

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Posgrado en Biotecnología

**“Efecto de iones en la actividad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de  
*Thermotoga maritima* empleada en la síntesis de  
oligosacáridos fucosilados”**

Tesis para obtener el grado académico de  
**Maestra en Biotecnología**

Presenta

**I.A. Catalina Torres Ochoa**

**Matrícula: 2223801903**

**Correo: catalina1226to@gmail.com**

Directora:

**Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero**

Asesores:

**Dr. Carlos Jiménez Pérez**

**M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz**

Jurado:

**Presidente: Dr. Salvador Ramón Tello Solís**

**Secretaria: M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz**

**Vocal: Dr. Mauricio Eduardo Pavón Chimal**

**Vocal: Dr. Emmanuel Pérez Escalante**

Iztapalapa, Ciudad de México, a 5 de noviembre de 2024

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCYT, con la referencia 001465”

Este trabajo fue realizado con apoyo del CONAHCYT (Becario 839127).

## Lista de abreviaturas

**2'FL:** 2'-Fucosil-lactosa

**3FL:** 3-Fucosil-lactosa

**3'SL:** 3'Sialil-lactosa

**6'SL:** 6'Sialil-lactosa

**AD:** *AutoDock*

**AGCC:** Ácidos grasos de cadena corta

**AlfC:**  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Lactobacillus casei*

**Arg:** Arginina

**Asn:** Asparagina

**Asp:** Ácido aspártico

**a<sub>w</sub>:** Actividad de agua

**BF3242:**  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Bacteroides fragilis* NCTC9343

**BiAfcB:**  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Bifidobacterium longum* subsp *Infantis*

**BT2970:**  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Bacteroides thetaiotaomicron*

**Cys:** Cisteína

**C $\alpha$ :** Carbono alfa

**D:A:** Relación donante/aceptor

**DM:** Dinámica molecular

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**FUC:**  $\alpha$ -L-fucosidasa

**FucOS:** Oligosacáridos fucosilados

**FUCs:**  $\alpha$ -L-fucosidasas

**FUC-Tm:**  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*

**FUC-Tm-pNP-Fuc:** Complejo entre la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* y el compuesto *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido

**FUT2:** Fucosiltransferasa 2

**FUT3:** Fucosiltransferasa 3

**FUTs:** Fucosiltransferasas

**GH:** Glicosil hidrolasas

**GH29A:** Glicosil hidrolasas familia 29A

**GH29B:** Glicosil hidrolasas familia 29B

**GlcNAc:** N-acetilglucosamina

**Gln:** Glutamina

**Glu:** Ácido glutámico  
**GOS:** Galactooligosacáridos  
**GT:** Glicosiltransferasas  
**His:** Histidina  
**HMOs:** Oligosacáridos de la leche humana  
**HPLC:** Cromatografía de líquidos de alta resolución  
**Le:** Gen *Lewis*  
**Leu:** Leucina  
**LNFP I:** Lacto-N-fucopentaosa I  
**LNFP II:** Lacto-N-fucopentaosa II  
**LNnT:** Lacto-N-neotetraosa  
**Lys:** Lisina  
**Met:** Metionina  
**MPI:** Interfaz para el uso de multiprocesadores  
**NPT:** Conjunto isotérmico-isobárico  
**NVT:** Conjunto canónico  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**ONPG:** *o*-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranosido  
**PDB:** *Protein Data Bank*  
**Phe:** Fenilalanina  
**pNP:** 4-nitrofenol  
**pNP-Fuc:** *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido  
**RCSB-PDB:** *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics- Protein Data Bank*  
**Rg:** Radio de giro  
**RMSD:** Raíz de la desviación estándar cuadrática  
**RMSF:** Raíz de la fluctuación estándar cuadrática  
**Se:** Gen Secretor  
**Ser:** Serina  
**Thr:** Treonina  
**Trp:** Triptófano  
**Tyr:** Tirosina  
**XyG:** Xiloglucano  
 **$\Delta G_u$ :** Energía libre de Gibbs de unión

## Resumen

La leche humana es el alimento fundamental para el desarrollo y crecimiento de los recién nacidos, la cual está conformada por una gran variedad de compuestos nutricionales y bioactivos, entre los que se encuentran a los oligosacáridos de la leche humana (HMOs). Esta compleja familia de carbohidratos contiene a los oligosacáridos fucosilados (FucOS) como el grupo de mayor interés, debido a que participan en numerosos y cruciales procesos fisiológicos importantes para la salud de los lactantes. En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) sobre la actividad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* (FUC-*Tm*), con el objetivo de aumentar el rendimiento de síntesis de FucOS a través de la reacción de transfucosilación. En primera instancia, se evaluó el efecto de los iones anteriormente citados en la actividad hidrolítica de FUC-*Tm*, utilizando concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , y  $\text{MnCl}_2$  de entre 0.25 y 1.5 M y concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  de 1 y 10 mM. Las concentraciones evaluadas tuvieron un incremento en la actividad hidrolítica del 173% en presencia de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 1 M, del 138% con 1 M de  $\text{MgCl}_2$  y solo del 53% con 0.75 M de  $\text{MnCl}_2$ . Por otro lado, en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  la actividad de la enzima fue inhibida empleando concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  de 1 y 10 mM. Dado que la actividad hidrolítica de la enzima fue mayor cuando se empleó  $\text{CaCl}_2$ , se decidió evaluar su efecto sobre la síntesis de FucOS, empleando como sustrato donador el compuesto *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido (*p*NP-Fuc) y lactosa como sustrato aceptor. Se obtuvo un rendimiento máximo del 55.24% con 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$  y actividad de agua ( $a_w$ ) de 0.976, asimismo, estas condiciones representaron una producción de FucOS dos veces mayor a lo obtenido en ausencia de dicho ion, indicando que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , junto con la disminución de  $a_w$  favorecieron la transfucosilación. Posteriormente, se realizó un estudio *in silico* sobre la interacción entre  $\text{Ca}^{2+}$  y FUC-*Tm* a través de una simulación de dinámica molecular (DM), tanto en ausencia como en presencia del ion. No se observaron cambios a nivel global en la estructura de la enzima, de acuerdo con los valores de la raíz de la desviación estándar cuadrática (RMSD) y el radio de giro (Rg). Sin embargo, los resultados de la raíz de la fluctuación estándar cuadrática (RMSF) revelaron que el  $\text{Ca}^{2+}$ , puede inducir un cambio en la estabilidad del bolsillo catalítico de la enzima, al disminuir la fluctuación de residuos que influyen en la cavidad del sitio activo como el Asp<sup>190</sup>, aumentando su accesibilidad para la unión con la fucosa, lo que ayuda a explicar el incremento en la actividad de la enzima al estar presente el ion. Finalmente, con la simulación de DM del complejo enzima-sustrato, se observó una diferencia en la estabilidad del complejo entre *p*NP-Fuc y FUC-*Tm* en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , reflejando una

menor energía de unión, sugiriendo la formación de un complejo enzima-sustrato más estable al estar presente el ion calcio, concordando con resultados obtenidos de forma *in vitro*.

## **Abstrac**

Human milk is the fundamental food for the development and growth of newborns, which is composed of a great variety of nutritional and bioactive compounds, among which are the human milk oligosaccharides (HMOs). This complex family of carbohydrates contains the fucosylated oligosaccharides (FucOs) as the group of greatest interest, because they participate in numerous crucial physiological processes important for the health of infants. In the present work, the effect of different ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$ ) on the activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* (FUC-*Tm*) was evaluated, with the aim of increasing the yield of FucOS synthesis through the transfucosylation reaction. In the first instance, the effect of the aforementioned ions on the hydrolytic activity of FUC-*Tm* was evaluated using  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , and  $\text{MnCl}_2$  concentrations of between 0.25 and 1.5 M and  $\text{CuSO}_4$  concentrations of 1 and 10 mM. The concentrations evaluated had an increase in hydrolytic activity of 173% in the presence of  $\text{CaCl}_2$  at 1 M concentration, 138% with 1 M  $\text{MgCl}_2$ , and only 53% with 0.75 M  $\text{MnCl}_2$ . On the other hand, in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  the enzyme activity was inhibited using  $\text{CuSO}_4$  concentrations of 1 and 10 mM. Since the hydrolytic activity of the enzyme was higher when  $\text{CaCl}_2$  was used, it was decided to evaluate its effect on the synthesis of FucOS, using *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (*p*NP-Fuc) as donor substrate and lactose as acceptor substrate. A maximum yield of 55.24% was obtained with 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  and water activity ( $a_w$ ) of 0.976, likewise, these conditions represented a FucOS production two times higher than that obtained in the absence of said ion, indicating that the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , together with the decrease in  $a_w$  favored transfucosylation. Subsequently, an *in silico* study on the interaction between  $\text{Ca}^{2+}$  and FUC-*Tm* was performed through a molecular dynamics (MD) simulation, both in the absence and presence of the ion. No changes were observed at the global level in the enzyme structure, according to the root mean square standard deviation (*RMSD*) and radius of gyration (*Rg*) values. However, the results of the root of the squared standard fluctuation (*RMSF*) revealed that  $\text{Ca}^{2+}$ , can induce a change in the stability of the enzyme catalytic pocket by decreasing the fluctuation of residues that influence the active site cavity such as Asp<sup>190</sup>, increasing its accessibility for binding to fucose, which helps to explain the increase in enzyme activity when the ion is present. Finally, with the MD simulation of the enzyme-substrate complex, a

difference in the stability of the complex between *p*NP-Fuc and FUC-*Tm* in the presence and absence of  $\text{Ca}^{2+}$  was observed, reflecting a lower binding energy, suggesting the formation of a more stable enzyme-substrate complex when calcium ion is present, agreeing with results obtained *in vitro*.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstrac</b> .....	<b>II</b>
<b>1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
2.1 Leche humana.....	3
2.1.1 Beneficios de la leche humana .....	3
2.1.2 Oligosacáridos de la leche humana (HMOs) .....	5
2.1.3 Oligosacáridos fucosilados (FucOS) .....	9
2.2 Síntesis de oligosacáridos .....	11
2.2.1 Generalidades .....	11
2.2.2 Síntesis enzimática .....	11
2.2.2.1 Transferasas .....	12
2.2.2.2 Fucosidasas .....	13
2.3 Efecto de iones en reacciones enzimáticas .....	17
2.4 $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>Thermotoga maritima</i> .....	20
2.4.1 Síntesis de Oligosacáridos fucosilados utilizando $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	22
2.5 Métodos computacionales o <i>In silico</i> .....	25
2.5.1 Modelamiento molecular .....	25
2.5.2. Acoplamiento molecular .....	26
2.5.3 Dinámica molecular (DM).....	27
2.5.4 Estudios <i>in silico</i> en fucosidasas .....	29
<b>3 Justificación</b> .....	<b>37</b>
<b>4 Hipótesis</b> .....	<b>38</b>
<b>5 Objetivos</b> .....	<b>38</b>
5.1 Objetivo general .....	38
5.2 Objetivos particulares .....	38
<b>6 Plan de trabajo</b> .....	<b>39</b>
6.1 Materiales y métodos .....	40
6.1.1 Determinación del efecto de iones bivalentes sobre la actividad hidrolítica.....	40
6.1.2 Determinación del efecto de iones bivalentes sobre la actividad de transfucosilación .....	40
6.1.3 Cuantificación de oligosacáridos .....	41
6.2 Análisis <i>in silico</i> de la interacción entre enzima y $\text{Ca}^{2+}$ .....	42
6.2.1 Dinámica molecular .....	42

6.2.2 Acoplamiento molecular .....	44
<b>7 Resultados y discusión .....</b>	<b>45</b>
7.1 Efecto de iones bivalentes en la actividad hidrolítica de la enzima .....	45
7.1.1 Efecto del calcio en la actividad hidrolítica de la enzima .....	45
7.1.2 Efecto del magnesio en la actividad hidrolítica de la enzima .....	48
7.1.3 Efecto del manganeso en la actividad hidrolítica de la enzima .....	49
7.2 Efecto de iones en la actividad de tranfucosilación de la enzima .....	52
7.2.1 Transfucosilación en presencia de calcio y magnesio .....	54
7.3 Determinación de la actividad de agua .....	60
7.4 Estudio <i>in silico</i> de la interacción del calcio con la enzima .....	62
7.4.1 Dinámica molecular (DM) .....	62
7.4.1.1 Análisis de los parámetros <i>RMSD</i> y <i>Rg</i> de las trayectorias de DM .....	62
7.4.1.2 Análisis del parámetro <i>RMSF</i> de las trayectorias de DM .....	67
7.4.1.3 Análisis de la energía cinética de las trayectorias de DM .....	79
7.4.2 Dinámica molecular del complejo FUC- <i>Tm</i> -pNP-Fuc .....	80
<b>8 Conclusiones .....</b>	<b>82</b>
<b>9 Perspectivas .....</b>	<b>83</b>
<b>10 Referencias .....</b>	<b>84</b>
<b>11. Anexo .....</b>	<b>99</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Ejemplos de diversas estructuras de HMOs.....	6
Figura 1F. Estructura química de la 2'FL .....	7
Figura 2. Mecanismo catalítico de las fucosidasas GH29 .....	14
Figura 3. Ejemplo de mecanismo de doble desplazamiento de retención de Fucosil hidrolasas GH29.....	16
Figura 4. Estructura del hexámero de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	20
Figura 5. Representación del modelo estructural de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> PDB-ID:1ODU.....	21
Figura 6 . Secuencia de aminoácidos de la $\alpha$ -L-fucosidasa de <i>T. maritima</i> .....	22
Figura 7. Pasos generales de simulación por DM. ....	28
Figura 8. Estructura de <i>AlfC</i> .....	29
Figura 9. Estructura de <i>BT2970</i> (PDB-ID: 2WVU) unida a <i>pNP-Fuc</i> .....	30
Figura 10. Estructura y dinámica del sitio activo de <i>AlfC</i> .....	31
Figura 11. <i>RMSF</i> para $C\alpha$ en BF3242 a 300 K y 350 K .....	32
Figura 12. Acoplamiento molecular entre <i>pNP-Fuc</i> y <i>FUC-Tm</i> .....	33
Figura 13. Acoplamiento molecular acumulativo con lactosa y enzima en complejo con fucosa.....	34
Figura 14. Alineamiento del sitio activo de las FUCs de las subfamilias GH29A y GH29B35	
Figura 15. Plan de trabajo.....	39
Figura 16. Cromatograma de síntesis de FucOS obtenido por <i>HPLC</i> . ....	41
Figura 17. Actividad hidrolítica de la <i>FUC-Tm</i> a diferentes concentraciones de $CaCl_2$ . ....	46
Figura 18. Actividad hidrolítica de la <i>FUC-Tm</i> a diferentes concentraciones de $MgCl_2$ . ...	49
Figura 19. Actividad hidrolítica de la <i>FUC-Tm</i> a diferentes concentraciones de $MnCl_2$ . ...	50
Figura 20. Cinética de transfucosilación control catalizada por la <i>FUC-Tm</i> .....	53
Figura 21. Cinética de transfucosilación catalizada por la <i>FUC-Tm</i> con 0.25 M de $CaCl_2$ . 54	
Figura 22. Cinética de transfucosilación catalizada por la <i>FUC-Tm</i> con 0.5 M de $CaCl_2$ . 55	
Figura 23. Cinética de transfucosilación catalizada por la <i>FUC-Tm</i> con 1 M de $CaCl_2$ . ....	55
Figura 24. Cinética de transfucosilación catalizada por la <i>FUC-Tm</i> con 1.5 M de $CaCl_2$ . 56	
Figura 25. Cinética de transfucosilación en ausencia de $MgCl_2$ (reacción control) catalizada por la <i>FUC-Tm</i> .....	57
Figura 26. Cinética de transfucosilación catalizada por la <i>FUC-Tm</i> con 0.5 M de $MgCl_2$ . 58	
Figura 27. Comparación de la desviación cuadrática media ( <i>RMSD</i> ) de las posiciones atómicas de las trayectorias de los átomos pesados (C, O y N) en la cadena de la estructura de la enzima a lo largo de los 500 ns de simulación de DM.....	63
Figura 28. Comparación del radio de giro ( <i>Rg</i> ) a lo largo de los 500 ns de simulación de DM.....	65

Figura 29. Comparación de las estructuras de FUC- <i>Tm</i> en diferentes tiempos (0.1, 181 y 303 ns de la simulación de DM. ....	66
Figura 30. Comparación de la fluctuación cuadrática media de aminoácidos (RMSF) durante la simulación de DM de 500 ns para FUC- <i>Tm</i> .....	68
Figura 31. Estructura secundaria del modelo de la FUC- <i>Tm</i> en ausencia de Ca <sup>2+</sup> .....	69
Figura 32. Estructura secundaria del modelo de la FUC- <i>Tm</i> en ausencia de Ca <sup>2+</sup> .....	70
Figura 33. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> a los 0.1 ns de la DM en el sistema en ausencia de Ca <sup>2+</sup> . ....	71
Figura 34. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> en diferentes tiempos de la DM en el sistema en ausencia de Ca <sup>2+</sup> . ....	73
Figura 35. Cambios de la cavidad del sitio activo de la estructura de FUC- <i>Tm</i> en ausencia de Ca <sup>2+</sup> a diferentes tiempos de la simulación. ....	74
Figura 36. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> en diferentes tiempos de la DM en el sistema en presencia de Ca <sup>2+</sup> . ....	76
Figura 37. Cambios de la cavidad del sitio activo de la estructura de FUC- <i>Tm</i> en presencia de Ca <sup>2+</sup> a diferentes tiempos de la simulación. ....	77
Figura 38. Comparación de la energía cinética entre el sistema FUC- <i>Tm</i> (azul) y FUC- <i>Tm</i> -Ca <sup>2+</sup> (rosa). ....	79
Figura 39. Estructura secundaria del complejo FUC- <i>Tm</i> -pNP-Fuc en el sistema en ausencia de Ca <sup>2+</sup> a 4.5 ns de simulación. ....	80
Figura 40. Estructura secundaria del complejo FUC- <i>Tm</i> -pNP-Fuc en el sistema en presencia de Ca <sup>2+</sup> a 4.5 ns de simulación. ....	81

### Índice de figuras del Anexo

Figura 1 A. Curva patrón de 4-nitrofenol (pNP) diluido en regulador de acetatos 1 mM pH 5. Esta curva fue empleada para la cuantificación de pNP liberado en la reacción de hidrólisis catalizada por FUC- <i>Tm</i> . ....	99
Figura 2 A. Curva patrón de 4-nitrofenol (pNP) diluido en regulador de acetatos 1 mM pH 10. ....	99
Figura 3 A. RMSD de FUC- <i>Tm</i> en el sistema en ausencia de Ca <sup>2+</sup> a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado. ....	100
Figura 4 A. RMSD de FUC- <i>Tm</i> en el sistema con Ca <sup>2+</sup> a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado. ....	100
Figura 5 A. Radio de giro ( <i>Rg</i> ) de FUC- <i>Tm</i> en el sistema en ausencia de Ca <sup>2+</sup> a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado. ....	101
Figura 6 A. Radio de giro ( <i>Rg</i> ) de FUC- <i>Tm</i> en el sistema con Ca <sup>2+</sup> (FUC- <i>Tm</i> -Ca <sup>2+</sup> ) a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado. ....	101
Figura 7 A. RMSF de FUC- <i>Tm</i> en el sistema en ausencia de Ca <sup>2+</sup> a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado. ....	102

Figura 8 A. <i>RMSF</i> de FUC- <i>Tm</i> en el sistema con $\text{Ca}^{2+}$ a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado.....	102
Figura 9 A. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> a los 0.1 ns de la DM en el sistema en ausencia de $\text{Ca}^{2+}$ .....	103
Figura 10 A. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> a los 130.1 ns de la DM en el sistema en ausencia de $\text{Ca}^{2+}$ .....	104
Figura 11 A. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> a los 303 ns de la DM en el sistema en ausencia de $\text{Ca}^{2+}$ .....	105
Figura 12 A. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> a los 0.1 ns de la DM en el sistema en presencia de $\text{Ca}^{2+}$ .....	106
Figura 13 A. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> a los 130.1 ns de la DM en el sistema en presencia de $\text{Ca}^{2+}$ .....	107
Figura 14 A. Estructura 3D de FUC- <i>Tm</i> a los 303 ns de la DM en el sistema en presencia de $\text{Ca}^{2+}$ .....	108
Figura 15 A. Estado de protonación de FUC- <i>Tm</i> en el sistema de reacción en presencia de $\text{Ca}^{2+}$ , resultados obtenidos del programa <i>PlayMolecule</i> .....	109

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de oligosacáridos de la leche humana.....	7
Tabla 2. Principales oligosacáridos en la leche materna.....	8
Tabla 3. Efecto de iones bivalentes sobre la síntesis de FucOS.....	59
Tabla 4. Efecto de la actividad de agua sobre la síntesis de FucOS con diferentes concentraciones de iones.....	60

## 1 Introducción

La leche humana es un biofluido, considerado como el alimento esencial de los recién nacidos, debido a que aporta los nutrientes que son imprescindibles para su desarrollo y buen crecimiento. Además, parte de sus componentes son compuestos bioactivos considerados como los responsables de los efectos beneficiosos de la misma. Entre dichos compuestos se encuentran los oligosacáridos de la leche humana (HMOs), que representan a una familia compleja y abundante de carbohidratos que no son digeribles ni fermentables por el organismo humano. Estos compuestos son sintetizados a partir de una molécula de lactosa a la cual diferentes enzimas le unen monosacáridos (glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido siálico). Asimismo, son el tercer componente sólido en mayor concentración en la leche humana por debajo de la lactosa y las grasas.

