovilizada en Eupergit®CM y de la enzima libre.

	K_m (mM)	V_{max} (mM/min)
Fucosidasa libre	0.082	0.849
Fucosidasa inmovilizada	0.118	0.006

6.3 Síntesis del fucooligosacárido

Para la producción del oligosacárido fucosilado, se realizó una reacción con α -fucosidasa, que hidroliza el enlace α -(1-4) del *p*NP-F, el cual actúa como sustrato donador y transfiere la fucosa a un grupo hidroxilo disponible en la galactosa del sustrato aceptor (lactosa) para lograr la síntesis de fucosil-lactosa (Ver Figura 5).

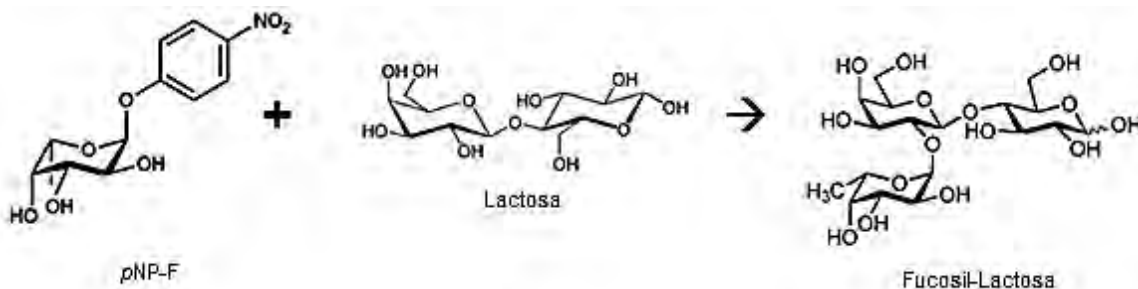


Figura 5. Síntesis de fucosil-lactosa.

6.3.1 Síntesis con enzima libre

La reacción de síntesis con la enzima libre se realizó con 1mg de *p*NP-F (3.5×10^{-6} mol) y 10 mg de lactosa (2.92×10^{-5} mol) durante 3 horas. La muestra fue inyectada en el equipo de HPLC (Ver Figura 6), donde se separaron e identificaron los picos de la enzima, lactosa, fucosa, y del oligosacárido sintetizado, por comparación con estándares puros.

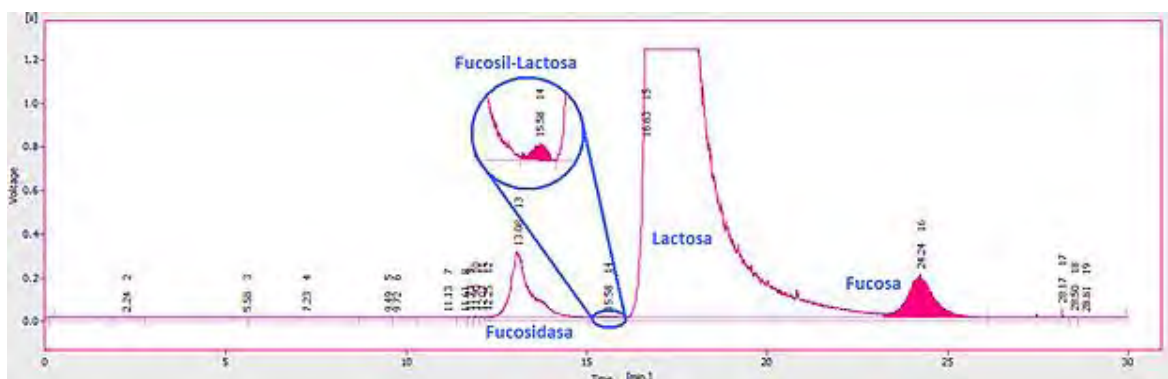


Figura 6. Reacción de síntesis con enzima libre.

6.3.2 Síntesis con enzima inmovilizada

La reacción con enzima inmovilizada también se realizó con 2.92×10^{-5} mol de lactosa y 3.5×10^{-6} mol de pNP-F y 40 mg de Eupergit®CM con α -fucosidasa durante 3 horas. La muestra fue inyectada en el equipo de HPLC, donde se observó que no se había efectuado la reacción (ver Figura 7), ya que el pico correspondiente al fucooligosacárido de interés no pudo apreciarse.

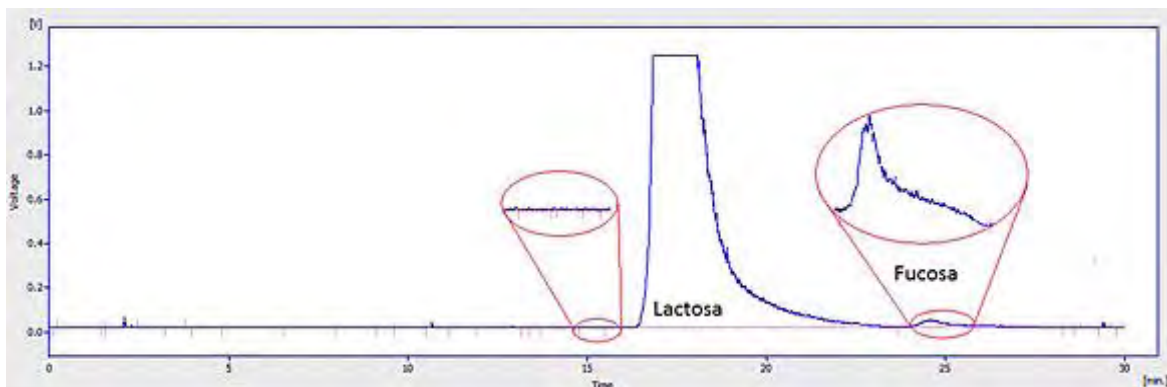


Figura 7. Reacción de síntesis de 3 horas con enzima inmovilizada en Eupergit®CM.