Uno de los principales tipos de HMOs que representa el grupo de mayor interés por los beneficios que se le atribuyen son los oligosacáridos fucosilados (FucOS), ya que muestran muchos efectos importantes sobre la salud infantil, por ejemplo: pueden actuar como prebióticos, moduladores de la motilidad intestinal y agentes bloqueadores de la adhesión de patógenos, ayudando a evitar infecciones entéricas (Rudloff & Kunz, 2012; Zehra *et al.*, 2018). Debido a la actividad biológica que presentan al ser consumidos, son componentes de interés para su uso en las fórmulas lácteas infantiles y como aditivos para alimentos funcionales (Krupinskaitė *et al.*, 2024).

Una alternativa para la síntesis *in vitro* de este tipo de compuestos son los métodos enzimáticos, mediante una reacción conocida como transfucosilación, la cual puede llevarse a cabo utilizando  $\alpha$ -L-fucosidasas (FUCs), que son glicosilhidrolasas (GH) con un rendimiento de síntesis dependiente de un balance entre reacciones de hidrólisis y transfucosilación (Zeuner *et al.*, 2019). En este caso, el sustrato hidrolizado por la enzima funciona como donante del grupo fucosil y un segundo sustrato, funciona como aceptor de este grupo (Palcic, 2011).

La  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* (FUC-Tm) ha sido ampliamente estudiada por su actividad de transfucosilación y capacidad para resistir condiciones adversas (Guzmán-Rodríguez *et al.* 2018c; Robles-Arias *et al.* 2021b; Pavón-Chimal *et al.* 2022a), por lo que, la investigación en torno a esta enzima y las condiciones de reacción que conducen a la síntesis de FucOS representa un campo de estudio muy importante.

Para favorecer la reacción de transfucosilación sobre la de hidrólisis empleando FUCs, se han diseñado diferentes estrategias basadas en la relación molar entre sustrato donador y aceptor, temperatura, pH, fuente de enzima, ingeniería de proteínas, actividad de agua ( $a_w$ ), entre otros (Zeuner *et al.*, 2014). De hecho, la reducción de  $a_w$  de los sistemas enzimáticos para aumentar los rendimientos de síntesis en la reacción de transfucosilación ha sido comúnmente abordada utilizando solventes orgánicos (Bridiau *et al.*, 2010; Vera *et al.*, 2017; Robles-Arias *et al.*, 2021b). Sin embargo, otra alternativa interesante para reducir la  $a_w$  es mediante la adición de sales inorgánicas, con las cuales además se ha reportado que algunos cationes juegan un papel importante en la estructura de muchas enzimas, aumentando su actividad catalítica (Vieille & Zeikus, 2001).

En diversas investigaciones en donde se han utilizado sales inorgánicas, se ha comprobado que su presencia aumenta el rendimiento de la síntesis de HMOs (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018c; Liu *et al.* 2022; Shi *et al.* 2023), sin embargo, hasta el momento no se ha reportado el mecanismo por el cual se lleva a cabo este efecto, por lo que este trabajo busca describir la forma en que interactúan los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  con la FUC-*Tm* y su relación con la síntesis de FucOS, empleando técnicas de análisis *in vitro* y modelamiento molecular *in silico* de la interacción del ion con la enzima.

## **2 Antecedentes**

### **2.1 Leche humana**

La leche humana es un biofluido, que se caracteriza por una extrema versatilidad en su composición, tanto en componentes nutricionales como bioactivos. Se considera que su composición ha evolucionado a lo largo del tiempo para brindarle al bebé una nutrición balanceada y protección contra posibles patógenos infecciosos mientras el sistema inmunitario neonatal completa su desarrollo. Las variables que afectan y determinan la constitución de la leche humana incluyen el tiempo de lactancia, duración de la gestación, enfermedades maternas, genotipo, dieta, entre otras (Mosca & Gianni, 2017).

La leche humana proporciona a los lactantes nutrientes esenciales como agua, carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales, así como moléculas bioactivas, como citoquinas, factores de crecimiento y oligosacáridos (Lyons *et al.*, 2020).

Una clasificación basada en los cambios graduales que ocurren en la leche humana según la etapa de lactancia es: calostro, leche de transición y leche madura (Andreas *et al.*, 2015).

La función protectora del calostro se ve reforzada por el contenido particularmente alto de oligosacáridos (Smilowitz *et al.*, 2014). De acuerdo con Brunser, (2019a) la concentración en la que se encuentran presentes en el calostro oscila de 20-25 g/L, mientras que en la leche madura va de 10-15 g/L (Salazar *et al.*, 2009).

#### **2.1.1 Beneficios de la leche humana**

La lactancia materna tiene beneficios a corto y largo plazo para la salud infantil, principalmente en la disminución de la mortalidad y la morbilidad resultantes de enfermedades, como infecciones gastrointestinales y del tracto respiratorio (Moubareck, 2021).

Una revisión sistemática publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2013 sugiere que la lactancia materna protege sustancialmente contra la diarrea, con una reducción del 50% en la morbilidad y del 80–90% en la mortalidad y los ingresos hospitalarios, en comparación con los lactantes con poca o ninguna lactancia materna (Moubareck, 2021).

De acuerdo con Moubareck, (2021), son numerosos los estudios que relacionan la leche humana con la protección contra enfermedades del tracto gastrointestinal. Durante las últimas dos décadas, la leche humana se ha asociado con una incidencia reducida de enterocolitis necrotizante en bebés prematuros.

Conforme a lo reportado por Yan *et al.* (2014) en una revisión de metaanálisis, la lactancia materna parece proteger significativamente contra la obesidad infantil, aunque la evidencia sobre este papel aún es controvertida y los mecanismos subyacentes aún no están claros.

Los oligosacáridos de la leche humana (HMOs) son compuestos no metabolizables por el ser humano y por la mayoría de las bacterias intestinales. Se ha demostrado que intervienen en el asentamiento, estimulación y desarrollo de la microbiota intestinal de los lactantes, actuando como prebióticos, fomentando el predominio de *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, lo que a su vez representa una ventaja de adaptación, promoviendo el desarrollo de bacterias beneficiosas mientras suprimen el crecimiento de otras bacterias enteropatógenas que causan enfermedades gastrointestinales (Arslanoglu, *et al.*, 2008, Ravindran, 2015). Un ejemplo se puede encontrar en los FucOS, los cuales se asocian con el desarrollo significativo de *Bifidobacterium longum* subsp *infantis*, bacteria con la capacidad de estimular la función de barrera de los enterocitos, además de aportar propiedades antiinflamatorias (Brunser, 2019b).

Los HMOs interactúan con los glicanos que están presentes en la superficie de las células epiteliales intestinales o con las células dendríticas que sobresalen hacia la luz intestinal. Esto da como resultado un apoyo directo a la maduración de la barrera epitelial y un efecto indirecto sobre la integridad de la barrera a través de la modulación de la microbiota y la consiguiente producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Holscher *et al.*, 2017).

Algunos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar AGCC y lactato al llevar a cabo la fermentación de algunos HMOs, provocando efectos metabólicos sistémicos. La liberación de dichos ácidos provoca la disminución del pH del lumen del colon, además de que influyen en la formación del perfil de microorganismos que se encuentran en la microbiota y pueden presentar actividades antibacterianas (Garrido *et al.*, 2013).

Otro estudio demostró que los HMOs pueden actuar como carnada para los enteropatógenos, ya que pueden unirse a las lectinas, y por consiguiente son capaces de bloquear la adhesión de estos a los enterocitos, como resultado se tiene la prevención de episodios de diarrea que suelen ser muy comunes en los recién nacidos. Un ejemplo de la

relación receptor-enteropatógenos-oligosacáridos se puede describir con la diarrea causada por *Campylobacter jejuni*. Anteriormente se creía que solo las inmunoglobulinas podían impedir la unión de esta bacteria a cultivos de células intestinales de cerdos recién nacidos, por lo que no se había demostrado que otros componentes de la leche materna presentaran dicha capacidad. Sin embargo, los FucOS fueron muy efectivos para actuar como bloqueadores (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003).

En los recién nacidos que son amamantados, la superficie del epitelio intestinal se encuentra rodeada por abundantes HMOs, los cuales son capaces de bloquear la entrada del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a los enterocitos, por ende, funcionan como escudo para los lactantes al encontrarse expuestos al virus, en el caso de estar presente en la leche de sus madres (Henrick *et al.*, 2017).

Por otra parte, un estudio *in vitro* realizado por Minteer *et al.* (2014) demostró que la 2'-fucosillactosa (2'FL) y la 3-fucosillactosa (3FL) tienen la capacidad de bloquear la adherencia de norovirus, rotavirus y VIH a enterocitos.

### **2.1.2 Oligosacáridos de la leche humana (HMOs)**

Con los recientes avances y el desarrollo de herramientas analíticas para la caracterización estructural, los científicos han trabajado en la identificación de la composición que presenta la leche humana, que como ya se ha mencionado se caracteriza por la presencia de abundantes y diversos HMOs (O'Sullivan *et al.*, 2018).

Los HMOs son el tercer componente sólido más abundante en la leche humana por debajo de la lactosa y las grasas (Zuurveld, *et al.*, 2020), se sintetizan en la glándula mamaria y tienen como núcleo una molécula de lactosa, la cual forma el extremo reductor de los HMOs (Bode, 2009). Además, están compuestos por una mezcla de monosacáridos como galactosa, glucosa, fucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico, los cuales son adicionados a la lactosa con una gran diversidad de uniones y orientaciones espaciales, lo que da origen a la formación de una abundante variedad de estructuras químicas con diferentes actividades biológicas (Neville, 2009). Pueden formar oligosacáridos de 3 a 32 unidades de monosacáridos (Morrow *et al.*, 2019). De hecho, se han identificado más de doscientas formas estructurales distintas de HMOs (Zuurveld, *et al.*, 2020).

De acuerdo con la Figura 1 A) es posible observar que los HMOs tienen una estructura básica de construcción conformada por cinco monosacáridos, la lactosa es el extremo reductor de las estructuras con algunas excepciones (como la 2'FL o difucosilactosa), puede estar unida a lacto-N-biosa o N-acetilglucosamina. Además, a la molécula de lactosa se pueden unir unidades de otros azúcares como la lacto-N-tetraosa (tipo 1) o Lacto-N-neotetraosa (tipo 2) (Figura 1 B). La lactosa también puede ser fucosilada o sialilada a través de diferentes enlaces y formar trisacáridos (Figura 1 C). Las cadenas alargadas de tipo I o II pueden fucosilarse a través de diferentes enlaces para formar isómeros estructurales (Figura 1 D). Por otro lado, las cadenas elongadas pueden ser sialiladas mediante enlaces  $\alpha$  2-3 o  $\alpha$  2-6 para formar diferentes isómeros sialilados (Figura 1 E) (Bode, 2012).

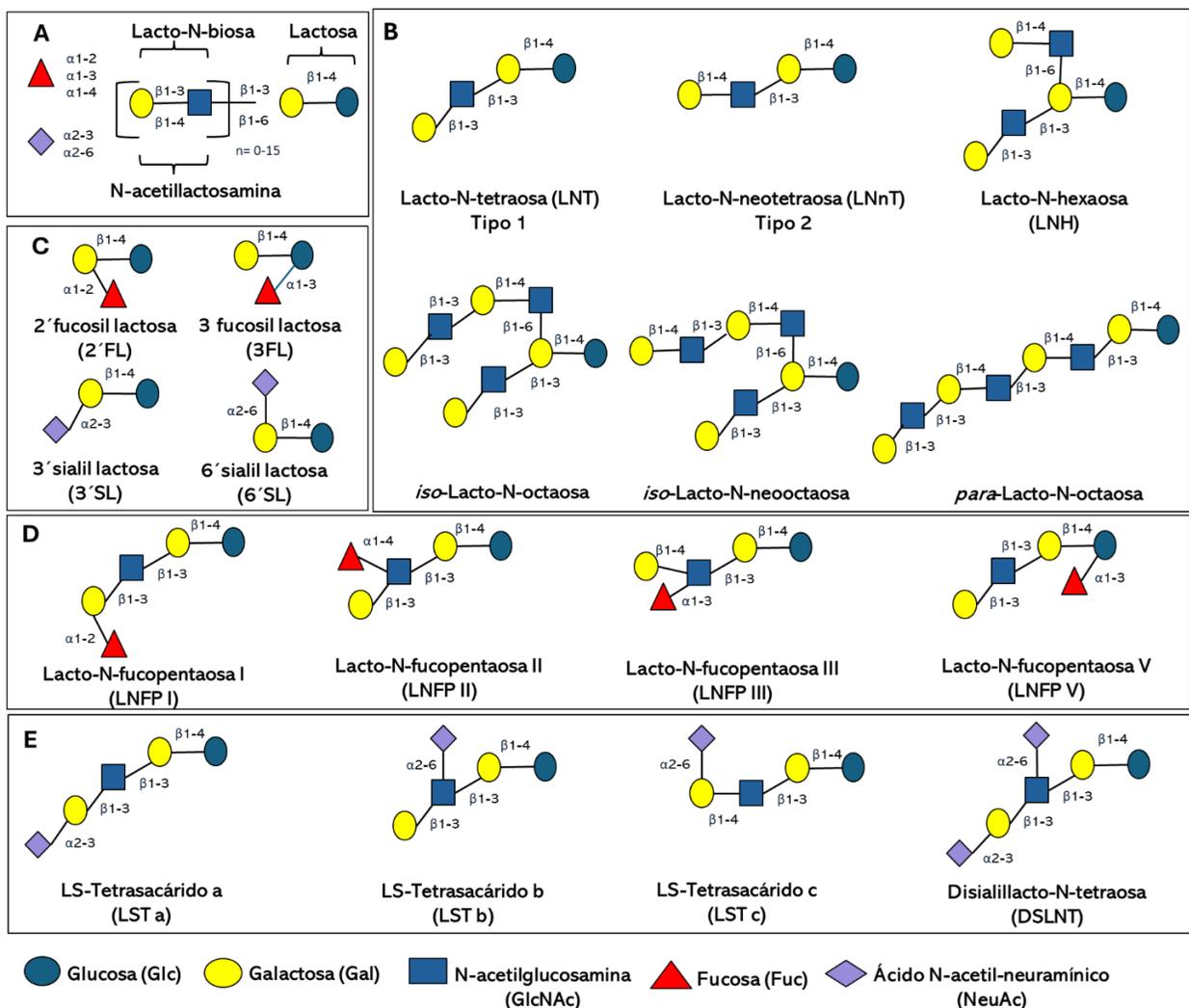


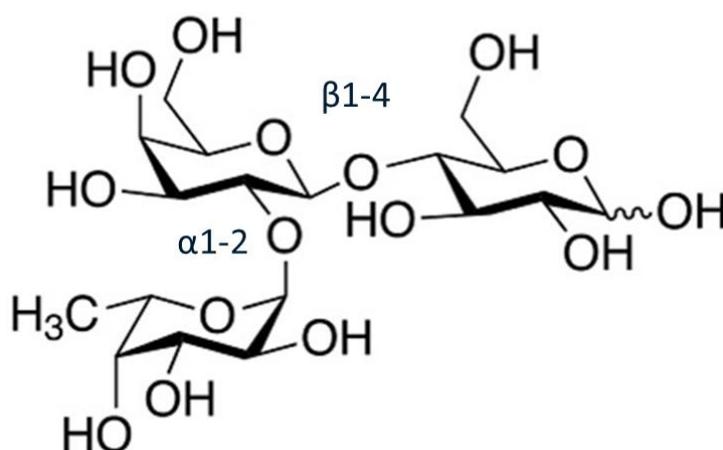
Figura 1. Ejemplos de diversas estructuras de HMOs (Modificado de Bode, 2012).

Una clasificación de los HMOs que es considerada como sencilla, se presenta en la Tabla 1, está compuesta por tres categorías importantes; los oligosacáridos neutros como los fucosilados (FucOS), los oligosacáridos ácidos, los cuales tienen un mayor contenido de ácido siálico, por lo cual a pH neutro se encuentran en forma aniónica y los sialil-fucosil-oligosacáridos que contienen fucosa y ácido siálico.

*Tabla 1. Clasificación de oligosacáridos de la leche humana (Adaptada de Gudiel y Goñi, 2001; Escamilla-Lozano, 2011; Guzmán-Rodríguez, 2018a).*

Neutros	Ácidos/Sialilados	Sialilfucosilados
2'-Fucosil-lactosa	Sialil-( $\alpha$ 2,3)-lactosa	3'-Sialil-3-fucosil-lactosa
3-Fucosil-lactosa	Sialil-( $\alpha$ 2,6)-lactosa	Sialil-fucosil-lacto-N-tetraosa
Lactodifucotetraosa	Sialil-lacto-N-tetraosa-a	Monofucosil-monosialil-lacto-N hexosa
3'-Sialil-lactosa	Sialil-lacto-N-tetraosa-b	

En la leche materna, del 35 al 50% de los HMOs son fucosilados, de 12 a 14% son ácidos/sialilados y de 42 a 55% son HMOs neutros no fucosilados. En la Tabla 2 se enlistan algunos ejemplos de HMOs que se encuentran en la leche materna (Donovan & Comstock, 2016; Brunser, 2019a). Por ejemplo, la 2'FL cuya estructura química se presenta en la Figura 1 F, es el HMO que se encuentra en mayor proporción con una concentración promedio de 2.7 g/L, de hecho, representa alrededor del 30% del total de los HMOs.



*Figura 1F. Estructura química de la 2'FL*

Tabla 2. Principales oligosacáridos en la leche materna

(Adaptada de Donovan y Comstock, 2016; Brunser, 2019a, Zhou et al., 2021).

Categorías de HMOs.	Oligosacáridos	Concentración promedio e intervalo de concentración (g/L)
<b>Fucosilados</b>	2'-Fucosil-lactosa (2'FL) 3-Fucosil-lactosa (3'FL) Lacto-N-fucopentaosa I (LNFP I) Lacto-N-fucopentaosa II (LNFP II)	2.70 (1.88 a 4.90) 0.50 (0.25 a 0.86) 0.12 (0.11 a 0.15) 0.14 (0.12 a 0.16)
<b>Sialilados</b>	3'Sialil-lactosa (3'SL) 6'Sialil-lactosa (6'SL)	0.20 (0.10 a 0.30) 0.50 (0.20 a 1.22)
<b>No fucosilados, neutros</b>	Lacto-N-neotetraosa (LNnT)	0.30 (0.17 a 0.45)

De acuerdo con la Tabla 2, la 2'FL representa el HMO que se encuentra considerablemente en mayor proporción, de hecho, la concentración en la que lo que es posible encontrarla llega a representar alrededor del 30% del total de los HMOs, además de estar presente en ~80% de las muestras de leche de madres en Europa y América (Madrazo de la Garza, 2017).

Sin embargo, como ya se ha mencionado la composición de los HMOs está condicionada por múltiples factores entre los que destaca la genética materna. Un caso importante de la influencia de este factor se encuentra en los FucOS, debido a que la unión de la fucosa para la formación de estos compuestos depende de la expresión de dos fucosiltransferasas (FUT) (Donovan & Comstock, 2016). Los genes necesarios para dicha expresión son el gen que codifica la síntesis de la fucosiltransferasa 2 (FUT2), siendo esta última responsable de catalizar la adición de fucosa a los oligosacáridos a través de un enlace  $\alpha$ 1-2. Se dice que la expresión de este gen condiciona el carácter secretor en las mujeres, por lo que la ausencia de la expresión de este gen estaría condicionando el carácter no-secretor. Por otro lado, el gen que codifica la síntesis de la fucosiltransferasa 3 (FUT3), que es la enzima encargada de catalizar la unión de fucosa a través de enlaces  $\alpha$ 1-3/4, se asocian con el grupo sanguíneo *Lewis*<sup>+</sup> en las mujeres que son capaces de expresar este gen, por lo tanto, la carencia de este gen designa a las portadoras como *Lewis*<sup>-</sup> (Brunser, 2019a).

### 2.1.3 Oligosacáridos fucosilados (FucOS)

De acuerdo con Brunser (2019a), se han comparado los oligosacáridos presentes en la leche de otros mamíferos con los de la leche humana, sin embargo, no se encontró punto de comparación entre la cantidad y la diversidad de estructuras moleculares que presenta la leche humana, además la leche de otros mamíferos prácticamente no contiene FucOS. Por ejemplo, en la leche de vaca los oligosacáridos se encuentran en bajas cantidades ~0.05 g/L, además de que los HMOs presentes son principalmente no fucosilados y ácidos, estando en mayor cantidad aquellos en forma de lactosa galactosilada sin N-acetilgalactosamina o, con ácido N-glucolilneuramínico, además, es posible encontrar en algunos de ellos lactosamina en lugar de lactosa. Por lo tanto, las fórmulas infantiles que son fabricadas usando como base la leche de vaca tienen muy bajo contenido de oligosacáridos similares a los de la leche humana y por lo tanto no presentan los mismos efectos funcionales. Del mismo modo, se ha reportado que la leche de cabra y camello contienen una mayor proporción de oligosacáridos ácidos y una menor concentración de oligosacáridos neutros (Lan *et al.*, 2022).

Los FucOS se caracterizan por tener un residuo de L-fucosa en su extremo no reductor. La L-fucosa es de los pocos azúcares que se encuentran en la naturaleza en forma de isómero-L y su presencia se ha confirmado no sólo en los HMOs, sino también, en diversos compuestos como mucinas intestinales de los humanos, antígenos de los grupos sanguíneos, en polisacáridos estructurales como fucoidan y xiloglucano (abundante en la pared vegetal de muchas dicotiledóneas), entre otros (Venditti *et al.*, 2010; Benešová *et al.*, 2013).

Se ha reportado que los FucOS están implicados en numerosos y cruciales procesos fisiológicos, como la respuesta inmunitaria, la transducción de señales, la embriogénesis y el desarrollo temprano, la regulación del crecimiento, la apoptosis, la adhesión de patógenos, la extravasación de leucocitos, la maduración e interacción de los gametos y procesos patológicos (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2019).

Entre los FucOS, la 2'FL, un trisacárido compuesto por un enlace glucosídico  $\alpha$ -1,2 que une L-fucosa y D-lactosa, es el más abundante, con un contenido de ~2 g/L en la leche humana (Zhou *et al.*, 2021), y tiene una estructura relativamente simple en comparación con otros HMOs (Figura 1).

Las FUT 2 y 3 codificadas por el gen secretor (*Se*) y *Lewis* (*Le*), respectivamente, son las principales enzimas implicadas en la síntesis de los FucOS (Lefebvre *et al.*, 2020). Las madres consideradas como no secretoras tienen ausente la expresión de la enzima FUT2 y forman parte del 30% del total de mujeres en el mundo, y como ya se ha mencionado producen leche con ausencia de oligosacáridos  $\alpha$ 1-2-fucosilados (como por ejemplo 2'FL y LNFP I). Al no estar presentes estos compuestos, se tienen repercusiones funcionales en el sistema inmune, como una mayor probabilidad de sufrir infecciones, morbilidad y la necesidad de medicamentos como antibióticos (Donovan & Comstock, 2016; Brunser, 2019a).

Se resalta que la cantidad de HMOs presente en la leche humana es más baja cuando en la glándula mamaria no se encuentran activas las enzimas FUT2 ni FUT3. Por otro lado, se ha comprobado que los hijos de madres secretoras tienen menor probabilidad de sufrir enfermedades como la de Crohn, diabetes tipo 1, así como casos menores de diarrea, además, los bebés prematuros presentan tasas de supervivencia más altas. No obstante, las madres no secretoras tienen hijos más fuertes ante infecciones causadas por norovirus, rotavirus y *Helicobacter pylori* (Brunser, 2019b).

*Lewis et al.* (2015) demostraron que los lactantes de madres secretoras contienen en sus heces cantidades significativas de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* así como poblaciones de clostridios, enterobacterias y estreptococos más bajas. Por otra parte, las heces pertenecientes a los lactantes de madres no secretoras presentan cantidades bajas de *Bifidobacterium* y más altas de *Escherichia*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Shigella* y *Streptococcus*.

Por consiguiente, los lactantes de las madres no secretoras son más susceptibles a padecer enfermedades del tracto gastrointestinal (infecciosas e inflamatorias), sin embargo, también presentan una mayor percepción y captación de la vitamina B12 y una defensa considerable ante microorganismos infecciosos. A causa de lo antes mencionado, el hecho de que el gen que codifica la FUT2 se encuentre o no activo, provoca tanto consecuencias positivas como otras potencialmente negativas (Brunser, 2019b).

## 2.2 Síntesis de oligosacáridos

### 2.2.1 Generalidades

Se han desarrollado varias estrategias químicas y enzimáticas para obtener oligosacáridos. Por su parte, la síntesis química de carbohidratos es un desafío debido a los numerosos pasos de protección/desprotección, las grandes cantidades de reactivos tóxicos y las duras condiciones de reacción requeridas (Zeuner & Meyer, 2020; Zhao *et al.*, 2017). Mientras que la síntesis enzimática utiliza glicosiltransferasas (GT) o glucosidasas de procariontes y eucariotes, no requiere productos químicos agresivos y es más económica, convirtiéndola en una estrategia alternativa para la producción comercial de carbohidratos estructuralmente complejos (Zhong *et al.*, 2021).

### 2.2.2 Síntesis enzimática

Se han realizado diversos esfuerzos para sintetizar FucOS, ya que es difícil purificarlos de sus fuentes naturales, como la leche humana, el tejido epitelial, la sangre, entre otros. Dentro de las estrategias para su síntesis *in vitro*, destaca el empleo de fucosidasas, las cuales se distribuyen en una gran diversidad de organismos como: algas, arqueas, bacterias, plantas, hongos, moluscos, ascidias, aves y mamíferos (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2019).

Investigaciones recientes han demostrado que se puede producir una gran variedad de HMOs *in vitro* a través de reacciones catalizadas enzimáticamente utilizando enzimas derivadas de microorganismos, especialmente fucosidasas, trans-sialidasas o sialidasas. (Perna *et al.*, 2023).

Una opción interesante es la síntesis enzimática promovida por GT y glucosilhidrolasas (GH) que trabajan en modo de transglicosilación. Las primeras enzimas son extremadamente eficientes, pero su uso está limitado por el costo elevado de los sustratos (azúcar nucleótido), las dificultades para obtener los catalizadores en cantidades suficientes y la extrema especificidad de las enzimas (Hancock *et al.*, 2006).

### 2.2.2.1 Transferasas

Las GT necesitan sustratos donadores que se encuentren activados con difosfato de nucleósido, el estado activado de dichos sustratos hace que la glicosilación sea energéticamente favorable y comúnmente irreversible, se trata de enzimas altamente selectivas y sin hidrólisis simultánea de los productos. La mayoría de las GT se encuentran en la membrana y por lo general se dificulta su expresión recombinante en *E. coli* (Wu *et al.*, 2020).

Un tipo de GT son las fucosiltransferasas (FUTs) las cuales se encargan de sintetizar los FucOS en los seres vivos. La biosíntesis de FucOS y demás HMOs se lleva a cabo en el aparato de Golgi de las células que componen a los alvéolos de la glándula mamaria, donde las FUTs realizan la unión de fucosa a lactosa para la formación de estos compuestos (Gudiel-Urbano & Goñi., 2001).

En otras palabras, la síntesis de FucOS se lleva a cabo mediante la transferencia del grupo fucosil, de un sustrato donador (comúnmente fucosil-nucleótidos) a un sustrato aceptor (otros carbohidratos). Se suele decir que el sustrato donador se encuentra activado, debido a la presencia de un nucleótido-difosfato, el cual actúa como un mejor grupo saliente durante la transfucosilación (Hancock *et al.*, 2006).

Las FUTs se clasifican de acuerdo con su especificidad por la formación de enlaces en  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3/4. Se han identificado varias  $\alpha$ -1,2 FUTs, por ejemplo, en las bacterias *H. pylori* y *E. coli*, en mamíferos como *Caenorhabditis elegans* y *Schistosoma mansoni*, así como en plantas (Parkot *et al.*, 2011).

Así también, las FUTs ofrecen varias ventajas como los altos rendimientos de síntesis, la transferencia de los grupos fucosilo con estricta regio y estereoselectividad, sin embargo, su aplicación en síntesis preparativa, la cual tiene como objetivo producir en mayor escala el compuesto de interés, está restringida debido a la poca disponibilidad de este tipo de enzimas y de sus sustratos donadores, además de que estos últimos son difíciles de sintetizar y por lo tanto costosos (Palcic, 2011).

Este tipo de enzimas al ser dependientes de azúcares unidos a nucleótidos, tienden a ir acompañadas de acoplamiento multienzimático de azúcares y tienen altos costos, baja estabilidad y disponibilidad limitada de donantes. Se comportan mejor en un entorno neutro, y requieren de la regeneración de los donantes de azúcar nucleótidos. (Mestrom *et al.* 2019).

Sin embargo actualmente se ha desarrollado el uso de enzimas provenientes de diferentes microorganismos, las cuales son aisladas, purificadas y modificadas genéticamente para optimizar su actividad (Zeuner *et al.*, 2018). Una de las estrategias en las que se han obtenido los mejores rendimientos y en donde se han desarrollado los mayores avances en los últimos años, son las fermentaciones en células completas. En este método, se utilizan generalmente cepas de *E. coli* modificadas genéticamente para expresar enzimas necesarias para la síntesis endógena de GDP-Fucosa, así como enzimas necesarias para la producción de HMOs como por ejemplo la  $\alpha$ 1,2-fucosiltransferasa intracelular, además de llevar a cabo el silenciamiento de genes implicados en la asimilación de lactosa con el fin de mejorar su aprovechamiento en la síntesis estos compuestos (Chin *et al.* 2017; Seydametova *et al.* 2019).

Tal es el caso de la investigación realizada por Chin *et al.* (2017) donde lograron desarrollar una cepa recombinante de *E. coli* con la cual se obtuvo una producción de 15.40 g/L de 2'FL después de 29 hrs.

#### **2.2.2.2 Fucosidasas**

Una alternativa a las FUTs, son las GH como las  $\alpha$ -L-fucosidasas (FUCs), que conservan la configuración anomérica en el producto, son enzimas que, utilizando condiciones adecuadas de reacción, promueven la síntesis de oligosacáridos (Cobucci-Ponzano *et al.*, 2009).

En la base de datos de enzimas activas en carbohidratos (CAZy por sus siglas en inglés), se encuentran grupos de familias que abarcan enzimas con mecanismos y estructuras en común, pero con diferentes especificidad (Martínez-Gascueña *et al.* 2024). Además, el número de GH va en aumento debido a la secuenciación metagenómica. Esta base de datos agrupa a las FUCs en cuatro familias GH29, GH95, GH141 y GH151, siendo las dos primeras las más comunes. La familia GH95 comprende enzimas que siguen un mecanismo de inversión de la configuración del carbono anomérico para la catálisis (Moya- González *et al.*, 2022), además las enzimas que han sido caracterizadas hasta el momento pertenecientes a esta familia muestran una estricta especificidad de sustrato, en cuanto al enlace terminal Fucosa  $\alpha$ 1,2-Galactosa (Martínez-Gascueña *et al.* 2024).

Por otro lado, la familia GH29 está compuesta por FUCs que llevan a cabo la hidrólisis de los enlaces glucosídicos manteniendo la configuración anomérica en los productos de la reacción, empleando un mecanismo de doble desplazamiento (Summers *et al.*, 2016).

La reacción se produce con la asistencia de dos aminoácidos, uno que actúa como ácido/base general y otro como nucleófilo. En la Figura 2 se presenta el mecanismo de reacción que consta de dos pasos. En el primer paso de este mecanismo, el centro anomérico del sustrato donador es atacado por el aminoácido nucleófilo para desplazar al aglicón y formar un intermediario covalente fucosil-enzima. Al mismo tiempo, el otro aminoácido funciona como un ácido general y protona el oxígeno del enlace glicosídico a medida que este se escinde. En el paso número dos, el intermediario fucosil-enzima es atacado nucleofílicamente por el grupo hidroxilo de un aceptor (agua o algún carbohidrato), y el otro residuo de aminoácido actúa ahora como base general y desprotona la molécula de aceptor cuando éste realiza el ataque. En esta última etapa, si el grupo hidroxilo que participa en el ataque nucleofílico proviene del agua, el resultado es la hidrólisis del compuesto, pero si el hidroxilo proviene de un carbohidrato se logra la transfucosilación (Hancock *et al.* 2006; Zeuner *et al.* 2014).

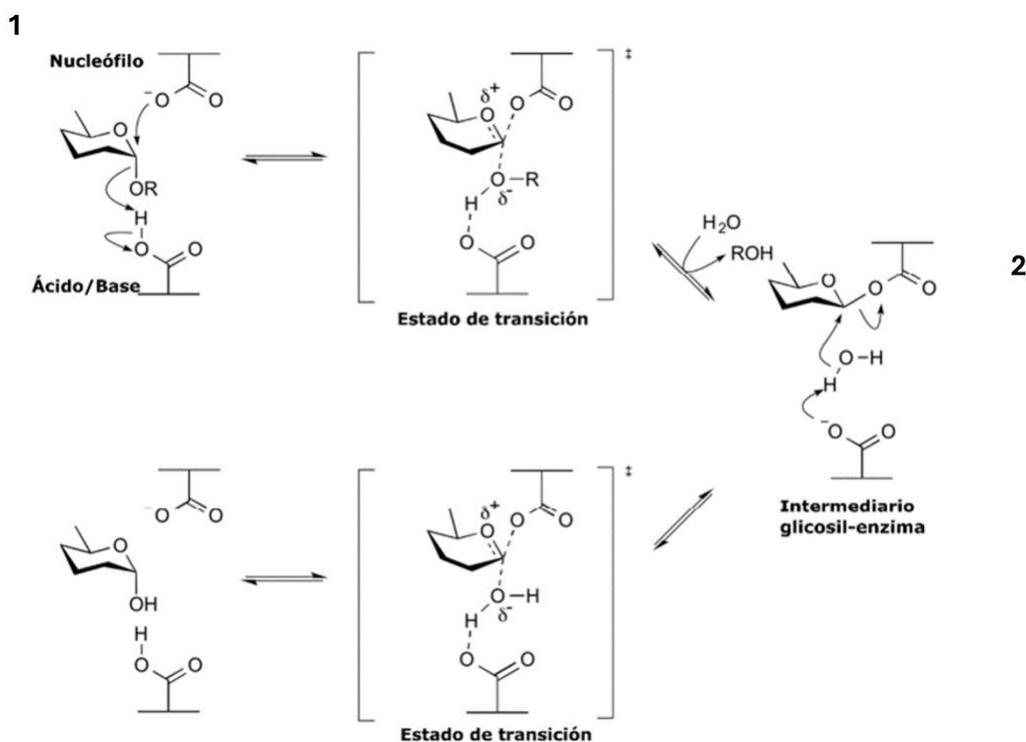


Figura 2. Mecanismo catalítico de las fucosidasas GH29  
(Adaptado de Zeuner *et al.*, 2014).

Las reacciones de transfucosilación exigen un sustrato donante activado, lo que significa que la fracción fucosa que se va a transferir debe formar un enlace de alta energía con un buen grupo saliente (los iones más voluminosos o capaces de estabilizar la carga negativa son considerados como los más adecuados), de modo que la energía liberada por la escisión de este enlace contribuya a reducir la energía de activación en la reacción de transfucosilación, por ejemplo, mono o disacáridos, un grupo metilo, un grupo nitrofenilo e incluso algunos halógenos. El sustrato más reportado en las reacciones de transfucosilación es el *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido (*p*NP-Fuc) (Zeuner *et al.*, 2014; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2019). Una razón es que muchas fucosidasas reconocen este compuesto como sustrato. Otra característica es su cromogenicidad (debido a la liberación de nitrofenol), que permite el seguimiento espectrofotométrico de la reacción de hidrólisis.

Además de lo anterior, este compuesto está disponible comercialmente y, es uno de los donantes comerciales de fucosil más económicos disponibles (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2019).

De los dos aminoácidos catalíticos, el que actúa como nucleófilo está bien conservado en cuanto a su posición en la secuencia de aminoácidos en toda la familia de fucosidasas GH29. Por otra parte, la posición del aminoácido que actúa como ácido/base general no está bien conservada, y con base a relaciones filogenéticas, la posición de este aminoácido es un criterio para dividir la familia GH29 en dos subfamilias; subfamilia GH29A (EC 3.2.1.51), cuyo ácido/base general es el ácido glutámico (Glu) y son enzimas con una especificidad relajada (son capaces de reconocer una mayor variedad de enlace) y la subfamilia GH29B (EC 3.2.1.111) que son enzimas con especificidad hacia los enlaces  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4 (Shaikh *et al.*, 2013), además de ser consideradas enzimas activas en sustratos ramificados con galactosa. Se ha descrito que la mayoría de los miembros de la subfamilia GH29A pueden hidrolizar el sustrato artificial *p*NP-Fuc, mientras que en la GH29B la actividad es baja o ausente (Moya-González *et al.*, 2022).

Como se puede observar en la Figura 3, la transfucosilación tiene lugar en competencia con la hidrólisis. Existen diferentes estrategias para minimizar la hidrólisis con el objetivo de mejorar los rendimientos de transfucosilación, tales como: el uso de una relación donante/aceptor (D:A) adecuada (mayor concentración de sustrato aceptor), el control del tiempo de reacción, la eliminación continua del producto, el reciclaje de enzimas y/o el uso de cosolventes, la  $a_w$ , la temperatura, y el pH (Zeuner *et al.*, 2014; Lundemo *et al.*, 2017). La ingeniería de proteínas también es una técnica prometedora para obtener altos

rendimientos de transfucosilación. Sin embargo, la ruta de ingeniería de proteínas actualmente requiere esfuerzos de investigación significativos en cada caso (Zeuner *et al.*, 2014; Zeuner *et al.*, 2019), por ejemplo del conocimiento de la estructura, estabilidad y el plegamiento de la proteína de interés, así como las interacciones en la estabilización conformacional de las cadenas polipeptídicas y los factores que contribuyen con su función o actividad catalítica (Amara, 2013).

Para la síntesis de HMOs, la estrategia más común es el uso de una alta concentración de sustrato aceptor. Una proporción alta de (D:A) puede hacer que muchas GH retenedoras catalicen la transfucosilación con mejores rendimientos (Zeuner *et al.*, 2019).

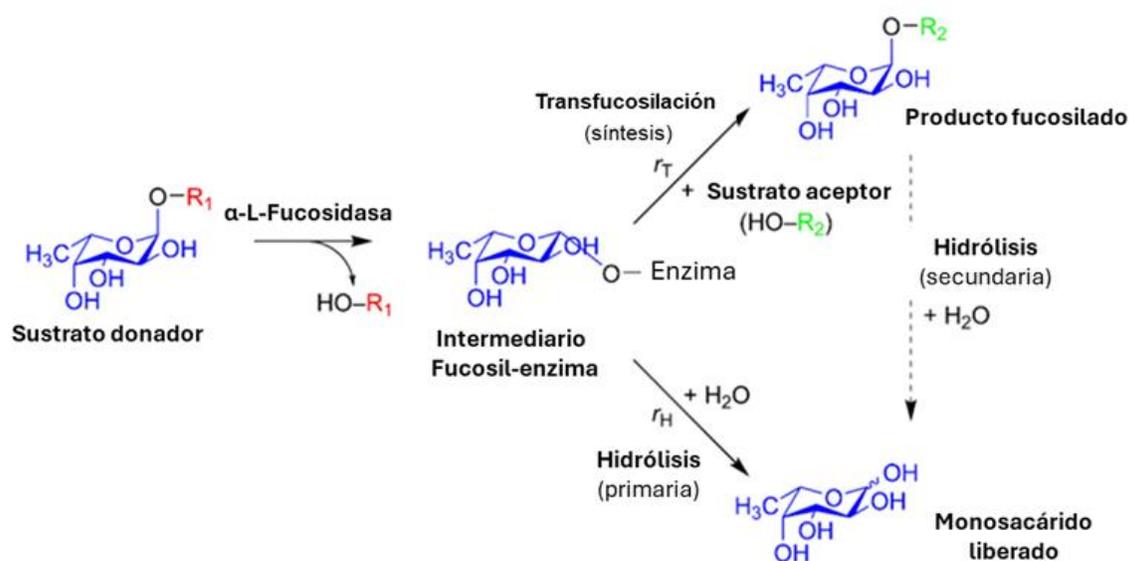


Figura 3. Ejemplo de mecanismo de doble desplazamiento de retención de Fucosil hidrolasas GH29 (Adaptado de Zeuner *et al.*, 2019).

Si bien las GH son estereoespecíficas, ya que generan productos con una configuración anomérica definida, la regioselectividad varía entre las enzimas y puede depender de la estructura del aceptor, es por ello que debe aprovecharse cuando se emplean glicosidasas para la síntesis de HMOs, eligiendo enzimas altamente regioselectivas (Zeuner *et al.*, 2019).

La reducción de  $a_w$  de los sistemas enzimáticos para aumentar los rendimientos de síntesis en la reacción de transfucosilación ha sido comúnmente abordada utilizando solventes orgánicos (Vera *et al.* 2017; Robles-Arias *et al.*, 2021b). Otra alternativa para reducir la  $a_w$  es mediante la adición de sales inorgánicas, se ha informado que algunos cationes juegan

un papel importante en la estructura de muchas enzimas aumentando su actividad catalítica (Vieille & Zeikus, 2001).