Con dicho resultado, se consideró que el tiempo designado no fue suficiente para la hidrólisis completa del sustrato ni para la reacción de síntesis. De acuerdo con esto, se repitió el procedimiento dejando la reacción durante 4, 8 y 24 horas, siendo la última donde sí se logró producir el fucooligosacárido, como se muestra en la Figura 8.

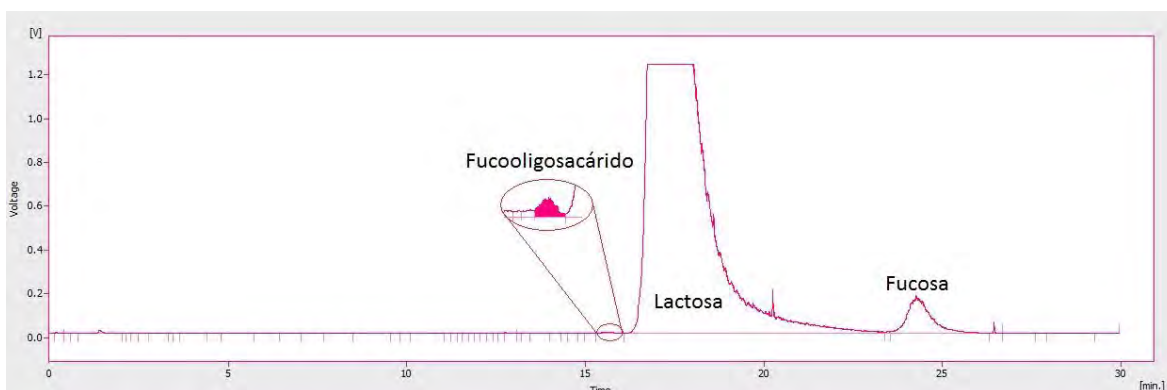


Figura 8. Reacción de síntesis de 24 horas con enzima inmovilizada en Eupergit®CM.

Al comparar los resultados obtenidos con los de la reacción efectuada con enzima libre (ver Figura 9) y cuantificar la concentración de cada producto (ver Tabla 3), se observó que la reacción de 24 horas con la enzima inmovilizada en Eupergit®CM lograba resultados similares a la síntesis de 3 horas.

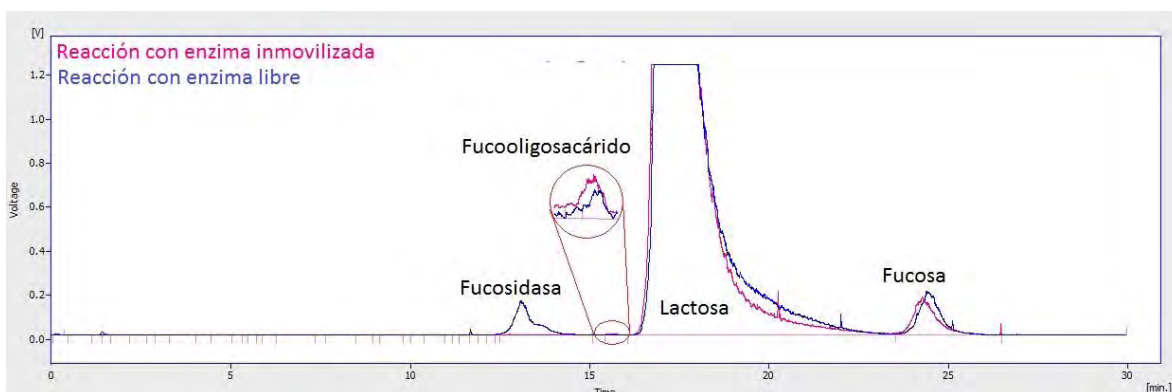


Figura 9. Reacción de síntesis de 24 horas con enzima inmovilizada en Eupergit®CM y reacción de síntesis de 3 horas con enzima libre.

Tabla 3. Concentraciones de pNP, fucosa y fucosil-lactosa obtenidas en las reacciones de síntesis con la enzima libre (3 h) y la inmovilizada en Eupergit®CM (24 h).

Concentración de productos	pNP (µmol/mL)	Fucosa (µmol/mL)	Fucosil-lactosa (µmol/mL)
Enzima libre (3 horas)	3.32	3.15	0.160
Enzima inmovilizada en Eupergit®CM (24 horas)	3.45	3.77	0.168
Concentración de sustratos: 29.2 µmol/mL lactosa, 3.5 µmol/mL pNP-F			

6.4 Efecto de la concentración de sustratos en la síntesis del oligosacárido

Se aumentó la concentración de lactosa, de 10 mg/mL (29.2 $\mu\text{mol/ml}$) a 50 mg/mL (146 $\mu\text{mol/mL}$), de *p*NP-F, de 1 mg/mL (3.5 $\mu\text{mol/mL}$) a 3 mg/mL (10.5 $\mu\text{mol/mL}$), en la reacción con fucosidasa libre y fucosidasa inmovilizada para conocer el efecto de cada uno de los sustratos sobre la síntesis del oligosacárido fucosilado y, así, determinar las condiciones más favorables para su producción.

6.4.1 Efecto de la concentración del sustrato aceptor

Como se muestra en la Figura 10, al aumentar 5 veces la concentración del sustrato aceptor (lactosa), se observó un incremento considerable en el pico correspondiente al oligosacárido, ya que su concentración aumenta más de 6 veces el valor obtenido en la reacción con 10 mg de lactosa; esto significa que la presencia de lactosa en mayor cantidad favorece la síntesis de fucosil-lactosa, de tal manera que la fucosa total teórica (3.5 $\mu\text{mol/mL}$) utilizada por la enzima para producir el fucooligosacárido aumenta de 6 a 41% con la enzima libre, y de 6 a 39% con la enzima enlazada en Eupergit®CM (ver Tabla 4).