### 2.3 Efecto de iones en reacciones enzimáticas

Como ya se ha mencionado dentro de las estrategias desarrolladas con el objetivo de orientar la síntesis de oligosacáridos sobre la hidrólisis para aumentar los rendimientos, se encuentra el aumento de la actividad catalítica por iones, que en conjunto con la disminución de  $a_w$ , (por uso de sales inorgánicas), provocan un incremento en la actividad de síntesis. Debido a ello, se ha despertado el interés por evaluar el efecto de distintos cationes bivalentes sobre la síntesis de oligosacáridos utilizando GH. En este apartado se presentan algunos estudios realizados en GH en donde se ha evaluado este efecto, además de resultados obtenidos en hidrolasas diferentes a las FUCs, las cuales pueden reflejar un comportamiento importante.

Guzmán-Rodríguez *et al.*, (2018c) desarrollaron una investigación centrada en la influencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en la actividad hidrolítica y la influencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la síntesis de FucOS utilizando la FUC-*Tm*. En estas reacciones, la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma de  $\text{CaCl}_2$  1.1 M favoreció la tasa de hidrólisis y de transfucosilación, y mejoró el rendimiento de síntesis duplicándolo y triplicándolo, con concentraciones de lactosa de 58 y 146 mM, respectivamente. Los resultados antes mencionados permitieron intuir que la combinación del efecto activador del  $\text{Ca}^{2+}$ , la disminución de  $a_w$  y la alta concentración de lactosa tuvo un efecto sinérgico favoreciendo la síntesis de FucOS.

Por otro lado, Liu *et al.* (2022), llevaron a cabo el estudio del impacto de diferentes iones sobre la actividad de la FUC de *Pseudoalteromonas* sp. OU03 (*PsaFuc*), perteneciente a la familia GH29, empleando  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$  a una concentración final de 1mM. En esta investigación se reportó que la adición de los iones  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  aumentó la actividad de la enzima, de estos el  $\text{Mn}^{2+}$  mostró la influencia más significativa sobre la actividad, sin embargo, después de un tratamiento de incubación se observó que el  $\text{Ca}^{2+}$  prolongó la vida media de la enzima teniendo un mayor efecto. Además, a través de experimentos de calorimetría se demostró que el  $\text{Ca}^{2+}$  interactuó con *PsaFuc* a través de múltiples sitios induciendo cambios de conformación locales, lo cual mantuvo el estado activo de la proteína, confiriéndole mayor estabilidad estructural.

Por otra parte, Arsov *et al.* (2022) realizaron una investigación sobre la síntesis de galactooligosacáridos (GOS) utilizando una  $\beta$ -galactosidasa de *Lactobacillus bulgaricus*, en

donde evaluaron el efecto de ocho cationes distintos en una concentración de 10 mM sobre la actividad de la enzima. Lo que se observó fue que tanto  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  inhibieron levemente la actividad hidrolítica mientras que  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  provocaron un aumento en la actividad, siendo el manganeso el ion que produjo el mayor incremento de la actividad, en un factor de 3.5. Posteriormente, se estudió el efecto de estos tres cationes en la actividad de transgalactosilación, en esta última cuando se usaron 80 g/L de lactosa se obtuvo un incremento constante en alrededor del 10% de la producción de GOS con grado de polimerización 3, mientras que al utilizar concentraciones más elevadas de lactosa (120 a 200 g/L) se perdió el efecto, además, al trabajar con una concentración de 15 mM de los iones tanto de forma separada como en conjunto con la lactosa, se produjo un efecto inhibitorio sobre la producción de GOS con grado de polimerización 3.

De igual forma, Du *et al.* (2022) llevaron a cabo la caracterización de dos  $\beta$ -galactosidasas provenientes de *Bifidobacterium longum* (BLGLB1) y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (BPGLB1), dentro de la cual se determinó el efecto de diferentes cationes metálicos ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Li}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) empleándolos en una concentración de 5 mM en las condiciones óptimas encontradas para la reacción de hidrólisis. Para este estudio se obtuvo que la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Li}^{2+}$  incrementaron la actividad, sin embargo, al comparar ambas enzimas se determinó que el aumento fue menor en BLGLB1. Por otro lado,  $\text{Al}^{3+}$  disminuyó la actividad en ambas  $\beta$ -galactosidasas y algunos iones metálicos incrementaron la actividad de BPGLB1 pero a su vez disminuyeron la de BLGLB1 tal fue el caso de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

Asimismo, Shi *et al.*, (2023), obtuvieron un aumento en la actividad de la FUC de *Pedobacter* sp. CAU 209 del 9 % en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  y 6% con  $\text{Mg}^{2+}$ , además, también se observó la inhibición en la actividad en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (en esta investigación las concentraciones de los iones metálicos fueron de 1mM).

Otra investigación en donde se estudió el efecto de iones en la actividad enzimática es la de Jeilu *et al.* (2024) en donde llevaron a cabo la caracterización de una  $\beta$ -glucosidasa, en este estudio se analizó el efecto de diferentes iones metálicos utilizando las sales inorgánicas de  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{AlCl}_3$  en una concentración de 5 mM, demostrando que el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  provocan una disminución en la actividad de la enzima, mientras que el resto de los iones no presenta un efecto significativo.

Wang *et al.* (2024), crearon una  $\beta$ -glucosidasa/xilanasas/feruloyl esterasa multifuncional a la que denominaron GXF, para ello utilizaron la  $\beta$ -glucosidasa aislada de *Thermobifida fusca* y xilanasas/feruloilesterasa bifuncional de *Prevotella ruminicola* en la cual se analizó el efecto de diferentes iones metálicos ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) sobre todas sus actividades enzimáticas. Para evaluar la actividad de GXF se incubó en presencia de los iones en una concentración 5 mM por 30 min para posteriormente determinar la actividad residual de cada reacción. Se obtuvieron actividades relativas mayores al 80% cuando el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  estuvieron presentes. En relación con las demás actividades (xilanasas, feruloilesterasa y acetil xilano esterasa), fueron inhibidas por la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ag}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ .

Por otra parte, Feng *et al.* (2024), caracterizaron la esterasa de *T. maritima*, evaluando el impacto de la presencia de iones metálicos ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) probando concentraciones de 1 y 10 mM. Los resultados mostraron que  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  provocaron un incremento en la actividad de la esterasa, teniendo el mayor aumento en la actividad en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (aumento del 47 %) en concentración 1 mM. Aunque, al aumentar la concentración a 10 mM, el  $\text{Na}^+$  ya no aumento la actividad, mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , y  $\text{Cu}^{2+}$  la inhibieron siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  el ion que causo el mayor impacto disminuyendo la actividad en un 68%.

Del mismo modo Zhu *et al.* (2024), realizaron la caracterización de una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa proveniente de *Bacillus subtilis* ( $\alpha$ -L-AFasa), para ello se evaluó la presencia de iones metálicos en concentraciones de 5 y 25 mM, como resultado se demostró que a dichas concentraciones el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  no presentaron un efecto importante sobre la  $\alpha$ -L-AFasa. Mientras que el  $\text{Co}^{2+}$  tuvo un ligero impacto como inhibidor.

## 2.4 $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*

*T. maritima* es una especie perteneciente al orden *Thermotogales*, son capaces de mantener el crecimiento en un intervalo notablemente amplio de temperaturas (Latif *et al.*, 2013), se estima que su crecimiento óptimo se encuentra en un intervalo de 65 a 90 °C.

La FUC-*Tm* es miembro de la familia GH29A de acuerdo con la clasificación de CAZy, esta enzima es el pariente bacteriano más cercano de las FUCs de mamíferos y comparte un 38% de identidad con su contraparte humana (Sulzenbacher *et al.*, 2004). Esta enzima está compuesta por 449 aminoácidos, y su masa molecular es de 52,205 Da (BRENDA, 2023).

La FUC-*Tm* se ensambla en un arreglo hexamérico compacto (Figura 4), este conjunto se puede dividir en dos trímeros que se apilan uno sobre el otro y se giran 30°. Es una proteína de dos dominios. El dominio N-terminal (residuos 7–359) adopta un pliegue en forma de  $(\beta/\alpha)_8$  barriles, con ocho hebras paralelas empaquetadas alrededor de un eje central y rodeadas por seis  $\alpha$ -hélices y un dominio C-terminal  $\beta$ -sándwich. Una cavidad en los extremos C-terminales de las cadenas alberga el sitio activo. Los aminoácidos del sitio activo son el nucleófilo ácido aspártico (Asp<sup>224</sup>) y el ácido/base Glu<sup>266</sup> (Sulzenbacher *et al.*, 2004).

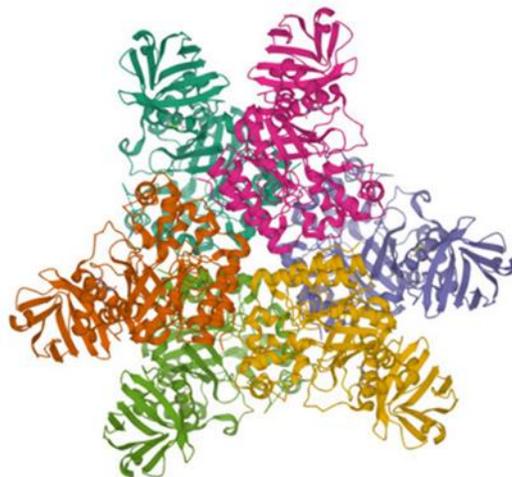


Figura 4. Estructura del hexámero de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* (RCSB-PDB,2023, (PDB-ID:1ODU); Sulzenbacher *et al.*, 2004).

En la Figura 5 se muestra la estructura de la FUC-*Tm* en complejo con fucosa (PDB-ID:1ODU; Sulzenbacher *et al.*, 2004), como se muestra en la Figura 5 A, esta enzima está compuesta por un dominio N-terminal (catalítico), representado de color morado y el dominio C-terminal (azul), además, los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo, el residuo nucleófilo Asp<sup>224</sup> y el residuo ácido/base Glu<sup>266</sup> se muestran en presentación de *stick* o bastón de color amarillo.

La Figura 5 B, permite identificar el sitio activo, ubicado en un pequeño bolsillo formado por los extremos C-terminales de las hebras centrales del dominio ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> representados de color rosa. Además, como se puede observar en el bolsillo catalítico puede entrar un solo residuo de L-fucosa, por lo que su tamaño pareciera estar adaptado para dicha molécula (Sulzenbacher *et al.*, 2004).

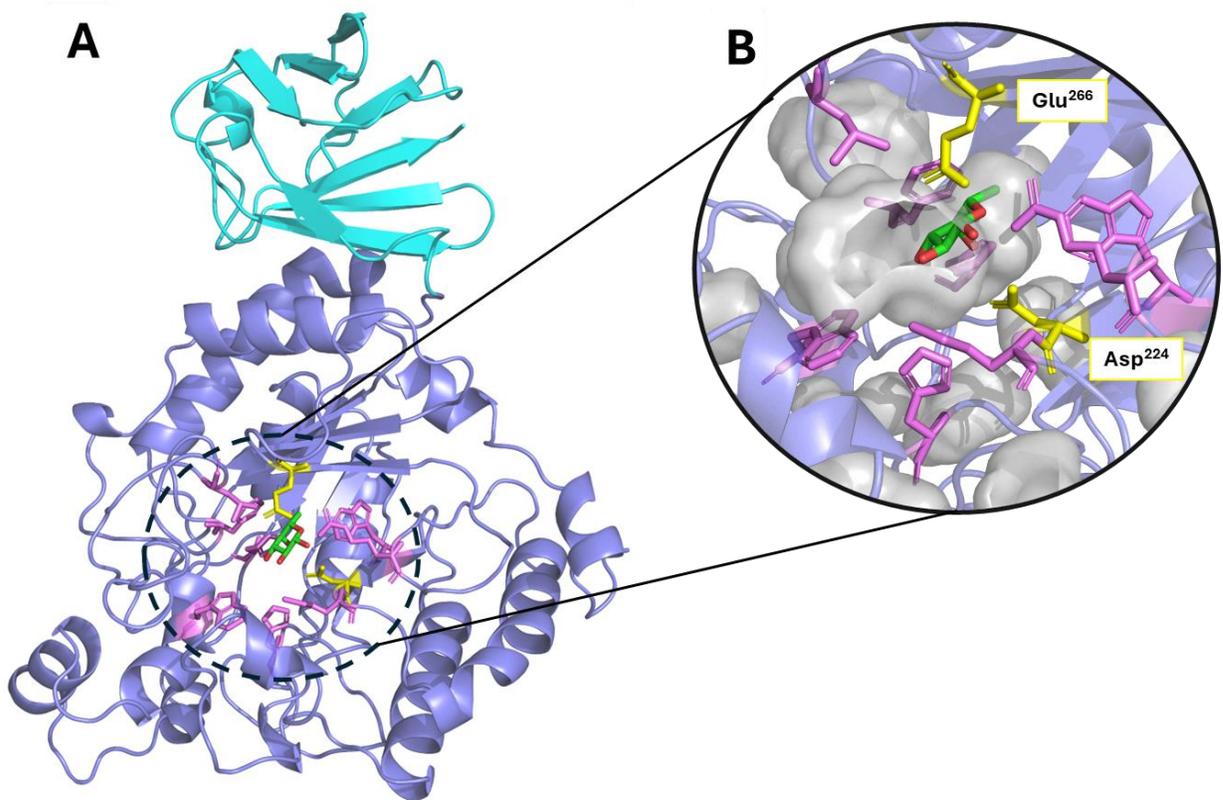


Figura 5. Representación del modelo estructural de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima* PDB-ID:1ODU. (A) En color morado se representa el dominio N-Terminal, en azul el dominio C-Terminal, amarillo los aminoácidos catalíticos y en verde la fucosa. (B) Bolsillo del sitio activo con los residuos catalíticos.

En la Figura 6 se puede observar la secuencia de aminoácidos (estructura primaria), de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima*, donde se encuentran señalados en color verde los dos residuos del sitio activo (Asp<sup>224</sup> y Glu<sup>266</sup>).

```
0 M SMKPRYKP DWESLREHTV PKWFDKAKFG I FI HMG I YSV PGWATPTGEL GKVPMDAWFF
60 QNPYAEWEN SLRI KESPTW EYHVKTYGEN FEYEK FADLF TAEKWDPQEW ADLFKKAGAK
120 YVI PTTKHHD GFCLWGTYT DFNSV KRGP K RDLVGD LAKA VREAGLRFGV YYSGGLDWRF
180 TTEPI RYPED LSYI RPNTYE YADYAYKQVM ELVDLYLPDV LWN224MGWPEK GKEDLKYLFA
240 YYYNKHPEGS VNDRWGVPHW DFKTA266YHVN YPGDLPGYKW EFTRGI GLSF GYNRNEGPEH
300 MLSVEQLVYT LVDVVS KGGN LLLNVGPKGD GTI PDLQKER LLGLGEWL RK YGDAI YGTSV
360 WERCCA KTED GTEI RFTRKC NRI FVI FLGI PTGEKI VI ED LNLSAGTVRH FLTGERLSFK
420 NVGKNLEI TV PKK LLETDSI TLVLEAVEE
```

*Figura 6 . Secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de T. maritima (BRENDA, 2023).*

#### **2.4.1 Síntesis de Oligosacáridos fucosilados utilizando $\alpha$ -L-fucosidasa de *T. maritima***

La FUC-*Tm* es una enzima de gran interés debido a que se ha comprobado que puede llevar a cabo la transfucosilación, además como se ha mencionado en los apartados anteriores su estructura comparte similitud con la fucosidasa humana, lo que la vuelve un buen modelo. Por otro lado, al ser una enzima proveniente de un microorganismo extremófilo, presenta resistencia a condiciones extremas, haciéndola una enzima atractiva para la optimización de su actividad, debido a ello a continuación se presentan algunas investigaciones realizadas en torno a esta enzima.

Osanjo *et al.* (2007) estudiaron la evolución de la FUC-*Tm* en una  $\alpha$ -L-transfucosidasa, para ello la enzima se sometió a un ciclo de mutagénesis, seguido de una recombinación racional de las mutaciones seleccionadas, lo que permitió la identificación de variantes con actividad de transferasa mejorada. Se demostró que el mejor mutante exhibió un aumento de 32 veces en la relación cinética de transferasa/hidrolítica. El modelo molecular sugirió que algunas de estas mutaciones provocan una reorientación de los aminoácidos que están en contacto directo con los sustratos, lo que resulta en una mejor energía de acoplamiento.

Lezyk *et al.* (2016) utilizaron la FUC-*Tm* que se expresó en *E. coli* como modelo de comparación para evaluar el potencial de transfucosilación de siete fucosidasas que se obtuvieron del metagenoma del suelo. Al utilizar *p*NP-Fuc como donante y lactosa como aceptor se obtuvo 2'FL con un rendimiento del 6.4%. Además, se observó que el *p*NP-Fuc funcionó también como aceptor para producir *p*NP-Fuc-Fuc con un rendimiento del 17.6%.

Zeuner *et al.* (2018), realizaron una investigación con siete FUCs de las subfamilias GH29A y GH29B en donde evaluaron su capacidad para liberar fucosa de xiloglucano (XyG) extraído de la cascara de cítricos, así como su potencial de transfucosilación. Entre las siete fucosidasas utilizadas se encontraba la FUC-*Tm*. Para poder analizar la especificidad de las FUCs se realizaron estudios de los modelos estructurales 3D de las enzimas y el acoplamiento del sustrato.

Al analizar la actividad hidrolítica se observó que ninguna de las dos enzimas de GH29B presentó actividad en XyG, por otro lado, cuatro de las cinco FUCs GH29A fueron hidrolíticamente activas en XyG de cítricos, con excepción de la FUC-*Tm*. Al estudiar los sitios activos de los modelos estructurales de las FUCs, observaron que la apertura del sitio activo de la FUC-*Tm* estaba parcialmente protegido por una estructura de bucle, lo que significa que esto puede limitar el acceso a un sustrato grande como el XyG. Además, probaron la actividad de transfucosilación con una concentración de lactosa de 100 mM utilizando como donante de fucosilo una fracción rica en XyG extraída de la cáscara de cítricos. La reacción se controló durante un máximo de 24 h. La FUC de *Fusarium graminearum* (FgFCO1) fue la enzima más prometedora para la transfucosilación de XyG de cáscara de cítricos, mostrando una mejor regioselectividad que condujo a la formación de una estructura HMO y con una menor actividad hidrolítica.

Guzmán-Rodríguez *et al.*, (2018b) realizaron la síntesis de un trisacárido fucosilado por transfucosilación utilizando la FUC-*Tm*, empleando como sustrato donador *p*NP-Fuc y lactosa como sustrato aceptor. En esta investigación se analizó el efecto de la relación sustrato donante/sustrato aceptor (D:A), en proporciones 0.001 a 0.828, se observó que, al disminuir dicha relación, la tasa de síntesis fue aumentando. Se alcanzó un rendimiento máximo de 32.5% a una relación D:A de 0.001. Además, en la identificación del FucO se determinó que posiblemente se trataba de 2'FL. Al realizar una espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), se demostró que el oligosacárido sintetizado correspondía a un trisacárido fucosilado. Los resultados del espectro de masas (MS/MS), junto con hidrólisis ácida y cromatografía

liquida de alta resolución (HPLC) del compuesto hidrolizado permitieron confirmar que era fucosilactosa.

Por otro lado, Guzmán-Rodríguez *et al.*, (2021) realizaron la síntesis de FucOS con FUC-*Tm* inmovilizada en Eupergit® CM. En esta investigación la enzima se inmovilizó eficientemente sobre el soporte sin afectar la síntesis de FucOS. La síntesis se llevó a cabo utilizando *p*NP-Fuc 3.5 mM y lactosa 146 mM, no se observó ningún efecto sobre la relación síntesis/hidrólisis cuando se inmovilizó la FUC. Además, se estudió el efecto de la concentración inicial de sustratos y se demostró que un aumento de la concentración del sustrato aceptor mejoró los rendimientos de los FucOS independientemente de la inmovilización de la enzima. Los rendimientos de síntesis fueron de 38.9% con la enzima inmovilizada y 40.6% con la enzima no inmovilizada.

Robles-Arias *et al.*, (2021a) estudiaron el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad hidrolítica y de transfucosilación de la FUC-*Tm*. Se determinó que el pH óptimo para llevar a cabo la reacción de hidrólisis que cataliza la enzima antes mencionada se encuentra en valores dentro de un intervalo de 6 a 8, por otro lado, en el caso de las reacciones de transfucosilación se observó que entre los valores de pH 7 y 10 se obtuvo la mayor conversión. Por otro lado, la temperatura más alta en este estudio para llevar a cabo tanto la reacción de hidrólisis como la de transfucosilación fue de 95 °C. Al hacer la optimización de la reacción de transfucosilación lograron obtener rendimientos de FucOS más altos en tiempos de reacción más cortos y además utilizando una menor cantidad de enzima. Asimismo, se indica que posiblemente los FucOS que se lograron sintetizar tendrían las funciones biológicas que presentan los HMOs, lo cual los haría útiles para poder utilizarlos como aditivos en productos como las fórmulas infantiles.