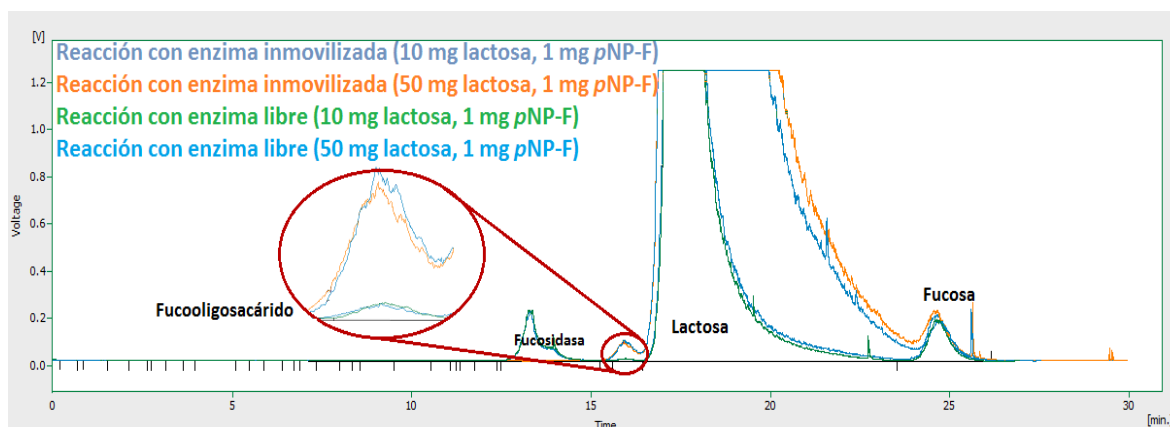


Figura 10. Efecto de la concentración de lactosa en la reacción de síntesis con enzima libre e inmovilizada.

Tabla 4. Concentración de sustratos y productos.

	Lactosa (μmol/mL)	pNP-F (μmol/mL)	Fucosil-lactosa (μmol/mL)	Concentración de fucosa teórica en oligosacárido (%)*
Enzima libre	29.2	3.5	0.22	6%
Enzima inmovilizada	29.2	3.5	0.21	6%
Enzima libre	146	3.5	1.42	41%
Enzima inmovilizada	146	3.5	1.36	39%

*Con respecto a la concentración teórica de pNP-F (3.5 μmol/mL)

6.4.2 Efecto de la concentración del sustrato donador

Al incrementar la concentración del sustrato donador también aumentó la concentración de fucosil-lactosa (ver Figura 11), sin embargo, el resultado fue menor que el obtenido al aumentar el sustrato aceptor, ya que al adicionar 3 mg/mL (10.5 μmol/mL) de pNP-F a la reacción, la concentración del oligosacárido aumenta sólo el doble, y la fucosa total utilizada para la síntesis disminuye de 6 al 4% (ver Tabla 5); lo que indica que estas condiciones favorecen más la reacción de hidrólisis que la de síntesis.

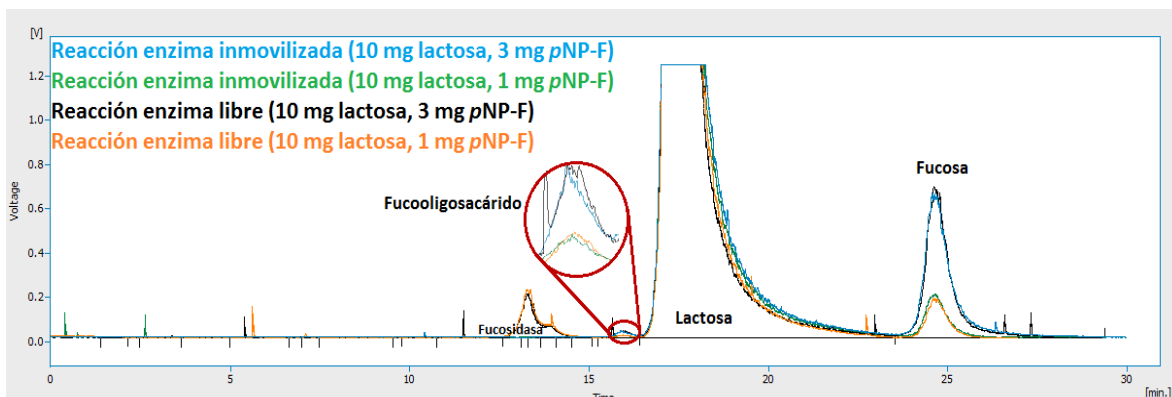


Figura 11. Efecto de la concentración de pNP-F en la reacción de síntesis con enzima libre e inmovilizada.

Tabla 5. Concentración de sustratos y productos.

	Lactosa (μmol/mL)	pNP-F (μmol/mL)	Fucosil-lactosa (μmol/mL)	Concentración de fucosa teórica en oligosacárido (%)*
Enzima libre	29.2	3.5	0.21	6%
Enzima inmovilizada	29.2	3.5	0.22	6%
Enzima libre	29.2	10.5	0.45	4%
Enzima inmovilizada	29.2	10.5	0.47	4%

*Con respecto a la concentración teórica de pNP-F (3.5 y 10.5 μmol/mL)

6.4.3 Efecto de la concentración de ambos sustratos

Posteriormente, se llevó a cabo una reacción aumentando la concentración de ambos sustratos al mismo tiempo (ver Figura 12), lo que permitió la obtención de fucosil-lactosa con una concentración 16-17 veces mayor que la obtenida en la reacción inicial, con 10 mg de lactosa y 1 mg pNP-F (ver Tabla 6).

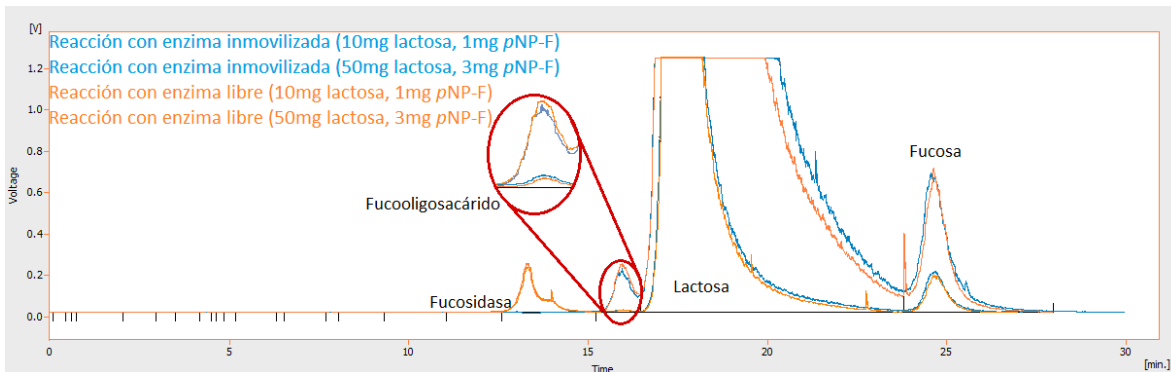


Figura 12. Efecto de la concentración de lactosa y pNP-F en la reacción de síntesis con enzima libre e inmovilizada.

Tabla 6. Concentración de sustratos y productos.

	Lactosa ($\mu\text{mol/mL}$)	pNP-F ($\mu\text{mol/mL}$)	Fucosil-lactosa ($\mu\text{mol/mL}$)	Concentración de fucosa en oligosacárido (%)*
Enzima libre	29.2	3.5	0.21	6%
Enzima inmovilizada	29.2	3.5	0.22	6%
Enzima libre	146	10.5	3.9	37%
Enzima inmovilizada	146	10.5	3.4	32%

*Con respecto a la concentración teórica de pNP-F (3.5 y 10.5 $\mu\text{mol/mL}$)

Finalmente, se concluye que la concentración de los sustratos que favorece más la síntesis del oligosacárido es 146 μmol de lactosa y 10.5 μmol de pNP-F, debido a que con estas condiciones la reacción presentó concentraciones más altas de oligosacárido fucosilado.

6.5 Cinética de síntesis de fucooligosacárido

Debido a que la reacción con 146 μmol de lactosa y 10.5 μmol de pNP-F presentó la mayor concentración de oligosacárido sintetizado, se utilizaron estas condiciones para determinar la cinética de la reacción con la enzima libre y con la enzima inmovilizada, a fin de conocer el comportamiento de la fucosidasa y la variación de sustratos y productos a diferentes tiempos de reacción, de tal manera que se tomaron 8 muestras en cada caso.

6.5.1 Cinética con la enzima libre

Se recolectaron muestras cada 25 minutos durante 200 minutos y fueron inyectadas en el equipo de HPLC. Los cromatogramas obtenidos mostraron el aumento gradual de la concentración del oligosacárido (Ver Figura 13).

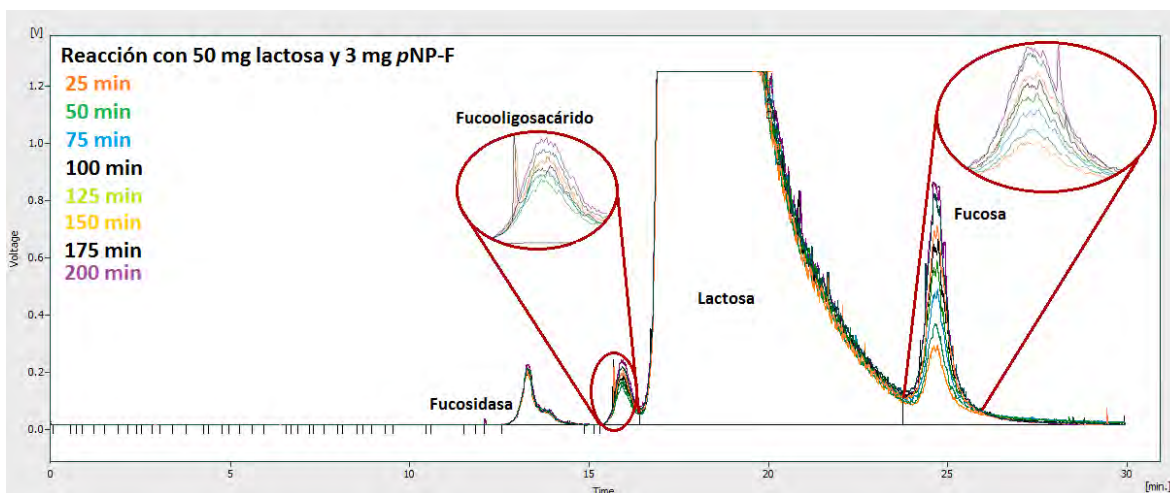


Figura 13. Cinética de síntesis del fucooligosacárido con enzima libre.

Se calculó la concentración de pNP liberado y la del fucooligosacárido. Se observó que se produce una mayor cantidad del oligosacárido durante los primeros 25 min, posteriormente, el incremento en la concentración es menor (Ver Figura 14).

Asimismo, se determinó que la velocidad de formación del oligosacárido fucosilado es de 0.039 $\mu\text{mol}/\text{min}$ y que la velocidad de hidrólisis del pNP-F es de 0.089 $\mu\text{mol}/\text{min}$ (ver Figura 14).