De igual forma, Robles-Arias *et al.*, (2021b) estudiaron los efectos de los solventes orgánicos miscibles en agua en el sistema de reacción para la síntesis de FucOS utilizando la FUC-*Tm*. En la primera etapa de esta investigación se determinó el pH, la temperatura y la concentración óptima de enzima para llevar a cabo la reacción de transfucosilación, en el caso del pH el intervalo óptimo para llevar a cabo la reacción fue de 7 a 10 mientras que no fue posible encontrar una temperatura óptima para la reacción (la mayor temperatura probada en este estudio fue de 95 °C), asimismo, se demostró que al utilizar una concentración de enzima de 0.013 µg/mL se obtuvo la mayor actividad de transfucosilación, ya que al aumentar la concentración de la enzima, la reacción dominante fue la hidrólisis. Por otro lado, se probaron tres diferentes disolventes orgánicos acetona ( $a_w$ : 0.97),

acetonitrilo ( $a_w$ : 0.96) y dimetilsulfóxido (DMSO) ( $a_w$ : 0.99), se demostró que la presencia de DMSO y acetona mejoraron la síntesis de FucOS, la mayor síntesis se logró en el medio con acetona seguido de DMSO y acetonitrilo, demostrando que un cambio en el valor de  $a_w$  por adición de medios orgánicos mejoró los rendimientos de la reacción de transfucosilación.

## **2.5 Métodos computacionales o *In silico***

El avance tecnológico ha cambiado la forma clásica del estudio en todas las áreas de la ciencia y esto ha traído a su vez nuevas formas de entender diferentes procesos. Un ejemplo son los métodos computacionales o *in silico*.

Se considera que los estudios *in silico* forman parte de una rama de la biología computacional, que tiene como objetivo investigar y examinar procesos biológicos a través de simulaciones computacionales (Vargas-Aguilar & Fuentes-Condori, 2021).

Estas nuevas herramientas han permitido: visualizar la organización tridimensional de numerosas moléculas, estudiar el rol y función de diferentes proteínas o bien de una célula completa, e incluso poder llegar a predecir respuestas a estímulos a través del uso de experimentos *in silico* (Vargas-Aguilar & Fuentes-Condori, 2021).

Por lo tanto, es posible decir que estos métodos ofrecen una gran variedad de herramientas dependiendo del objetivo por el cual se requiera estudiar un proceso, resaltando que son útiles para entender y hacerlos más eficientes.

### **2.5.1 Modelamiento molecular**

El modelamiento molecular es un método computacional utilizado para llevar a cabo la representación tridimensional de las moléculas, con el objetivo de poder determinar sus propiedades, entender o explicar los comportamientos observados experimentalmente, y predecir su comportamiento ante nuevos estímulos (López-Pérez, 2017).

El modelamiento molecular tiene gran importancia en todos los sectores industriales en donde tanto el comportamiento y mejora de los productos y procesos dependen de las propiedades de algún compuesto o material. En el caso de las proteínas su función depende de su plegamiento, el cual se encuentra reflejado en su representación tridimensional correcta (Shapiro & Harris, 2008).

Debido a ello es una herramienta muy utilizada para poder interpretar, complementar, predecir o sustituir métodos experimentales, lo que ha llevado a un ahorro de material y

tiempo, así como el poder simplificar el trabajo realizado. Por esta razón es un método que se ha aplicado en diferentes industrias como la farmacéutica (diseño de nuevos fármacos) química (diseño de catalizadores, mejoramiento de mecanismos de reacción, formulaciones) o en la química atmosférica (Casanovas *et al.*, 2005).

### **2.5.2. Acoplamiento molecular**

La gran mayoría de procesos biológicos están determinados por la interacción de receptores moleculares y sus respectivos ligandos. El acoplamiento molecular es un método computacional utilizado para predecir y evaluar la mejor posición para que se pueda llevar a cabo la interacción entre un ligando (una molécula pequeña) y un receptor (por lo general una proteína), y así determinar la unión más favorable de acuerdo con su estabilidad y especificidad. Este método bioinformático no tiene una regla que se adapte a todos los casos y la mayoría de los programas empleados con esta finalidad, tienen diferentes métodos para tratar cada caso en particular (Ballón & Granados, 2019).

Por lo tanto, esta técnica tiene como objetivo averiguar la forma más probable en que se puede llevar a cabo la unión entre el ligando y el receptor. En otras palabras, se refiere a la conformación del complejo receptor-ligando que requiera menor energía para formarse y que además la unión se efectúe en el sitio idóneo (Scior *et al.*, 2007). Este proceso requiere de dos pasos: la predicción de la conformación del ligando (orientación y posición) en el sitio activo de la proteína y la determinación de la afinidad de unión que permitirá realizar una clasificación por medio de una función de puntuación, por lo que a su vez estos pasos se relacionan con los métodos de muestreo y puntuación con los que se evalúa la convergencia a la menor energía libre de Gibbs de unión ( $\Delta G_u$ ) (Meng *et al.*, 2011).

En los últimos años, se han creado más de 60 herramientas y programas de acoplamiento con diferentes usos, ya que las estrategias de unión del ligando son diversas, dentro de los programas desarrollados, se pueden clasificar en enfoques de construcción de los complejos Proteína-Ligando, por ejemplo, *FlexX* emplea el de construcción incremental, también están los algoritmos basados en formas como el programa *DOCK*, así como los algoritmos genéticos que emplea *GOLD* y *AutoDock (AD)*, también están las simulaciones de Monte Carlo en *LigandFit*, entre otros. Los programas de acoplamiento más utilizados son *AD*, el único de acceso libre, así como los programas comerciales *GOLD* y *Glide* (Pagadala *et al.*, 2017).

En estudios en donde se ha empleado el uso de *AD* se ha demostrado que es una herramienta eficaz, con la que se puede predecir con mayor exactitud las conformaciones y  $\Delta G_u$  del complejo Proteína-Ligando. Asimismo, tiene campos de fuerza adecuadamente evaluados como el de *Amber* empleado en la versión 4.2. Cuenta con un *grid* (cuadrícula) efectivo para acotar el área de búsqueda en la zona de interés en la proteína, y permite emplear un proceso de acoplamiento flexible, tomando en cuenta el movimiento de un número limitado de aminoácidos, permitiendo que sean sometidos a cambios conformacionales con el objetivo de buscar la mejor posición del ligando y lograr una mayor afinidad a la proteína (Biesiada *et al.*, 2011).

### **2.5.3 Dinámica molecular (DM)**

La dinámica molecular (DM) es una simulación creada por computadora que permite recrear un sistema (físico, químico o biológico) con el objetivo de poder analizar su comportamiento y evolución a lo largo del tiempo, calculando la fuerza que existe entre los átomos en el sistema a través de la integración de las ecuaciones del movimiento de Newton. A nivel atómico se trata de un método de modelado y simulación que nos permite obtener trayectorias de un sistema (Lozano-Aponte & Scior, 2014). Se trata de una herramienta de gran importancia y utilidad en la caracterización de los movimientos estructurales, la flexibilidad, y el mecanismo de acción de las enzimas, contribuyendo a la obtención de conocimientos más extensos sobre la relación estructura-función (Konar *et al.*, 2019). A diferencia de otros algoritmos en esta técnica se establece flexibilidad tanto en el ligando como en el receptor de una forma más efectiva, sin embargo, se trata de un método muy laborioso y tardado, ya que progresa en pasos cortos (Meng *et al.*, 2011).

En sistemas biológicos por ejemplo, ayuda a describir el comportamiento de una proteína u otras moléculas complejas bajo ciertas condiciones de interés. Este tipo de herramientas han demostrado tener buena correlación con resultados obtenidos en experimentos *in vitro* (Lozano-Aponte & Scior, 2014).

Las simulaciones resultantes de esta técnica son muy valiosas por muchas razones, entre las que destacan que son capaces de capturar la posición y movimiento de cada átomo por el cual está formado el sistema, en cada punto en el tiempo, además, de conocer y poder controlar las condiciones de la simulación como por ejemplo la conformación inicial de una proteína, que ligandos están unidos a ella, si en el sistema están presentes otras moléculas, el estado de protonación, temperatura, entre otros. Por lo tanto, se pueden llevar a cabo simulaciones en diferentes condiciones para identificar los efectos de una gran variedad de

perturbaciones moleculares como por ejemplo el estudio de cambio de fases, solubilidad de moléculas, conformación de menor energía y cambios estructurales en proteínas, etc. (Hollingsworth & Dror, 2018).

Los paquetes de *software* de DM se han vuelto más sencillos de utilizar, con un mejor apoyo para los no expertos, pero también han mejorado su alcance. Las opciones más comunes de programas para DM incluyen *GROMACS*, *NAMD*, *AMBER*, *CHARMM*, *Desmond* y *OpenMM* (Hollingsworth & Dror, 2018). Los programas *GROMACS* y *NAMD*, han sido compatibles con la interfaz para el uso de multiprocesadores (MPI) durante mucho tiempo. Debido a ello, si se tiene la capacidad de utilizar una gran cantidad de núcleos de procesamiento de una computadora o super computadora de manera simultánea, los MPI pueden reducir significativamente el tiempo de cálculo (Hospital *et al.*, 2015).

En la Figura 7 se pueden observar las etapas de una simulación de DM de manera general, resaltando que dependiendo del programa utilizado es posible calcular diferentes parámetros, además de poder analizar la trayectoria del sistema a través de visualizadores moleculares con interfaz gráfica (en forma de animación).

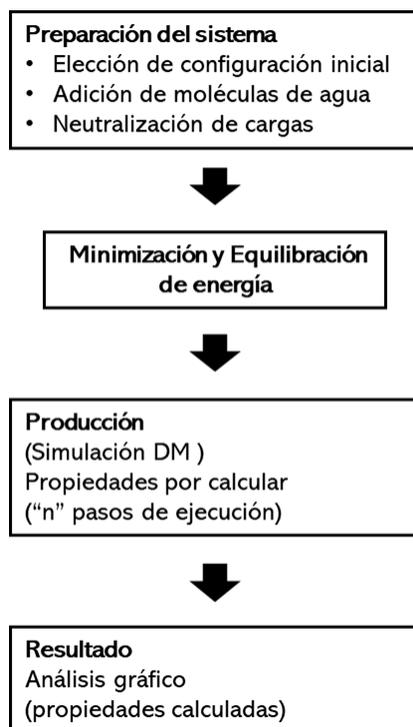


Figura 7. Pasos generales de simulación por DM. Modificado de Lozano-Aponte y Scior, (2014).

### 2.5.4 Estudios *in silico* en fucosidasas

Debido al avance y los beneficios de la utilización de los métodos *in silico*, se han empleado en estudios de enzimas de gran relevancia como las FUCs, las cuales han sido analizadas a través de estas herramientas, con el fin de poder determinar la relación entre su actividad catalítica y estructura, además de definir, completar y explicar su mecanismo de acción bajo diferentes condiciones.

Klontz *et al.* (2020) realizaron un estudio sobre el mecanismo de reacción de transfucosilación de las FUCs pertenecientes a la familia GH29A, entre las que se encuentra a la FUC proveniente de *Lactobacillus casei* (AlfC) y sus mutantes. Para poder describir la relación entre la estructura y función de AlfC, se utilizó una estructura obtenida por difracción de rayos X con una resolución de 2.5 Å, se resalta que AlfC carece del dominio C-terminal (Figura 8 A) y adquiere una forma de tetrámero en solución (Figura 8 B).

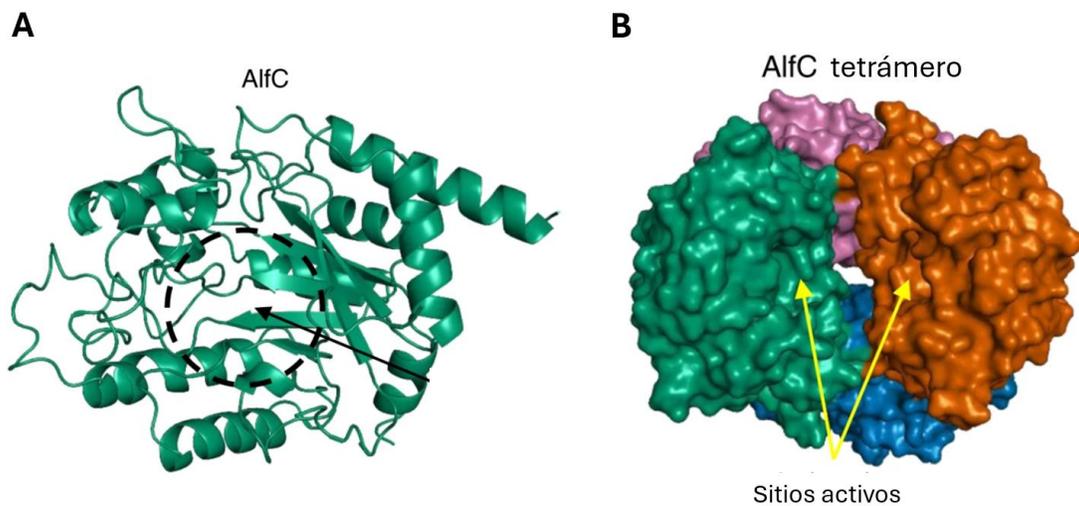


Figura 8. Estructura de AlfC (A) estructura de AlfC que exhibe la ausencia de un dominio C-terminal (B) ensamblaje tetrámero de AlfC (Adaptada de Klontz et al. 2020).

Además, se llevó a cabo un análisis de acoplamiento molecular, simulando la unión con la fucosa corroborando que el ligando no genera cambios conformacionales significativos. Esta investigación toma como referencia el mecanismo seguido por la FUC de *B. thetaiotaomicron* (BT2970) reportado por Van Bueren *et al.* (2010) en donde la hidrólisis se lleva a cabo por una reacción de doble desplazamiento de Koshland. En esta reacción el aminoácido que actúa como nucleófilo catalítico y los oxígenos del aminoácido que actúa como ácido/base general se encuentran separados por una distancia de aproximadamente de 5.5 Å, lo que a su vez da como resultado una distancia entre los carbono alfa de ~12 Å como es posible observar representado en la Figura 9.

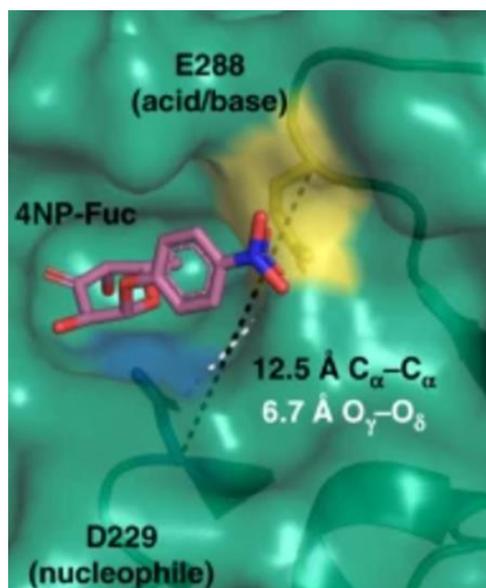


Figura 9. Estructura de BT2970 (PDB-ID: 2WVU) unida a pNP-Fuc (Obtenido de Klontz *et al.* 2020).

Un aspecto interesante de esta investigación fue que realizaron un estudio comparando la estructura inactiva de AlfC en complejo con el sustrato pNP-Fuc, un análisis de la estructura y mecanismo de BT2970, así como la estructura abierta que se ha reportado en la FUC de *Bifidobacterium longum* subsp *Infantis* (BiAfcB), con lo cual se intuye que AlfC también estaría formando estados estructurales abiertos y cerrados que determinan que la reacción se lleve o no a cabo (Figura 10). Por otro lado, se realizó una simulación de dinámica molecular con el fin de poder describir con mayor profundidad el mecanismo de reacción y los aminoácidos que participan en la catálisis. Lo que permitió suponer que el estado activo de AlfC es a través de una conformación cerrada donde el aminoácido Asp<sup>200</sup> actúa como nucleófilo mientras que Asp<sup>242</sup> como ácido/base general (teniendo dos posibilidades más

de residuos que podrían realizar esta función siendo el Glu<sup>39</sup> y Glu<sup>274</sup>). Asimismo, se llevó a cabo un modelamiento molecular utilizando diferentes sustratos con el fin de entender la especificidad de AlfC, con lo cual se intuye que la presencia de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en un sitio adyacente al sitio activo favorece la formación del estado cerrado y por lo tanto la transfucosilación.

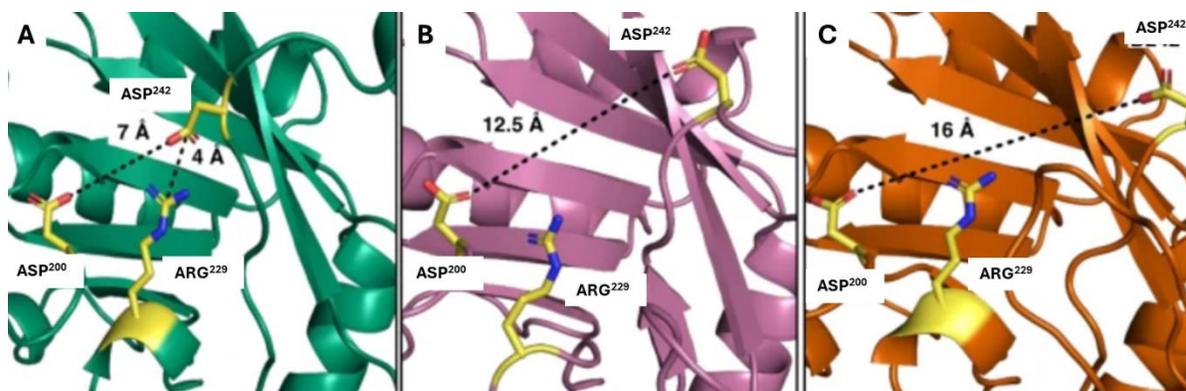


Figura 10. Estructura y dinámica del sitio activo de AlfC (A) conformación cerrada; (B) conformación intermedia; (C) conformación abierta (Adaptada de Klontz et al. 2020).

Por otro lado, con el objetivo de seleccionar catalizadores biológicos capaces de llevar a cabo la síntesis de disacáridos de fucosil-N-acetilglucosamina, Liu *et al.* (2020) realizaron un análisis de secuencia de 12 FUCs putativas y una FUC conocida de *Bacteroides fragilis* NCTC9343 denominada BF3242. Posteriormente para hacer la selección de las FUC, se realizó un análisis de secuencia y una construcción de árboles filogenéticos de donde se seleccionaron únicamente 5 de las 12 enzimas putativas y la conocida. En esta investigación se obtuvo como resultado que BF3242, presentó la mayor actividad de transfucosilación, siendo capaz de sintetizar Fuc- $\alpha$ -1,3/1,6-GlcNAc con rendimiento del 79% utilizando pNP-Fuc como sustrato donante. Adicionalmente, se llevó a cabo una evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima, donde se observó que la temperatura afecta la proporción de dos productos regioisoméricos (Fuc- $\alpha$ -1,3-GlcNAc y Fuc- $\alpha$ -1,6-GlcNAc), por lo que después se realizó un modelado por homología de la enzima, para llevar a cabo una simulación de dinámica molecular a diferentes temperaturas que permitiera describir mejor por que la temperatura causaba ese efecto.

A través de este último estudio, se lograron identificar regiones más sensibles a la temperatura, las cuales presentaron mayor flexibilidad de acuerdo con los resultados

obtenidos en los valores de la fluctuación cuadrática media de aminoácidos (*RMSF*) (valores de *RMSF* más altos coinciden con más flexibilidades proteicas y potencialmente menos estabildades térmicas). El *Loop-4* (estructura secundaria en desorden con mayor fluctuación) mostró cambios significativos a lo largo de las simulaciones, lo que sugiere se trataba de la región más sensible a la temperatura. En la Figura 11 se muestra que el valor *RMSF* para el *Loop-4* a 300 K fue ~0.43 nm y aumentó a 0.67 nm a 350 K, lo que indica que fluctúa de manera más flexible que otras regiones con el aumento de la temperatura. En estudios anteriores, las regiones flexibles que se identificaron por DM son relevantes para la actividad de la enzima, por lo que dichas regiones podrían influir en la configuración del producto, lo que explicaría el efecto sobre la proporción de los productos regioisoméricos (Fuc- $\alpha$ -1,3-GlcNAc y Fuc- $\alpha$ -1,6-GlcNAc).

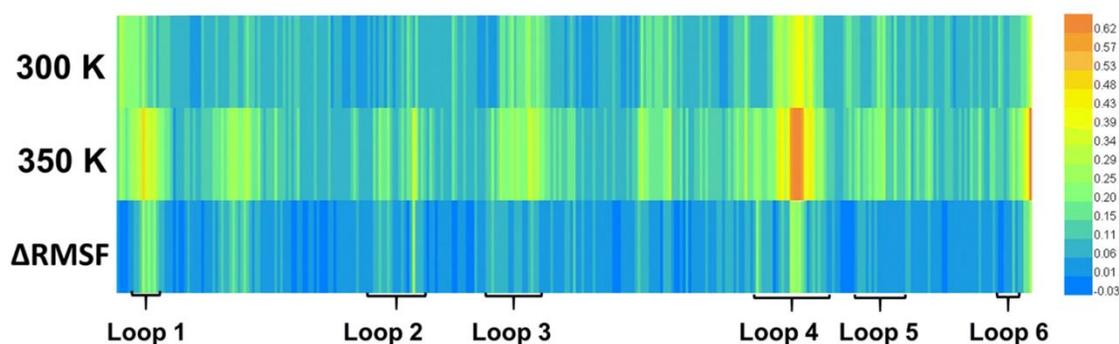


Figura 11. *RMSF* para *Ca* en BF3242 a 300 K y 350 K (Obtenido de Liu et al. 2020).

Así también, Pavón-Chimal *et al.* (2022a) realizaron un estudio *in silico* centrado en la interacción entre la lactosa como sustrato aceptor y el *p*NP-Fuc como sustrato donante con la enzima FUC-*Tm*. En el primer paso de esta investigación se llevó a cabo el acoplamiento molecular entre el *p*NP-Fuc y la enzima, como se muestra en la Figura 12, se señalan los aminoácidos que forman parte del bolsillo catalítico y que además entran en contacto con la fucosa, por un lado, el anillo aromático de *p*NP-Fuc formó interacciones pi-alquilo con Leu<sup>50</sup> y pi-sigma con Met<sup>225</sup>, estabilizando el aglicón. Por otro lado, el C6 de la fucosa formó interacciones pi-alquilo con los aminoácidos aromáticos Phe<sup>290</sup>, Phe<sup>32</sup>, Trp<sup>222</sup> y His<sup>34</sup>, reflejando la hidrofobicidad del sitio activo. Además, el residuo catalítico Asp<sup>224</sup> formó un enlace de hidrógeno con el C4 de la fucosa (Figura 12 A). El otro residuo catalítico, Glu<sup>266</sup>, está a 4.1 Å del C1 de la fucosa con una interacción carbono-hidrógeno (Figura 12 B) y la Arg<sup>254</sup> formó un enlace de hidrógeno con el oxígeno endocíclico de la fucosa. Es importante resaltar que para este estudio se llevó a cabo el acoplamiento molecular únicamente

empleando como base la estructura cristalográfica con código de la base de datos de proteínas; PDB ID: 2ZWY, y comparando con la estructura en complejo (PDB ID: 1ODU).

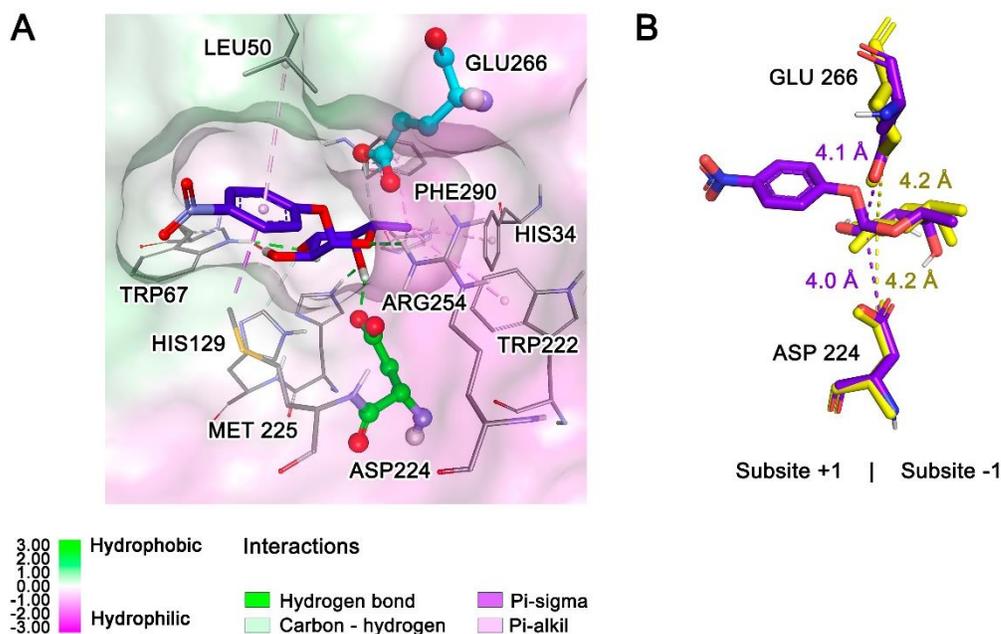


Figura 12. Acoplamiento molecular entre pNP-Fuc y FUC-Tm **(A)** interacción entre el sitio activo y el pNP-Fuc **(B)** distancia entre los residuos catalíticos y el ligando, el subsite -1 indica dentro de la cavidad del sitio activo y el subsite +1, fuera de la cavidad del sitio activo (Obtenido de Pavón-Chimal et al. 2022a).

Posteriormente, se realizó el acoplamiento molecular en presencia de fucosa, el cual se repitió hasta que las moléculas de lactosa se colocaron cerca del sitio activo para examinar la interacción que favorece la transfucosilación y comprender el efecto de la concentración de sustrato en la síntesis de FucOS. Este trabajo demostró, que existe una interacción entre la enzima y la lactosa en sitios de unión favorables distintos al sitio activo (Figura 13). Lo que demuestra que además de una unidad de fucosa en el sitio activo de la enzima, se necesitan varias moléculas aceptoras (lactosa) para ocupar otros sitios de unión favorables en la enzima, hasta acercarse al sitio activo para completar la reacción. También se demostró por acoplamiento molecular que la enzima tiene menor afinidad por las moléculas sintetizadas que por el pNP-Fuc, lo que contribuye al aumento del rendimiento de la reacción de transfucosilación.

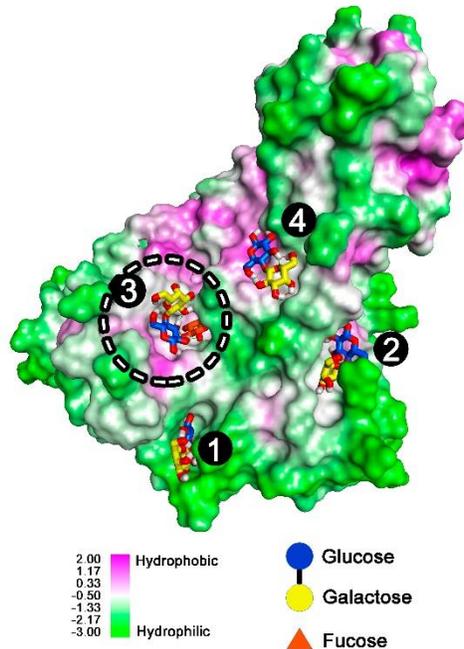


Figura 13. Acoplamiento molecular acumulativo con lactosa y enzima en complejo con fucosa. (Obtenido de Pavón-Chimal et al. 2022a).

Del mismo modo, Pavón-Chimal *et al.*, (2022b) realizaron un análisis *in silico* con el fin de describir las interacciones en el sitio activo para la formación del complejo enzima-sustrato en FUC pertenecientes a la familia GH29, para lo cual se compararon tres enzimas provenientes de microorganismos diferentes: FUC-*Tm* y *Lactobacillus casei* (AlfC) pertenecientes a la familia GH29A y *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* (BiAfcB) de la familia GH29B. A través de un análisis por modelamiento molecular, se comparó la estructura del sitio activo (Figura 14), con lo que se demostró que en las enzimas pertenecientes a la familia GH29A se encuentra un residuo de arginina (Arg) que se conserva en esta subfamilia (Arg<sup>254</sup> en FUC-*Tm* y Arg<sup>229</sup> en AlfC, Figura 14 A), este residuo resulta ser de gran importancia ya que forma un enlace con el oxígeno endocíclico de la fucosa, por lo que contribuye en la interacción con el sustrato, mientras que en BiAfcB perteneciente a la familia GH29B este residuo no está conservado. Sin embargo, en BiAfcB se encuentran tres residuos (Trp<sup>213</sup>, Glu<sup>237</sup> y Asp<sup>283</sup>, Figura 14 B) asociados a un sitio de unión a galactosa y que además se conservan en la estructura de otras fucosidasas pertenecientes a la familia GH29B.

Además, se corroboró que el Asp que actúa como nucleófilo catalítico se conserva en las tres fucosidasas, en cambio el residuo que actúa como ácido/base general se conserva en FUC-*Tm* como Glu<sup>266</sup> y como Glu<sup>217</sup> en *BiAfcB*, mientras que para AifC de acuerdo con lo antes mencionado por Klontz *et al.* (2020) tiene tres residuos que podrían llevar a cabo esta función Glu<sup>39</sup>, Asp<sup>242</sup> y Glu<sup>274</sup> de los cuales Asp<sup>242</sup> parece ser el más probable. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio por acoplamiento molecular para analizar la afinidad del sitio activo de las enzimas, con lo cual se demostró que las enzimas pertenecientes a la familia GH29A presentan una mayor afinidad por el sustrato *pNP-Fuc* a diferencia de la perteneciente a la familia GH29B, debido a que las interacciones que se forman con el donante de fucosa no son exactamente las mismas por lo que determinan la afinidad del sitio activo, estos resultados coinciden con lo obtenido en estudios *in vitro*.

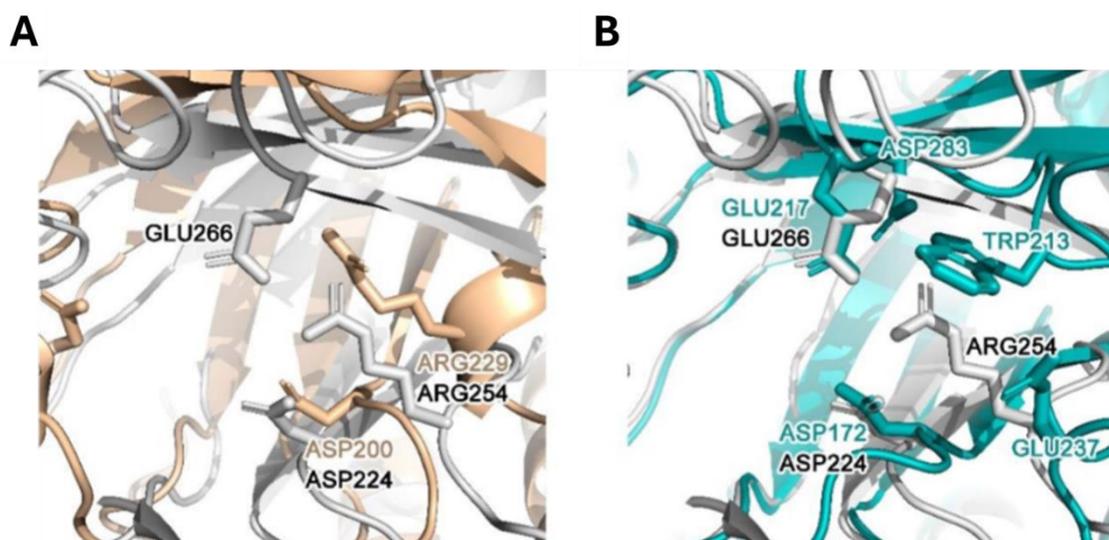


Figura 14. Alineamiento del sitio activo de las FUCs de las subfamilias GH29A y GH29B (A) FUC-*Tm* (color gris) y AifC (color marrón), dos FUCs de la familia GH29A (B) FUC-*Tm* (color gris) y *BiAfcB* (color azul) de la familia GH29B (Obtenido de Pavón-Chimal *et al.* 2022b).

Por otro lado, Liu *et al.* (2022), utilizaron las herramientas computacionales como el análisis de secuencia en conjunto con el modelado por homología para poder simular el modelo estructural de la FUC de *Pseudoalteromonas* sp. OU03 (PsaFuc), además de predecir los componentes del sitio activo basándose en el modelo desarrollado.

Koval'ová *et al.* (2022), utilizaron la bioinformática para encontrar secuencias homólogas que permitieran la construcción estructural de la FUC denominada  $\alpha$ -L-F2Wt, una enzima intracelular de *Paenibacillus thiaminolyticus*. Además, realizaron un experimento de acoplamiento molecular para complementar la investigación sobre la especificidad de sustrato de la enzima, con lo cual se demostró que la conformación del sitio activo modula la especificidad del sustrato. Al tener un sitio activo estrecho en los subsitios -1 y +1 la enzima presenta preferencia por los sustratos disacáridos, sin embargo, también es capaz de escindir trisacáridos con diferentes enlaces glucosídicos y un hexasacárido estudiado.

Por otro lado, Hou *et al.* (2023), llevaron a cabo el estudio del efecto del  $Mn^{2+}$  en la xilanasas en complejo con xilosa, evaluando dos concentraciones diferentes del ion (4 y 6 mM), a través de un estudio *in silico*. En dicha investigación, se comprobó que las variaciones encontradas en los parámetros de DM se debían a la fluctuación de ciertos aminoácidos al estar presente el  $Mn^{2+}$ , los cuales forman parte del sitio catalítico de la enzima. Asimismo, determinaron cambios en el volumen del bolsillo catalítico de 55 a 387 Å, haciendo que este sea más accesible a los sustratos, mejorando la actividad de la enzima para obtener oligosacáridos de feruloil. Además, los resultados de la simulación también revelaron que la adición de  $Mn^{2+}$  resultó en un valor *RMSD* bajo en comparación con la ausencia de  $Mn^{2+}$  y ayudó a estabilizar el complejo.

### 3 Justificación

Dado que, informes anteriores han demostrado que la FUC-*Tm* puede llevar a cabo reacciones de transfucosilación. El estudio de esta enzima y las condiciones de reacción que conducen a la síntesis de FucOS representa un campo de investigación de gran interés.

Así también, la importancia de la investigación relacionada con la síntesis de HMOs radica en la actividad biológica que éstos presentan al ser consumidos, además de la imposibilidad de disponer de ellos en cantidades y con la pureza adecuada para ser incorporados en fórmulas lácteas o como productos farmacéuticos hacen necesario el desarrollo de métodos alternativos de obtención.

En diversas investigaciones en donde se han utilizado sales inorgánicas, se ha comprobado que su presencia aumenta el rendimiento de la síntesis de HMOs, por lo que este trabajo busca describir la forma en que interactúan iones bivalentes como el calcio, magnesio, manganeso y cobre con la FUC-*Tm* y su relación con la síntesis de FucOS, a través de un enfoque *in vitro* mediante reacciones enzimáticas y por modelamiento molecular *in silico* con la finalidad de esclarecer el efecto de la interacción de los iones en la actividad de la enzima.

## 4 Hipótesis

Si los iones bivalentes (calcio, magnesio, manganeso y cobre) tienen un efecto positivo en la síntesis de oligosacáridos fucosilados se podría relacionar con cambios en el entorno del sitio activo de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes iones bivalentes (calcio, magnesio, manganeso y cobre) sobre la actividad de la enzima para conocer su efecto en la síntesis de oligosacáridos fucosilados utilizando la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*, mediante experimentos *in vitro* y modelamiento molecular *in silico*.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la concentración de diferentes iones bivalentes (calcio, magnesio, manganeso y cobre) sobre la actividad hidrolítica de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima*.
2. Determinar la concentración de los iones bivalentes (calcio, magnesio, manganeso y cobre) que permita obtener la mayor síntesis de oligosacáridos fucosilados.
3. Realizar un estudio de modelamiento molecular *in silico* de la interacción del ion seleccionado de las etapas anteriores con la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* para conocer su relación con la síntesis de oligosacáridos fucosilados.

## 6 Plan de trabajo

Para poder cumplir con los objetivos establecidos, se desarrolló el siguiente plan de trabajo el cual estuvo dividido en tres etapas como se muestra en la Figura 15.

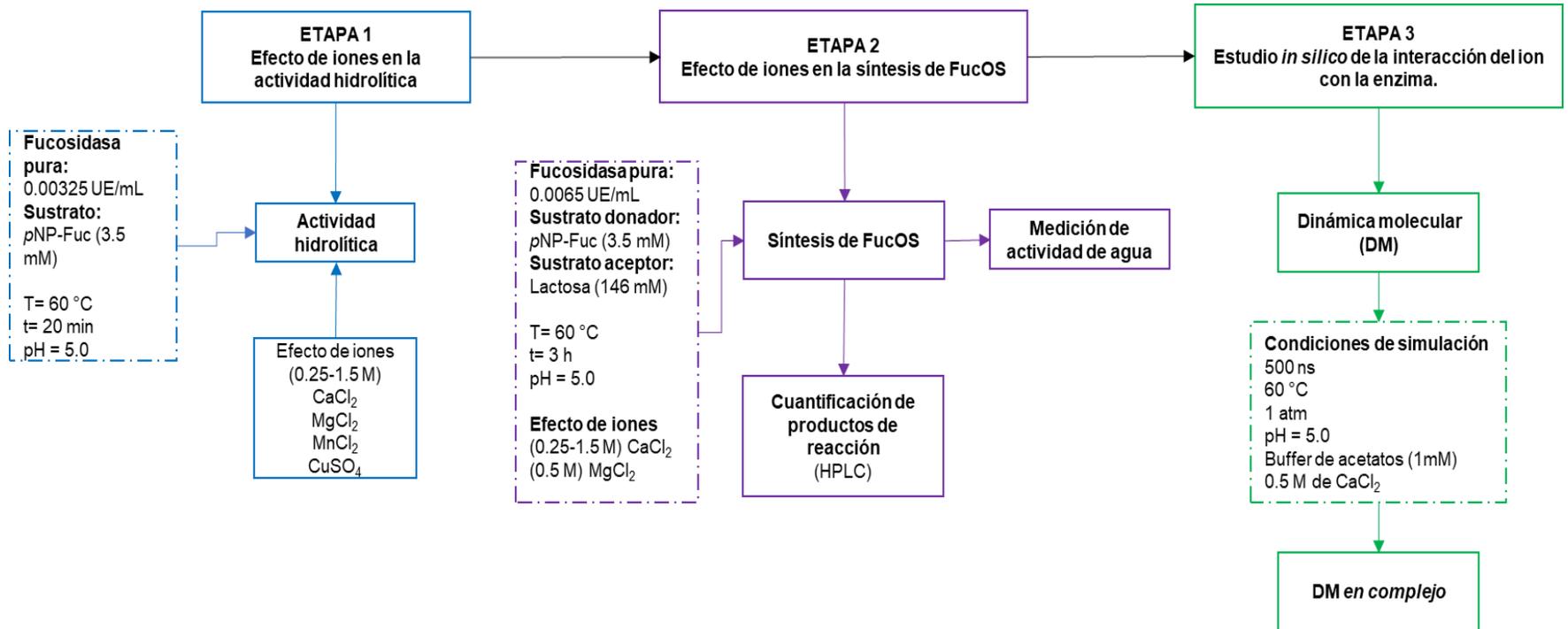


Figura 15. Plan de trabajo.

## 6.1 Materiales y métodos

### 6.1.1 Determinación del efecto de iones bivalentes sobre la actividad hidrolítica

La actividad hidrolítica de la FUC se determinó empleando *p*NP-Fuc (3.5 mM) como sustrato (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), se usaron 0.00325 U/mL de FUC-*Tm* (Megazyme, Leinster, Irlanda) en regulador de acetatos 1 mM, pH 5.0, las reacciones se incubaron por 20 min a 60 °C con 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 M de CaCl<sub>2</sub> (J.T. Baker, Países Bajos), MgCl<sub>2</sub> (J.T. Baker, Países Bajos), MnCl<sub>2</sub> (MEYER, México) y CuSO<sub>4</sub> (J.T. Baker, Países Bajos). A la par se llevó a cabo una reacción control en ausencia de los iones. El *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado se determinó mediante espectrofotometría visible utilizando un espectrofotómetro UV-1601 (Shimadzu, Kyoto, Japón) a 410 nm tomando mediciones cada minuto e interpolando este valor en una curva estándar de dicho compuesto (Anexo, Figura 1 A). Una unidad de fucosidasa fue definida como la cantidad de enzima que hidrolizó un μmol de *p*NP-Fuc por minuto a pH 5.0 y 60 °C. En este trabajo la actividad hidrolítica se cuantificó como la concentración (mM) de *p*NP liberado por unidad de tiempo (min).

### 6.1.2 Determinación del efecto de iones bivalentes sobre la actividad de transfucosilación

Por otro lado, la actividad de transfucosilación de la FUC se determinó empleando *p*NP-Fuc (3.5 mM) como sustrato donador y lactosa como sustrato aceptor (146 mM), se usaron 0.0065 U/mL de FUC-*Tm* (similar a lo utilizado por Guzmán-Rodríguez 2018c), siendo el doble de unidades en comparación con lo usado en el estudio de la actividad hidrolítica, debido a que si se empleaba la misma concentración de enzima, el tiempo de reacción para llevar a cabo la síntesis de FucOS sería muy largo, se usó un regulador de acetatos 1 mM, pH 5.0. La mezcla de reacción se incubó a 60 °C durante 3 h en una incubadora de hibridación combi-SV12 (FINEPCR, República de Corea del Sur) y la reacción se detuvo en intervalos de 30 min hasta 3 h agregando NaOH 0.3 M. La actividad de transfucosilación se determinó tanto en ausencia como en presencia de 0.25, 0.5, 1 y 1.5 M CaCl<sub>2</sub> (J.T. Baker, Países Bajos) y 0.5 M de MgCl<sub>2</sub> (J.T. Baker, Países Bajos). El *p*NP liberado se determinó mediante espectrofotometría visible a 410 nm tomando mediciones cada minuto e interpolando este valor en una curva estándar de dicho compuesto (Anexo, Figura 2 A). Además, se calculó la relación entre la velocidad de transfucosilación sobre la velocidad de hidrólisis ( $V_{\text{trans}}/V_{\text{hid}}$ ) para la concentración óptima de síntesis y se determinó el valor de  $a_w$  de las diferentes soluciones empleadas para llevar a cabo cada reacción a través de un

medidor AQUALAB PRE. La concentración de FucOS se determinó por HPLC como se describe en la sección 6.1.3.