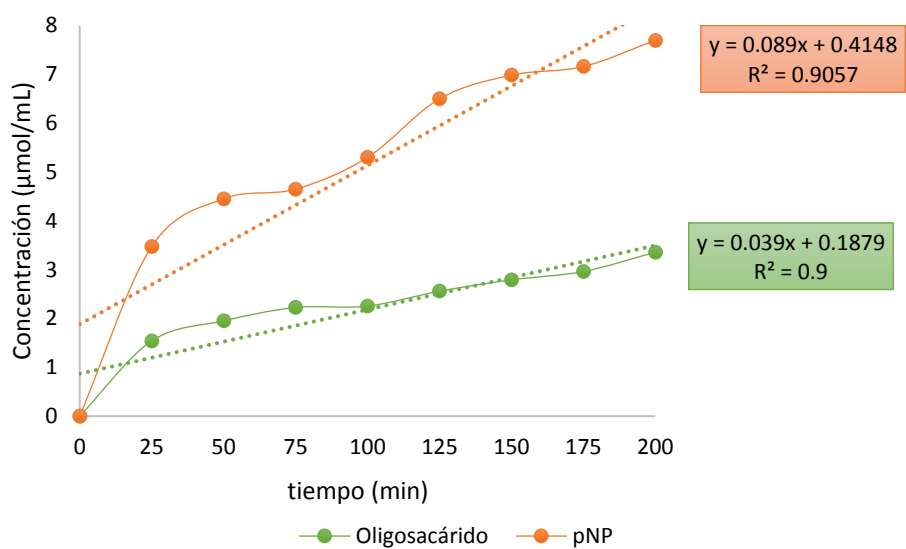


Figura 14. Cinética de reacción con enzima libre.

6.5.2 Cinética con la enzima inmovilizada

Las muestras fueron tomadas cada 3 horas durante 24 horas (ver Figura 15); se observó el aumento progresivo de la síntesis de fucosil-lactosa hasta las 15 horas, después de este tiempo, la concentración del oligosacárido aumenta muy poco; e incluso, como se observa en la Figura 16, parece constante.

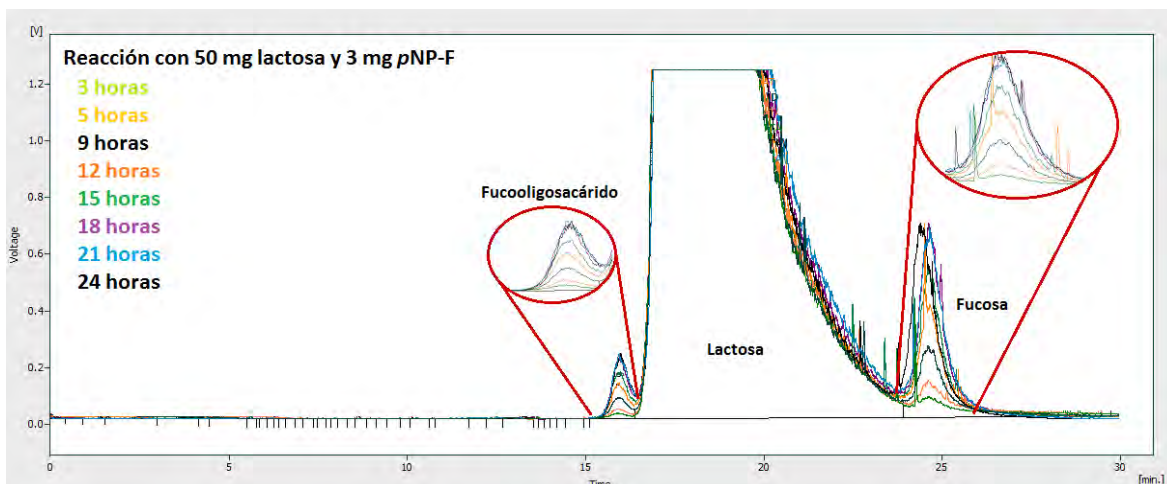


Figura 15. Cinética de síntesis del fucooligosacárido con enzima inmovilizada en Eupergit®CM.

Con lo anterior, se determinó la velocidad de hidrólisis del pNP-F y la velocidad de síntesis de fucosil-lactosa (ver Figura 16). La velocidad de formación del oligosacárido fucosilado es de 0.2071 $\mu\text{mol/hora}$ (0.0035 $\mu\text{mol/min}$), mientras que la velocidad de hidrólisis del pNP-F es de 0.4806 $\mu\text{mol/hora}$ (0.0080 $\mu\text{mol/min}$).

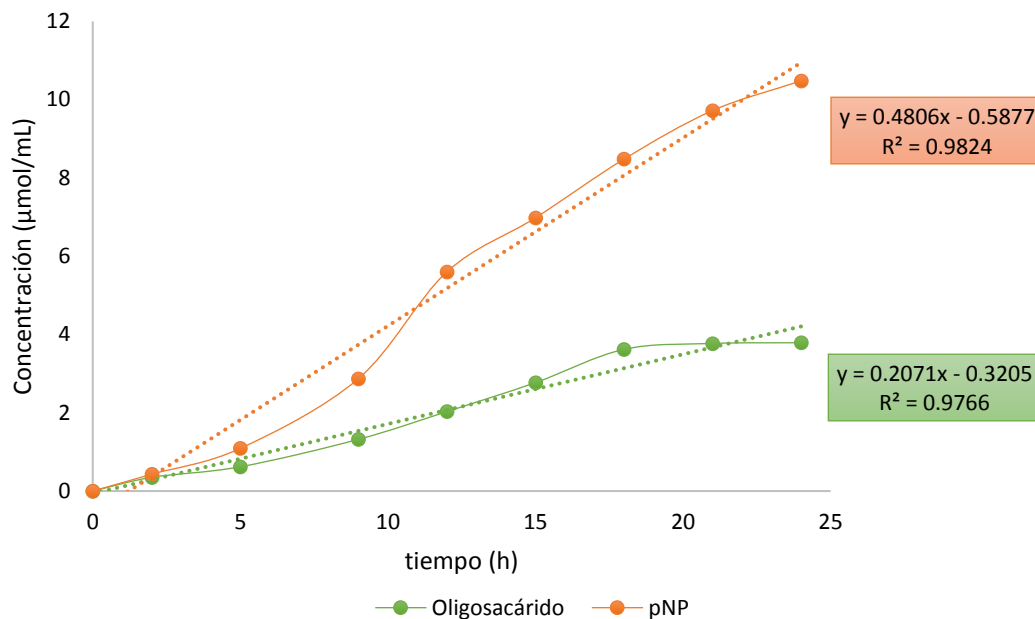


Figura 16. Cinética de reacción con enzima inmovilizada en Eupergit®CM

En general, las velocidades de reacción fueron 4 veces menores para la enzima inmovilizada en comparación con la enzima libre, lo que se debe probablemente a que la inmovilización de la enzima provoca dificultades en la difusión del sustrato al sitio activo del catalizador, hecho que puede ser atribuido a una alteración de la estructura tridimensional de la fucosidasa o a una desactivación parcial de la enzima debido a una interacción entre los grupos oxirano presentes en el Eupergit®CM y el sitio activo, como se ha informado para la β -glucosidasa (Tu *et al.*, 2006) y para la β -galactosidasa (Hernaiz & Crout, 2000).

6.6 Reutilización de la enzima y vida de anaquel

La enzima inmovilizada se reutilizó 4 veces en reacciones de síntesis y se calculó su actividad residual después de cada reacción. De acuerdo con la Figura 17, después de 4 veces de ser reutilizada, la enzima en Eupergit®CM disminuye su actividad hasta un 43%. Esto puede deberse a un desprendimiento de la fucosidasa del soporte debido a las condiciones de reacción o incluso a una modificación física en el soporte que provoca la pérdida de la enzima, ya que a pesar de que en la literatura se reporta que el soporte es muy estable, se debe considerar que la reacción de síntesis del oligosacárido se lleva a cabo en un tiempo más prolongado (24 h) y a una temperatura más elevada (60 °C) en comparación con las condiciones generalmente utilizadas en enzimas inmovilizadas en Eupergit®. Por ejemplo, Alptekin *et al.* (2010) emplearon una temperatura de 25°C y un tiempo de reacción máximo de 82 min para la catalasa de hígado bovino; por su parte, Tu *et al.* (2006) reportaron condiciones de reacción de 50°C y 30 min para la β -glucosidasa de *Aspergillus niger*; Bezbradica *et al.* (2005), 37°C y 3 h para la lipasa de *Candida rugosa*; Braga *et al.* (2014), 10°C y 120 min para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus*; Da Silva *et al.* (2012), 40°C y 60 min para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*; y Brandi *et al.* (2006), 25°C y 24 h para la lacasa de *Trametes villosa*.

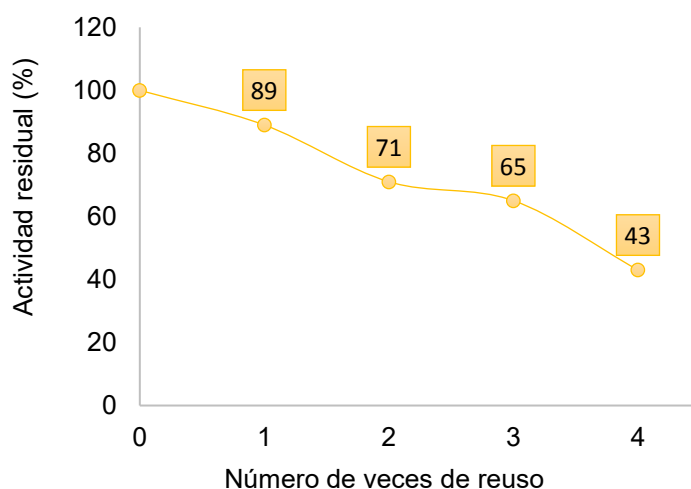


Figura 17. Reutilización de la enzima inmovilizada en Eupergit®CM

Para conocer la vida de anaquel, la fucosidasa inmovilizada y la libre fueron almacenadas a 4°C en amortiguador de fosfatos a pH 7 y se calculó su actividad residual en estas condiciones durante 35 días.

Como se muestra en la Figura 18, la actividad residual de la enzima libre se reduce muy poco durante este tiempo, de manera que en la última medición cuenta aún con el 92.3% de su actividad inicial.