La actividad de hidrólisis y transfucosilación en estas reacciones se expresó como mM de pNP liberado o FucOS sintetizados (según el caso) por minuto a pH 5.0 y 60 °C.

### 6.1.3 Cuantificación de oligosacáridos

Los FucOS producidos a través de las reacciones de transfucosilación se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una bomba *Lab Alliance Serie II* (Sci-entific Systems, Pennsylvania, EE. UU.). Se empleó una columna HC-75 (H<sup>+</sup>) de 300 × 7.80 mm (Hamilton, Nevada, EE. UU.) colocada en un horno a 75 °C. Como fase móvil se utilizó agua desionizada (18.2 Ω), con un flujo de 0.3 mL/min. Se usó un detector de dispersión de luz modelo *SOFTA 300S* (Chrom Tech, Minnessota, EE. UU.), con una presión de nitrógeno de 62.5 psi, una temperatura en el nebulizador de 10 °C y una temperatura de evaporación de 45 °C. Para determinar la concentración de FucOS se utilizó el programa *Clarity* versión 5.0.3.180 mediante el cual se calculó el área correspondiente al compuesto de interés, posteriormente se realizó la interpolación de las áreas obtenidas con un pico utilizando una curva estándar de rafinosa. En la Figura 16 se observa un ejemplo de un cromatograma obtenido por HPLC a partir de muestras de las reacciones de transfucosilación.

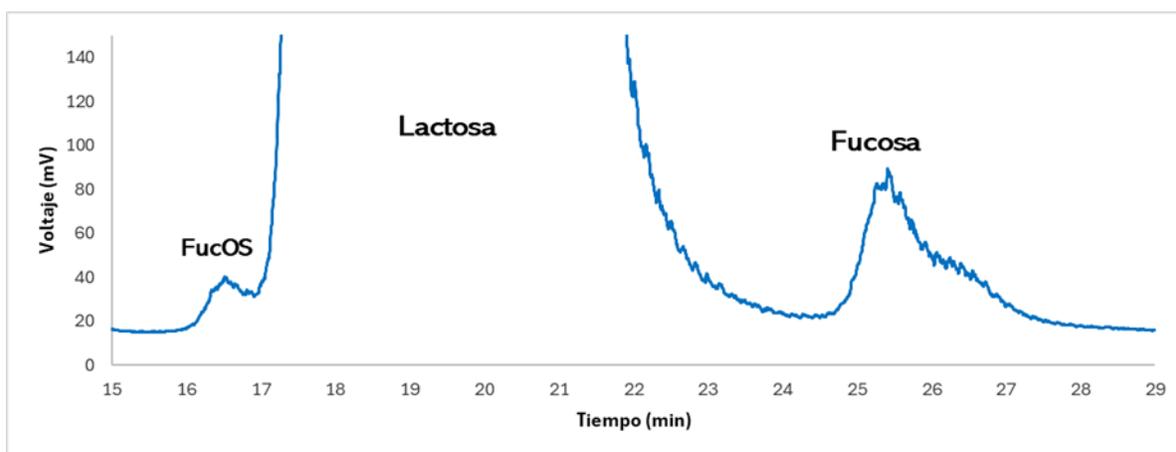


Figura 16. Cromatograma de síntesis de FucOS obtenido por HPLC.

## 6.2 Análisis *in silico* de la interacción entre enzima y $\text{Ca}^{2+}$

### 6.2.1 Dinámica molecular

A través de los experimentos *in vitro*, se determinó que el ion con el que se obtiene el mayor incremento en la actividad de la FUC-*Tm* es el  $\text{Ca}^{2+}$ . El mayor rendimiento en la reacción de transfucosilación se obtuvo con una concentración de 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$ . Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se llevó a cabo una simulación de DM con el objetivo de analizar el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad de la enzima y determinar su relación con la síntesis de FucOS.

Para la simulación de DM se empleó la estructura de FUC-*Tm* resuelta por difracción de rayos X en su conformación libre o Apo (FUC-*Tm*; PDB ID: 2ZWY; Res: 2.75 Å) (Wu *et al.*, 2009). Se establecieron 2 sistemas: en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (FUC-*Tm*) y en presencia de calcio (FUC-*Tm*- $\text{Ca}^{2+}$ ) empleando  $\text{CaCl}_2$  en la concentración óptima (0.5 M) obtenida del experimento *in vitro* antes mencionada.

Posteriormente, se llevó a cabo la protonación del modelo estructural, a través del servidor *CHARMM-GUI* empleando la herramienta *Solution Builder*, con la cual se agregaron los átomos de hidrógeno faltantes ( $\text{H}^+$ ) según los valores de pKa de los aminoácidos titulables calculados para pH 5.0. Del mismo modo, por medio de este servidor se generaron los sistemas para llevar a cabo las simulaciones de DM, donde se embebió la estructura de la enzima en una caja de agua con moléculas del tipo TIP3 en condiciones de frontera periódica con una distancia del centro de la enzima al borde de 10 Å. Luego, los sistemas se neutralizaron con una solución 1 mM de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y acetato ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ ) para cada modelo estructural protonado a pH 5.0. Además, en el sistema FUC-*Tm*- $\text{Ca}^{2+}$  se adicionaron los iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) correspondientes a la concentración óptima mencionada anteriormente.

Finalmente, los sistemas (FUC-*Tm* y FUC-*Tm*- $\text{Ca}^{2+}$ ) fueron optimizados mediante una simulación de DM utilizando el programa *GROMACS 2023.2*, empleando los campos de fuerza *CHARMM36*, a través de un sistema electrostático del tipo *Coulomb*. En primer lugar, la minimización de energía se llevó a cabo con el *algoritmo de minimización de descenso* hasta alcanzar una energía libre por debajo de 10 kJ/mol o un máximo de 50,000 pasos. Posteriormente, se realizaron dos procesos de equilibración por un período de 100 ps cada uno, esto para tener el acomodo de todas las moléculas del sistema, el primer proceso consistió en un ensamblaje canónico a volumen constante (NVT), seguido de un

ensamblaje isotérmico-isobárico (NPT), con una temperatura de 333.15 K y una presión de 1 atm. El termostato *V-rescale* (termostato *Berendsen* modificado) fue usado para controlar la temperatura y el método de *Parrinello-Rahman* para la presión.

Una vez que los sistemas fueron minimizados y equilibrados energéticamente, se llevaron a cabo las simulaciones de DM de cada sistema (en ausencia y presencia de calcio), a lo largo de 500 ns, cabe resaltar que la DM de cada sistema se realizó por triplicado.

Las trayectorias obtenidas de las simulaciones de DM para cada sistema fueron centradas con respecto a la proteína y posteriormente alineadas con relación a su rotación y traslación. Una vez que las trayectorias fueron centradas y alineadas se determinó la estabilidad de la proteína en cada sistema. Para ello, se graficó la desviación estándar de los valores de la cadena principal con respecto a los átomos pesado C, O y N (*RMSD*), así como la desviación estándar de la fluctuación de cada aminoácido de la cadena (*RMSF*), el radio de giro (Rg) y la energía cinética del sistema, para analizar el comportamiento y los cambios del sistema de la proteína en presencia de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las trayectorias de DM fueron analizadas empleando el software de visualización molecular *VMD v1.9.3*, además, los esquemas de interacción se produjeron mediante programas computacionales, como, *PyMOL v2.4.0* (Schrodinger LLC, 2015) y *BIOVIA Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295* (BIOVIA, Dassault Systemes, 2021).

### 6.2.2 Acoplamiento molecular

Para poder comparar como se afecta la unión entre el sustrato *p*NP-Fuc (ligando) y la FUC-*Tm*; en ausencia y en presencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$ , se decidió modelar la unión entre el ligando y la estructura de la enzima utilizando el programa *AutoDock* 4.2, para lo cual se empleó la estructura de FUC-*Tm* resuelta por difracción de rayos X en complejo con fucosa (FUC-*Tm*-Lig; PDB ID: 1ODU; Res: 2.80 Å) (Sulzenbacher *et al.*, 2004).

Posteriormente, se obtuvo la estructura 3D del compuesto *p*NP-Fuc con identificador de compuestos (CID): 82473 de la base de datos *PubChem* para realizar su optimización geométrica utilizando la teoría de la densidad funcional con el intercambio-correlación funcional de Perdew (Perdew *et al.*, 1996) y el conjunto de bases para todos los átomos en el orbital 6-311++G\*\* utilizando el programa *Gaussian 09 Rev A.02* (Frisch *et al.*, 2016).

A través del uso del programa *AutoDockTools* se establecieron los enlaces rotables del *p*NP-Fuc para evaluar la conformación en la que mejor se una a la enzima, además se delimitó el espacio de búsqueda del sitio de unión a través de una cuadrícula tridimensional basada en la posición de la fucosa del modelo *PDB-ID: 1ODU*, las dimensiones de la cuadrícula fueron las siguientes (x, y, z): 80, 80, 80. La estructura más favorable del complejo FUC-*Tm*-*p*NP-Fuc, definida por la menor  $\Delta G_u$ , se obtuvo mediante el método de búsqueda y puntuación del *Algoritmo Genético de Lamarckian* (Morris *et al.*, 2009). Los parámetros del algoritmo fueron de 200 evaluaciones, considerando una población inicial de 150 genes con un máximo de 27,000 generaciones y  $2.5 \times 10^7$  evaluaciones de energía. Las imágenes de los complejos de la FUC-*Tm* con el *p*NP-Fuc y los esquemas de las interacciones hidrofóbicas se obtuvieron utilizando los programas *VMD v1.9.3* (Humphrey *et al.*, 1996) y *PyMOL v2.4.0* (Schrodinger LLC, 2015).

Una vez obtenido el complejo FUC-*Tm*-*p*NP-Fuc se generaron los sistemas (en ausencia y presencia de calcio) para llevar a cabo las simulaciones de DM, como se describió en la sección 6.2.1, ahora por un periodo de tiempo de 100 ns.

Los valores de  $\Delta G_u$  de los complejos simulados por DM se estimaron utilizando cálculos de Mecánica Molecular/Área de Superficie de *Poisson-Boltzmann* (MM/PBSA) utilizando la herramienta *MMPBSA.py* (Valdés-Tresanco *et al.*, 2021).

## 7 Resultados y discusión

### 7.1 Efecto de iones bivalentes en la actividad hidrolítica de la enzima

En investigaciones previas se ha reportado un aumento en la actividad hidrolítica de algunas FUCs en presencia de iones como el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , así como la inhibición de la actividad por la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2018c; Liu *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2023). Este mismo comportamiento también ha sido informado en estudios realizados con otras hidrolasas (Arsov *et al.*, 2022; Du *et al.*, 2022; Jeilu *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024). Debido a ello, se decidió evaluar el efecto de la presencia de estos iones sobre la actividad hidrolítica de la FUC-*Tm*. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

#### 7.1.1 Efecto del calcio en la actividad hidrolítica de la enzima

El  $\text{Ca}^{2+}$  es uno de los iones comúnmente reportado como activador en diferentes hidrolasas. Aunque existe un reporte realizado por Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018c), en el cual se estudió el efecto de este ion sobre FUC-*Tm*, las condiciones de reacción en la presente investigación no fueron exactamente las mismas, como por ejemplo, las concentraciones probadas de este ion.

Se determinó la actividad hidrolítica de la FUC-*Tm* a diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$ . De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 17, se encontró que la actividad hidrolítica fue aumentando conforme se incrementó la concentración de  $\text{CaCl}_2$ . Lo anterior comprueba que la presencia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la reacción tiene un efecto activador sobre FUC-*Tm*. La mayor actividad fue obtenida con una concentración de 1 M de  $\text{CaCl}_2$  con un valor de  $0.265 \pm 0.01$  U/mL, obteniendo un aumento de la actividad de ~173%, sin embargo, al realizar la prueba estadística de Tukey no se encontró diferencia significativa entre la actividad hidrolítica obtenida con 1 y 1.25 M de  $\text{CaCl}_2$ . Esto demuestra que la actividad de la enzima se ve mejorada en concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  que se encuentran entre los valores antes mencionados.

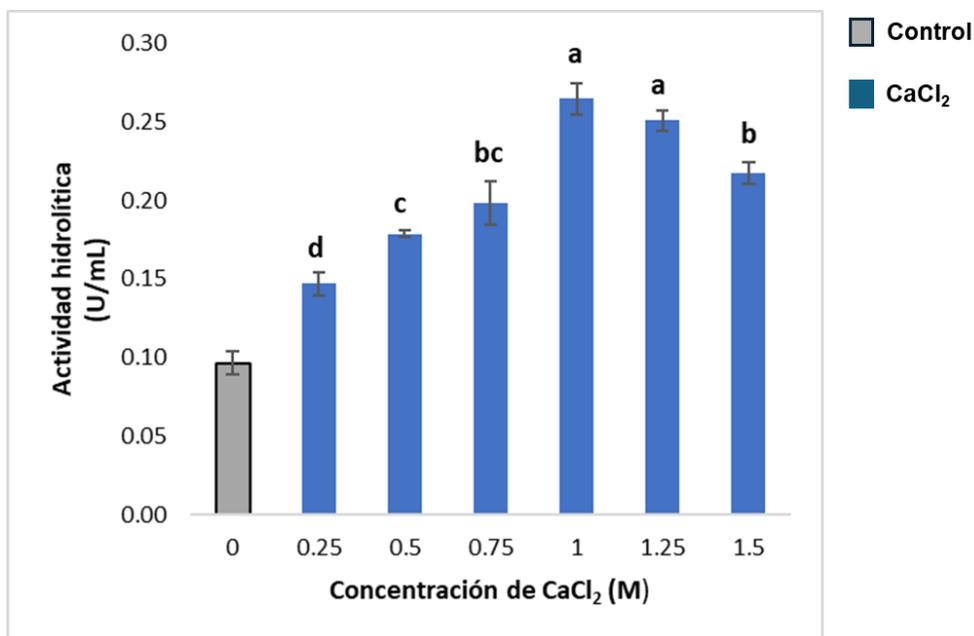


Figura 17. Actividad hidrolítica de la FUC-Tm a diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub>. Las medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey  $p < 0.05$ .

A diferencia de lo reportado por Guzmán-Rodríguez *et al.*, (2018c), donde se utilizaron concentraciones de 0.5, 0.8, 1.1 y 2.2 M de CaCl<sub>2</sub>, en este trabajo se evaluó el efecto del Ca<sup>2+</sup> utilizando un mayor número de concentraciones de CaCl<sub>2</sub>. En el presente trabajo se encontró un aumento en la actividad hidrolítica muy similar a lo reportado por el estudio antes mencionado, comparando los resultados de 0.5 y 1.1 M siendo estas las concentraciones más cercanas a las probadas en la presente investigación. Esto nos permitió encontrar un intervalo más acotado en donde se activa la enzima siendo de 1 a 1.25 M.

Kobayashi *et al.* (2011), informaron que una dextrano-glucosidasa de *Streptococcus mutans* a la que se añadió Ca<sup>2+</sup> en una concentración de 5 mM retuvo una actividad del 70% o superior incluso después de 60 minutos de incubación. Además, Shi *et al.* (2013), reportaron que la termoestabilidad de la xilanasas de *Thermotoga thermarum* se benefició en presencia de Ca<sup>2+</sup>, de hecho, más del 80% de la actividad se mantuvo después de 30 minutos a 90 °C con Ca<sup>2+</sup> en una concentración de 5 mM.

Liu *et al.* (2016) reportaron que las FUCs de *Emticicia oligotrophica* Eo0918 y Eo3812 aumentaron su actividad en un 50 y 56% respectivamente en presencia de CaCl<sub>2</sub> 1 mM, por otro lado, Bishnoi *et al.* (2018) reportaron un efecto importante del Ca<sup>2+</sup> sobre la actividad

de la FUC de *Streptosporangium roseum* teniendo un aumento del 93% con una concentración de 10 mM.

Por otro lado, Liu *et al.* (2022), reportaron que la adición de  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  a una concentración de 1 mM, aumentó la actividad, de la FUC de *Pseudoalteromonas* sp. OU03 (PsaFuc) perteneciente a la familia GH29, de estos iones el  $Mn^{2+}$  mostró la influencia más significativa, sin embargo, después de un tratamiento de incubación se observó que el  $Ca^{2+}$  prolongó la vida media de la enzima. Además, se demostró que el  $Ca^{2+}$  interactuó con PsaFuc a través de múltiples sitios induciendo cambios de conformación locales, lo cual mantuvo el estado activo de la proteína.

Adicionalmente, el estudio antes mencionado, incorporó técnicas como la calorimetría de valoración isotérmica con la cual se verificó la afinidad de unión de PsaFuc con el  $Ca^{2+}$ . Posteriormente se realizó un estudio por dicroísmo circular en UV lejano para confirmar la configuración activa de la enzima y finalmente por medio de calorimetría diferencial de barrido se comprobó la estabilidad estructural de la enzima por cambios locales en su estructura. Por otro lado, Shen *et al.* (2024) informaron que no fue posible apreciar un efecto significativo en la FUC de *Wenyngzhuangia fucanilytica* perteneciente a la familia GH95 ante la presencia de  $Ca^{2+}$  en una concentración de 1mM.

Es importante mencionar que en la presente investigación, donde se evaluó el efecto del calcio sobre la FUC-*Tm*, no se encontró algún efecto positivo de este ion empleando concentraciones milimolares (resultados no reportados), por lo que fue necesario usar concentraciones molares para poder observarlo, a diferencia de las investigaciones antes mencionadas, esto podría deberse a que la FUC-*Tm* proviene de una bacteria extremófila, por lo que resiste condiciones extremas, debido a esto, el efecto de este ion se pudo observar solamente a concentraciones más elevadas. Recordando que las enzimas provenientes de bacterias extremófilas (como FUC-*Tm*) frecuentemente presentan estructuras rígidas, siendo una condición para que presenten una alta termo-estabilidad. Esta característica y el hábitat de donde se aísla *T. maritima* (sedimentos marinos) están directamente relacionada con su resistencia a altas concentraciones de sal, lo que explicaría por qué, FUC-*Tm* fue capaz de conservar parte de su actividad en presencia altas concentraciones de sal.

También es importante resaltar que otras investigaciones han informado del efecto positivo sobre la actividad de algunas enzimas en presencia de  $Ca^{2+}$  (Guzmán-Rodríguez, *et al*

2018c, Liu *et al.*, 2022, y Shi *et al.*, 2023), no obstante, información referente al mecanismo de acción es hasta el momento desconocidas.

### **7.1.2 Efecto del magnesio en la actividad hidrolítica de la enzima**

En investigaciones previas se ha demostrado que otros iones como el  $Mg^{2+}$  han aumentado la actividad de algunas FUCs, tal es el caso de lo reportado por Liu *et al.* (2022), en donde la actividad de la FUC de *Pseudoalteromonas* sp. *OYO3 209* presentó un aumento en su actividad de alrededor del 25%. Por otra parte, Shi *et al.* (2023), obtuvieron un aumento en la actividad de la FUC de *Pedobacter* sp. *CAU 209* del 6%, debido a ello, se decidió probar el efecto de dicho ion en la actividad de la FUC-*Tm*.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 18, se pudo observar que la actividad hidrolítica fue aumentando conforme se incrementó la concentración de  $MgCl_2$ , aunque al llegar a una concentración de 1.25 M la actividad disminuyó ligeramente. En este caso se obtuvo un aumento en la actividad del 138% con una concentración de 1 M, sin embargo, de acuerdo con la prueba estadística de Tukey no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con concentraciones de 0.75, 1 y 1.25 M, por lo que el intervalo para el aumento en la actividad con este ion resultó ser más amplio. A pesar de que el aumento es menor comparándolo con lo obtenido en presencia de  $CaCl_2$ , es mucho mayor a lo reportado en otras investigaciones, ya que Liu *et al.* (2022) encontraron un aumento máximo del 25%, mientras que Shen *et al.* (2024) informaron que no fue posible apreciar un efecto significativo en la FUC de *Wenylingzhuangia fucanilytica* perteneciente a la familia GH95 ante la presencia de iones como el  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , esto podría ser atribuible a la concentración con la cual se trabajó, ya que en los estudios previos en donde se evaluó el efecto de este ion sobre otras FUCs, las concentraciones máximas utilizadas se encontraron a un orden de magnitud de "mM".