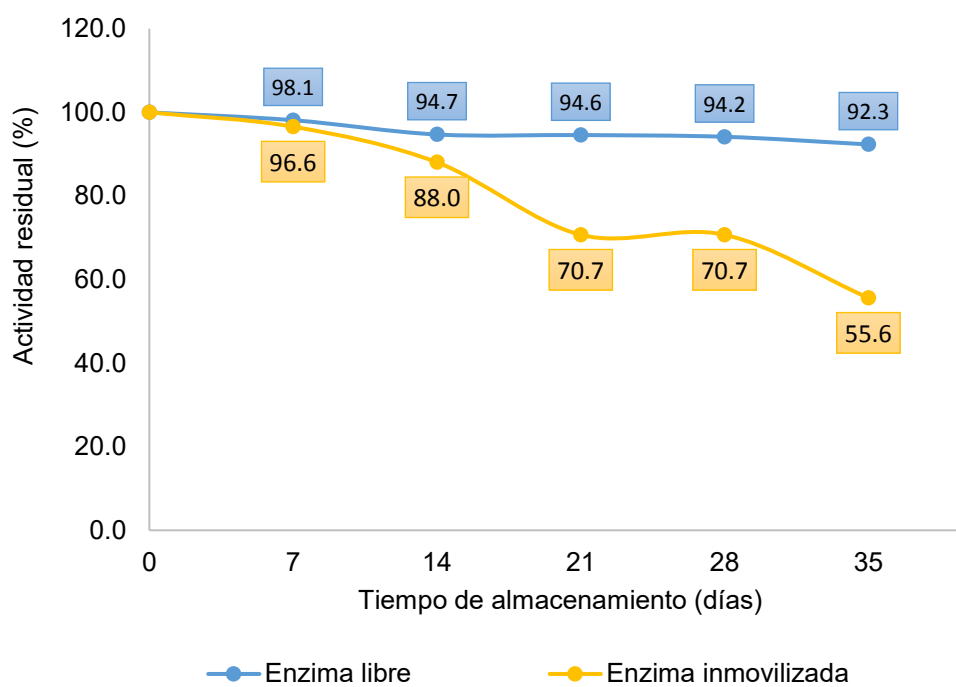


Figura 18. Vida de anaquel de la fucosidasa inmovilizada y libre

Sin embargo, después de los 35 días de almacenamiento, hay una reducción de casi la mitad de la actividad de la enzima en Eupergit®CM (55.6%), lo cual representa una pérdida importante en comparación con otros resultados. En el caso de Hernaiz y Crout (2000), se reporta que la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* sólo pierde el 4% de su actividad después de 4 meses de almacenamiento y la catalasa de hígado bovino mantenía el 68% de su actividad inicial después de 28 días a partir de la

inmovilización (Alptekin *et al.*, 2010), aunque Braga *et al.* (2014) indicaron una pérdida del 50% para la β -galactosidasa de *Kluyveromyces marxianus* después del quinto uso.

Finalmente, se considera que se cumple la hipótesis propuesta, ya que se logró producir mayor cantidad de fucosil-lactosa con menor cantidad de α -fucosidasa de *Thermotoga marítima*, debido a que el proceso de inmovilización permite que se reutilice gracias a la unión establecida con el Eupergit®CM de acuerdo con las propiedades de dicho soporte reportadas por diferentes autores como Katchalski-Katzir y Kraemer (2000), Mateo *et al.* (2000) y Braga *et al.* (2014), por mencionar algunos.

7. Conclusiones

-Se consiguió la inmovilización de la enzima α -fucosidasa en Eupergit®CM alcanzando un rendimiento de inmovilización de 89.9%.

-Se logró la síntesis del oligosacárido fucosilado con la enzima inmovilizada.

-Se obtuvieron los valores de K_m para la enzima libre (0.082 mM) y para la enzima inmovilizada (0.118 mM) y se comprobó que la inmovilización causa dificultades en la difusión del sustrato al sitio activo de la enzima, lo que conduce a un tiempo de reacción prolongado.

-Se estableció que el tiempo de reacción para obtener resultados similares a la enzima libre es de 18 h.

-La síntesis del oligosacárido fucosilado se favorece a concentraciones altas de lactosa (sustrato aceptor) y de pNP-F (sustrato donador), aunque en menor grado en este último caso, debido a que se favorece más la reacción de hidrólisis.

- La enzima inmovilizada se logró reutilizar 4 veces, sin embargo, su actividad disminuye a un 43% con respecto a su actividad inicial.

-La actividad residual de la enzima libre se reduce a 92% durante su almacenamiento por 35 días, mientras que la de la enzima inmovilizada disminuye a un 55.6% durante el mismo periodo en las mismas condiciones.

8. Bibliografía

1. Albermann, C., Piepersberg, W., & Wehmeier, U. F. (2001). Synthesis of the milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydrate Research*, 334(2):97–103.
2. Alptekin, O., Tukul, S. S., Yıldırım, D., & Alagoz, D. (2010). Immobilization of catalase onto Eupergit®C and its characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4):177–183.
3. Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Universidad Complutense de Madrid. *Ars Pharmaceutica*, 39(2):23-39.
4. Ashida, H., Miyake, A., Kiyohara, M., Wada, J., Yoshida, E., Kumagai, H., Katayama, T., & Yamamoto, K. (2009). Two distinct α -L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates. *Glycobiology*, 19(9):1010–1017.
5. Bankova, E., Bakalova, N., Petrova, S., & Kolev, D. (2006) Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides and Alkylglycosides in Water-Organic Media Via Transglycosylation of Lactose. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(3):114-119.
6. Bartolozzi, A., & Seeberger, P. (2001). New approaches to the chemical synthesis of bioactive oligosaccharides. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5):587–592.
7. Becerra, J. (2016). Síntesis de fucosil-oligosacáridos, evaluación de sus propiedades bioactivas y caracterización de sus rutas metabólicas en *Lactobacillus*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.
8. Bezbradica, D. I., Čorović, J. J., Prodanović, R. M., Milosavić, N. B., & Knežević, Z. D. (2005). Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit®. *Acta periodica tecnológica*, 36, 179-186.
9. Bode, L. (2012). Human Milk Oligosaccharides: Every Baby needs a Sugar Mama. *Glycobiology*, 22(9): 1147-1162.

10. Boller, T., Meier, C., & Menzler, S. (2002). EUPERGIT Oxirane Acrylic Beads: How to Make Enzymes Fit for Biocatalysis. *Organic Process Research & Development*, 6(4):509-519.
11. Brady, D., & Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol Lett*, 31:1639–1650.
12. Braga, A. R. C., Silva, M. F., Oliveira, J. V., Treichel, H., & Kalil, S. J. (2014). A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on Eupergit®C: structural, kinetic, and thermal characterization. *Quim. Nova*, 37(5): 796-803.
13. Brandi, P., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., & Nunes, P. A. S. (2006). In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(1-2):61–69.
14. Da Silva C., G., Aguirre T., R., Vieira R., T., Fernandes de Medeiros B., J., & Veiga B., C., (2012). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit®C and Properties of the Biocatalyst. *International Journal of Food Engineering*, 8(3):1-24.
15. Cervantes, L. (2006). Caracterización de receptores análogos para *Campylobacter jejuni* presentes en leche materna. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México.
16. Sukumaran, R. K. *et al.* (2016). *Enzyme Technologies: Current and Emerging Technologies for Development of Novel Enzyme Catalysis*. In M. Chandrasekaran (Ed.), *Enzymes in food and beverage processing* (pp.39-66). Boca Raton. Florida: CRC Press.
17. Chaturvedi, P., Warren, C. D., Altaye, M., Morrow, A. L., Ruiz-Palacios, G., Pickering, L. K., & Newburg, D. (2001a). Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*, 11(5):365-372.
18. Chaturvedi, P., Warren, C. D., Buescher, C. R., Pickering, L. K., & Newburg, D. S. (2001b). Survival of Human Milk Oligosaccharides in the Intestine of Infants. *Adv Exp Med Biol*, 501:315-323.

19. Conners S. B., Mongodin E. F., Johnson M. R., Montero C. I., Nelson K. E., & Kelly R. M. (2006). Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species. *FEMS Microbiol. Rev. Nov.*, 30(6):872-905.
20. Contesini, F. J., de Alencar F., J., Kawaguti, H., Y., de Barros F., P. C., de Oliveira C., P., Graça N., M., & Sato, H. H. (2013). Potential Applications of Carbohydrases Immobilization in the Food Industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1):1335-1369.
21. Datta, S., Christena, L. R., & Sriramulu R., Y. R. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1):1-9.
22. Elnashar, M. M. (2010). Review Article: Immobilized molecules using Biomaterials and Nanobiotechnology. *Journal of biomaterials an nanobiotechnology*, 1(1):61-77.
23. Encinas, L. (2008). Desarrollo de nuevos métodos para la síntesis en disolución de oligosacáridos empleando reactivos soportados y químicamente etiquetados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma De Madrid.
24. Escamilla, Y. (2016). Estudio de fucosidasas microbianas y su aplicación en la síntesis de oligosacáridos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
25. García-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353(16):2885-2904.
26. Han, N.S., Kim, T., J., Park, Y., C., Kim, J., & Seo, J. H. (2012). Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 30(6):1268–1278.
27. Hancock S., M., Vaughan M., D., & Withers S., G., (2006) Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(5):509–519
28. Hernaiz, M. J., & Crout, D. H. (2000). Immobilization/stabilization on Eupergit C of the β -galactosidase from *B. circulans* and an α -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1-2):26–32.

29. Katchalski-Katzir, E. & Kraemer, D. M. (2000). Eupergit®C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10(1-3):157–176.
30. Maitin, V., & Rastall, R. A. (2013). Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides: Progress and Recent Trends. In G. P. Kalidas Shetty, Anthony Pometto & Robert E. Levin (Eds.), *Functional Foods and Biotechnology*, (pp. 473-500). N.Y.: CRC Press.
31. Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2000). Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool to Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. *Biomacromolecules*, 1(4):739-745.
32. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernández-Lorente, G., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6):1451–1463.
33. Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M., D., & Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol Lett*, 25(8):623-629.
34. Miñana, V. (2007). Oligosacáridos en la leche humana. *Acta Pediátrica Española*, 65(3):129-133.
35. Murata, T., & Usui, T. (2006) Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides and Neoglycoconjugates. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(5):1049-1059.
36. Murata, T., Morimoto, S., Zeng, X., Watanabe, S., & Usui, T. (1999). Enzymatic synthesis of α -L-fucosyl-N-acetyllactosamines and 3'-O- α -L-fucosyllactose utilizing α -L-fucosidases. *Carbohydrate Research*, 320(3-4):192–199.
37. Nilsson, K. G. I. (1988). Enzymatic-Synthesis of Oligosaccharides. *Trends in Biotechnology*, 6(10): 256-264.
38. Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C., & Tellier, C. (2007). Directed Evolution of the alpha-L-fucosidase from *Thermotoga maritima* into an alpha-L-transfucosidase. *Biochemistry*, 46(4):1022-33.

39. Rastall, R. A. & Bucke, C. (1992). Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 10(1): 253-282.
40. Romero C., L., Mejía H., C., Sánchez Z., A., Balagurusamy, N. & Luévanos E., M. P. (2014). Application of Immobilized Enzymes. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(11):1-9.
41. Smilowitz, J. T., Lebrilla, C. B., Mills, D. A., German, J. B., & Freeman, S. L. (2014). Breast Milk Oligosaccharides: Structure-Function Relationships in the Neonate. *Annu Rev Nutr*, 34:143–169.
42. Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B. & Bourne, Y. (2004). Crystal Structure of *Thermotoga maritima* α -L-Fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *J. Biol Chem*, 279(13):13119–13128.
43. Tarling, C. A., He, S., Sulzenbacher, G., Bignon, C., Bourne, Y., Henrissat, B., & Withers, S. G. (2003). Identification of the catalytic nucleophile of the family 29 α -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* through trapping of a covalent glycosyl-enzyme intermediate and mutagenesis. *J Biol Chem*, 278(48): 47394-47399.
44. Tu, M., Zhang, X., Kurabi, A., Gilkes, N., Mabee, W., & Saddler, J. (2006). Immobilization of β -glucosidase on Eupergit®C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters*, 28:151–156.
45. Uzun, K., Çevik, E., & Şenel, M. (2011). Invertase Immobilization on a Metal Chelated Triazole-Functionalized Eupergit®C. *American Journal of Chemistry*, 1(1):16-21.
46. Vu, T. K. H. & Le, V. V. M. (2008). Biochemical Studies on the Immobilization of the Enzyme Invertase (EC.3.2.1.26) in Alginate Gel and its Kinetics. *ASEAN Food Journal*, 15(1):73-78.
47. Yu, Z. T., Chen, C., Kling, D. E., Liu, B., McCoy, J. M., Merighi, M., Heidtman, M., & Newburg, D. S. (2013). The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology*, 23(2):169–177.