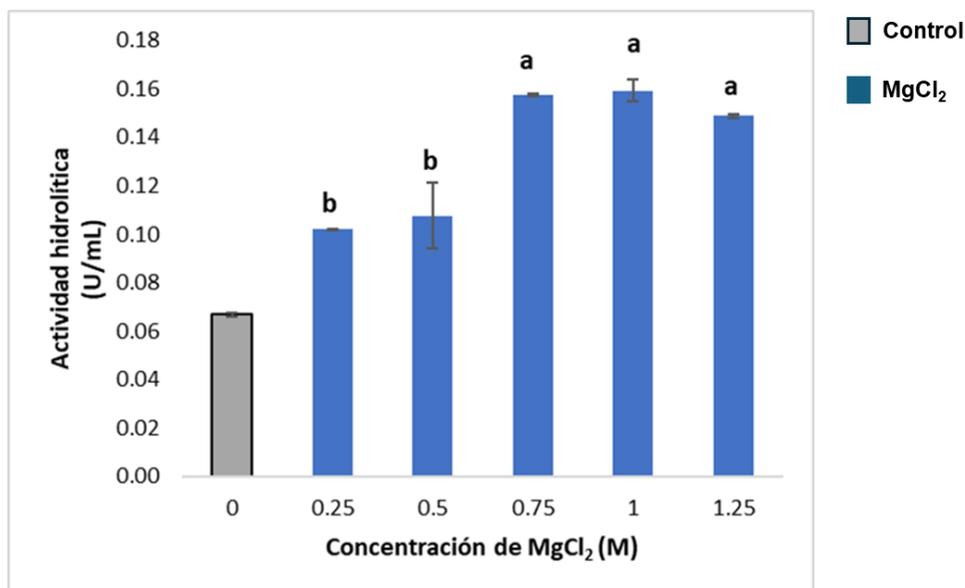


Figura 18. Actividad hidrolítica de la FUC-Tm a diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub>. Las medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey  $p < 0.05$ .

### 7.1.3 Efecto del manganeso en la actividad hidrolítica de la enzima

De acuerdo con Bishnoi *et al.* (2018) la presencia de MnCl<sub>2</sub> en una concentración de 10 mM provocó un aumento en la actividad de la FUC de *Streptosporangium roseum* (SrFuc) perteneciente a la familia GH29A, además, Liu *et al.* (2022) reportaron un incremento en la actividad de la fucosidasa PsaFuc de *Pseudoalteromonas sp. OU03*. Debido a los reportes antes mencionados se decidió evaluar el efecto de MnCl<sub>2</sub> sobre la actividad de la FUC-Tm.

Como podemos observar en los resultados presentados en la Figura 19, en presencia de manganeso, el mayor aumento se obtuvo con una concentración de 0.75 M, teniendo un aumento del 53% respecto a la reacción control; no obstante, al aumentar la concentración de MnCl<sub>2</sub> a un valor de 1 M, la actividad disminuyó abruptamente, teniendo solo un ligero aumento del 9% con respecto al control, además, al llegar a una concentración de 1.25 M la actividad disminuyó 13% en comparación con la actividad en la reacción control.

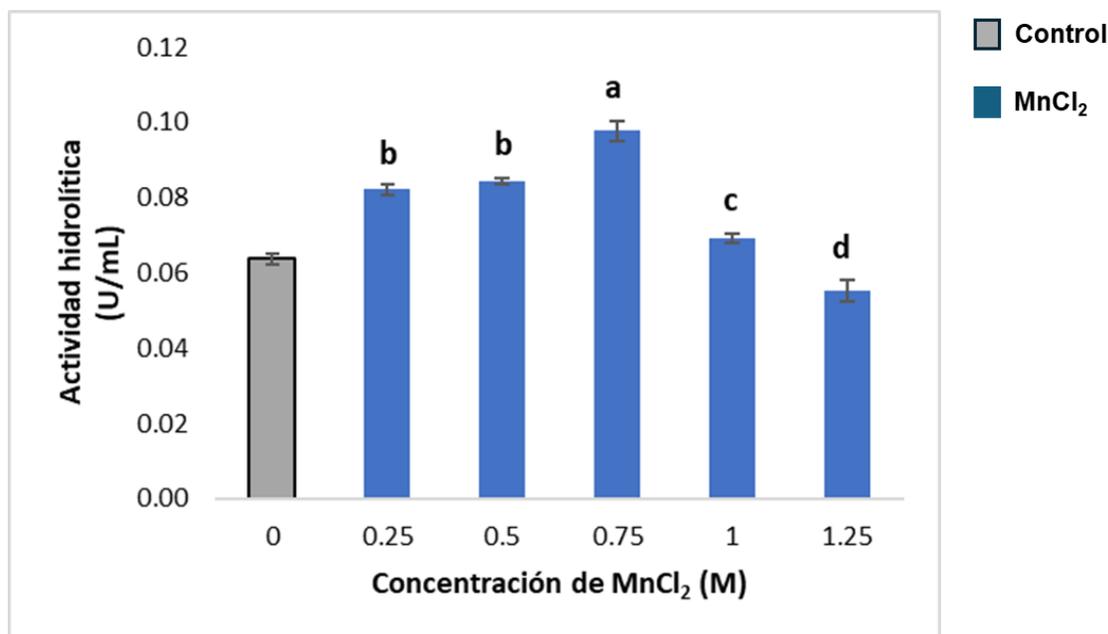


Figura 19. Actividad hidrolítica de la FUC-Tm a diferentes concentraciones de MnCl<sub>2</sub>. Las medias con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey  $p < 0.05$ .

Bishnoi *et al.* (2018) informaron un aumento del 7% en la actividad de la FUC de *Streptosporangium roseum* (*SrFuc*) al estar presente el ion en una concentración de 10 mM, por otro lado, Shi *et al.* (2023) menciona que no se presentó un efecto relevante de este ion en la actividad de la FUC de *Pedobacter* sp. CAU209 al estar presente en una concentración de 1 mM, en donde el aumento fue del 9%. El efecto más importante fue el reportado por Liu *et al.* (2022) en donde se informó que la presencia de Mn<sup>2+</sup> provocó un incremento significativo en la actividad de la FUC *PsaFuc* de *Pseudoalteromonas* sp. OU03 de ~30%, en presencia del ion en una concentración de 1 mM. Es importante resaltar que el aumento en la actividad obtenido en esta investigación es mayor al reportado anteriormente.

De igual forma, en estudios anteriores en donde se ha investigado el efecto del Mn<sup>2+</sup> se muestra que las concentraciones del ion con las cuales se ha trabajado son muy bajas, del orden de 1 mM o 10 mM, mientras que la mejor concentración encontrada en el presente estudio fue del orden molar.

A pesar de que en presencia de Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup> se obtuvo un aumento en la actividad hidrolítica de la enzima, el aumento no fue el mismo, por lo que los resultados sugieren una dependencia del ion que esté presente en la reacción. De acuerdo con Dudev y Lim (2013), los cationes metálicos suelen actuar como cofactores o activadores en bioquímica de proteínas, son simples pero a la vez versátiles y presentan una gran cantidad de

propiedades que son distintivas de cada ion como la capacidad aceptora de electrones, estado de valencia variable, radio iónico, etc., por lo que debido a la diferencia en sus propiedades químicas, el efecto de estos iones no es el mismo a pesar de que los tres iones son divalentes (con una valencia de dos).

Varios factores están involucrados en la actividad de la enzima, por un lado, la fuerza iónica del medio (concentración de cargas en la solución) afecta la solubilidad de las sales e incluso la actividad enzimática afectando la estabilidad y solubilidad de la enzima y el sustrato, de hecho una alta fuerza iónica puede disminuir la actividad de la enzima, debilitando las interacciones en su sitio activo y, por lo tanto, la unión de la enzima con el sustrato (Arroyo, 1998; Fried *et al.*, 2013).

Además, los iones afectan la actividad de la enzima de diferentes formas, dependiendo de sus propiedades químicas como el radio iónico, la capacidad de aceptación de carga, la geometría de coordinación, tamaño del ion solvatado, condiciones de solución y sobre todo la naturaleza y conformación de la enzima. Debido a ello, en ciertas enzimas se favorece la unión con uno u otro ion (Jahnen-Dechent & Ketteler, 2012; Dudev & Lim, 2013).

En esta investigación el ion con el cual se obtuvo el mayor aumento de la actividad hidrolítica fue el  $\text{Ca}^{2+}$ , con un aumento del 178%, mientras que para la reacción en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  el aumento fue del 138% y en la reacción con  $\text{Mn}^{2+}$  el aumento solo fue del 53%. Algo que destacar es que la concentración de los iones con la cual se obtuvo el mayor aumento no fue la misma, por lo que el aumento de la actividad dependería de las propiedades de cada ion.

Además, el  $\text{Cu}^{2+}$  inhibió la actividad de la enzima probándose concentraciones de 1 y 10 mM, por lo que no se presentan resultados para la actividad en presencia de este ion. Esto es similar a lo reportado en otras investigaciones (Arsov *et al.*, 2022; Du *et al.*, 2022; Jeilu *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2024).

De acuerdo con lo reportado por Pasricha y Gahlot (2022), el sulfato de cobre actúa como un inhibidor no competitivo en la  $\alpha$ -amilasa. También se ha reportado que el cobre puede actuar de dos formas, la primera es desplazando los metales que son esenciales para la actividad enzimática, como en el caso de la  $\alpha$ -amilasa, ya que el  $\text{Cu}^{2+}$  puede desplazar los iones  $\text{Ca}^{2+}$  requeridos para el mantenimiento de la estabilidad terciaria necesaria para su actividad, y una segunda forma en que el  $\text{Cu}^{2+}$  actúa como inhibidor es al unirse a los grupos

cargados negativamente necesarios para la actividad catalítica de las enzimas por ejemplo,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{SH}^-$ , etc.

Por otro lado, Cala (2020) informó que el sulfato de cobre inhibe la actividad de la catalasa al unirse a un sitio alostérico de la enzima, alterando su conformación y evitando su unión efectiva con el sustrato. Por lo tanto, podemos inferir que el  $\text{Cu}^{2+}$  podría desnaturalizar la enzima, al interactuar con residuos cambiando la conformación, provocando la pérdida de su función. Sin embargo, para describir el mecanismo de inhibición en FUC-*Tm*, es necesaria la realización de estudios complementarios.

## 7.2 Efecto de iones en la actividad de tranfucosilación de la enzima

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  provocan un aumento en la actividad hidrolítica de FUC-*Tm*, siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  el ion con el mayor efecto significativo, por ello, se decidió determinar el efecto de este ion en la reacción de síntesis de FucOS a través de la reacción de tranfucosilación. Se evaluaron concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 1.5 M de  $\text{CaCl}_2$  con la finalidad de obtener la concentración que permitiera el mayor rendimiento. Asimismo, la concentración encontrada en los ensayos con calcio fue utilizada para determinar el efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  en la reacción de tranfucosilación, una vez que este ion fue el que presentó el segundo mayor aumento en la actividad enzimática.

Para este estudio como control se llevó a cabo la reacción de síntesis en ausencia de los iones, utilizando 3.5 mM de *p*NP-Fuc como sustrato donador y 146 mM de lactosa como sustrato aceptor, a pH 5 en regulador de acetatos 1 mM.

En la Figura 20 se puede observar la cinética de tranfucosilación en ausencia de iones (reacción control), en donde el sustrato donador (*p*NP-Fuc) fue hidrolizado a través del tiempo, mientras que la concentración de FucOS fue aumentando, debido a que la fucosa liberada de la hidrólisis del *p*NP-Fuc fue transferida a la lactosa. Por otro lado, se observó que a partir de los 60 minutos el aumento en la concentración de FucOS se vuelve más lento, alcanzando una concentración de FucOS de  $0.481 \pm 0.03$  mM al final de la reacción, logrando un rendimiento en base al sustrato donador hidrolizado del 22%. El comportamiento obtenido durante la cinética control fue similar al previamente reportado por Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018b).

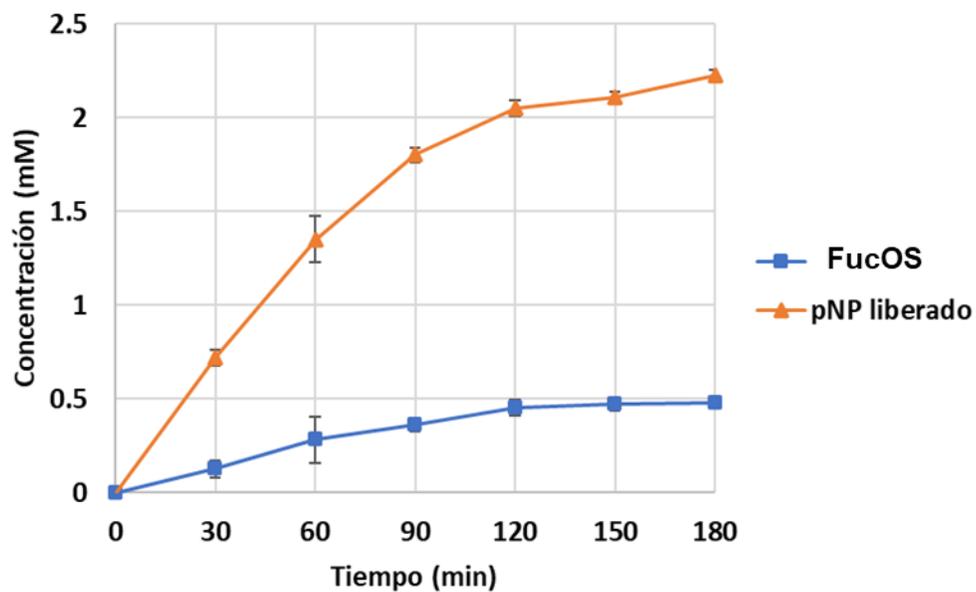


Figura 20. Cinética de transfucosilación control catalizada por la FUC-Tm. La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 146 mM como aceptor en regulador de acetatos 1 mM a pH 5.0 por 3 h a 60 °C.

### 7.2.1 Transfucosilación en presencia de calcio y magnesio

Posteriormente se llevó a cabo la reacción de transfucosilación siguiendo las mismas condiciones, como se mencionó en la sección 7.2, en presencia de  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones de 0.25, 0.5, 1 y 1.5 M obteniendo los siguientes resultados.

De acuerdo con la Figura 21, se observó que en la reacción con 0.25 M de  $\text{CaCl}_2$  la concentración máxima de FucOS se obtuvo en un tiempo de 3 h siendo de  $0.562 \pm 0.01$  mM con un rendimiento en base al sustrato donador hidrolizado del 34%.

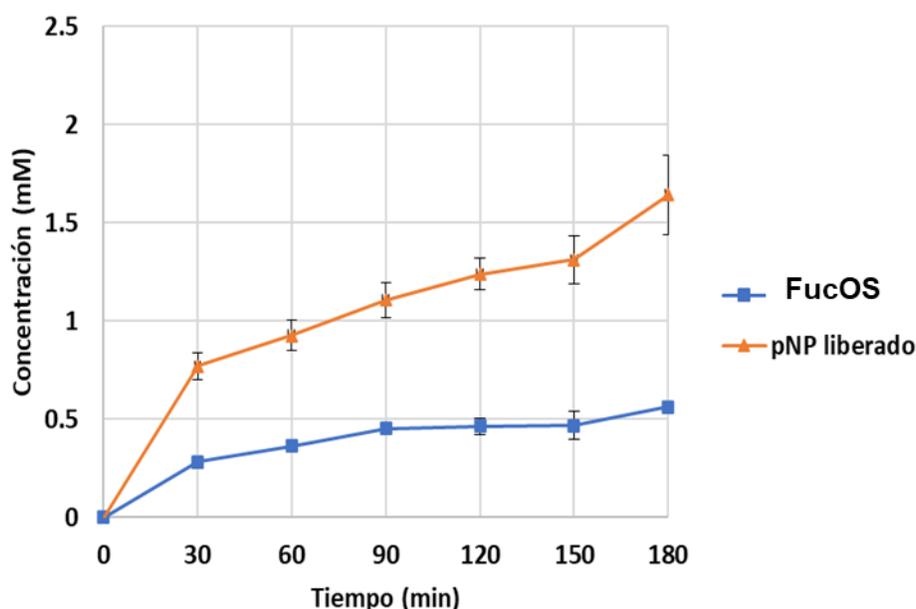


Figura 21. Cinética de transfucosilación catalizada por la FUC-Tm con 0.25 M de  $\text{CaCl}_2$ . La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 146 mM como aceptor en regulador de acetatos 1 mM a pH 5.0 por 3 h a 60 °C.

Por otro lado en la Figura 22 se muestra la cinética de la reacción en presencia de 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$ , donde se evidenció que la síntesis de FucOS fue en aumento conforme paso el tiempo de reacción, llegando a una producción máxima de FucOS de  $0.992 \pm 0.03$  mM en un tiempo de 3 h con un rendimiento en base al sustrato donador hidrolizado del 55% lo que significa que poco más de la mitad de fucosa liberada del pNP-Fuc fue transferida a la lactosa.

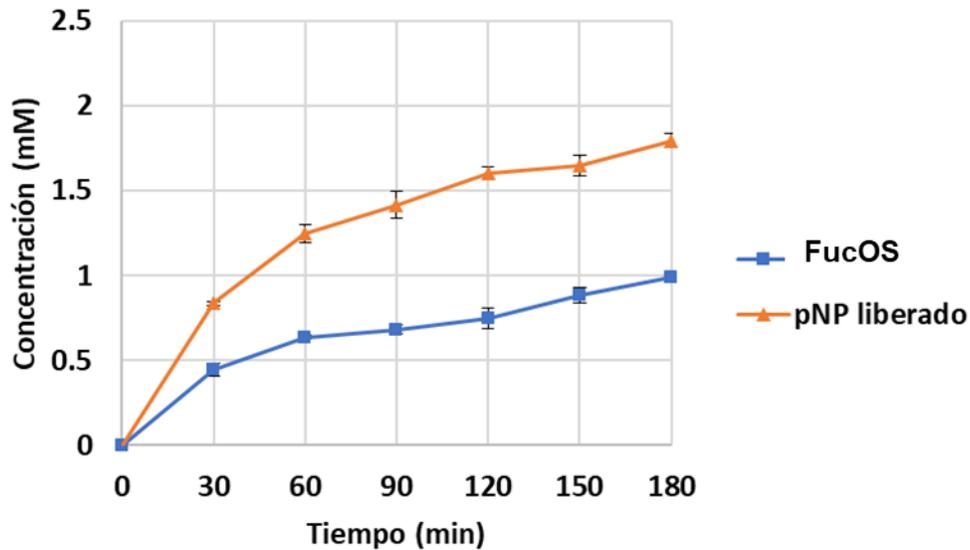


Figura 22. Cinética de transfucosilación catalizada por la FUC-Tm con 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$ . La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 146 mM como aceptor en regulador de acetatos 1 mM a pH 5.0 por 3 h a 60 °C.

Para la reacción de transfucosilación en presencia de 1 M de  $\text{CaCl}_2$  presentada en la Figura 23 se obtuvo una concentración máxima de FucOS de  $0.853 \pm 0.06$  mM con un rendimiento con base al sustrato donador hidrolizado del 45%.

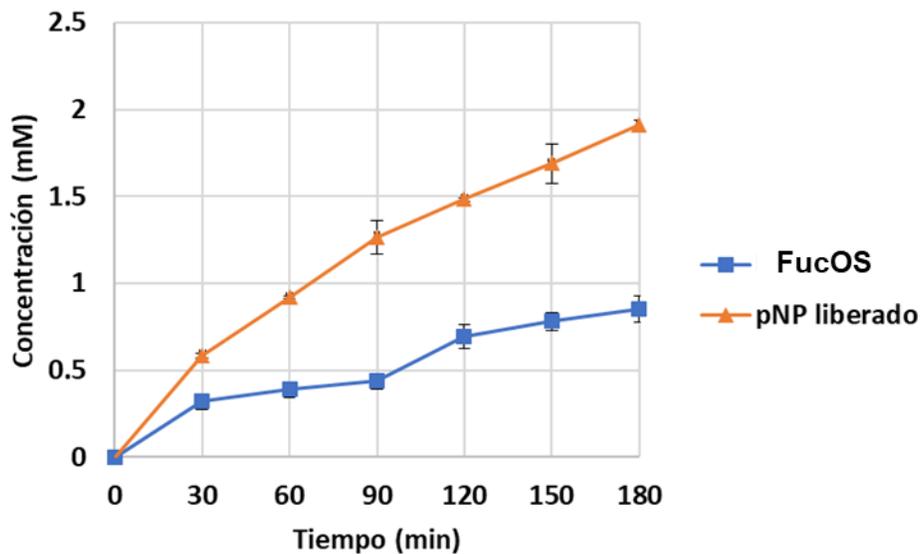


Figura 23. Cinética de transfucosilación catalizada por la FUC-Tm con 1 M de  $\text{CaCl}_2$ . La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 146 mM como aceptor en regulador de acetatos 1 mM a pH 5.0 por 3 h a 60 °C.

Asimismo, en la Figura 24 se muestra la cinética de la reacción de transfucosilación en presencia de 1.5 M de  $\text{CaCl}_2$  en donde es posible observar un aumento constante conforme va aumentando el tiempo de reacción, llegando a una concentración de FucOS de  $0.497 \pm 0.06$  mM en un tiempo de 3 h, con un rendimiento en base al sustrato donador hidrolizado del 38%.

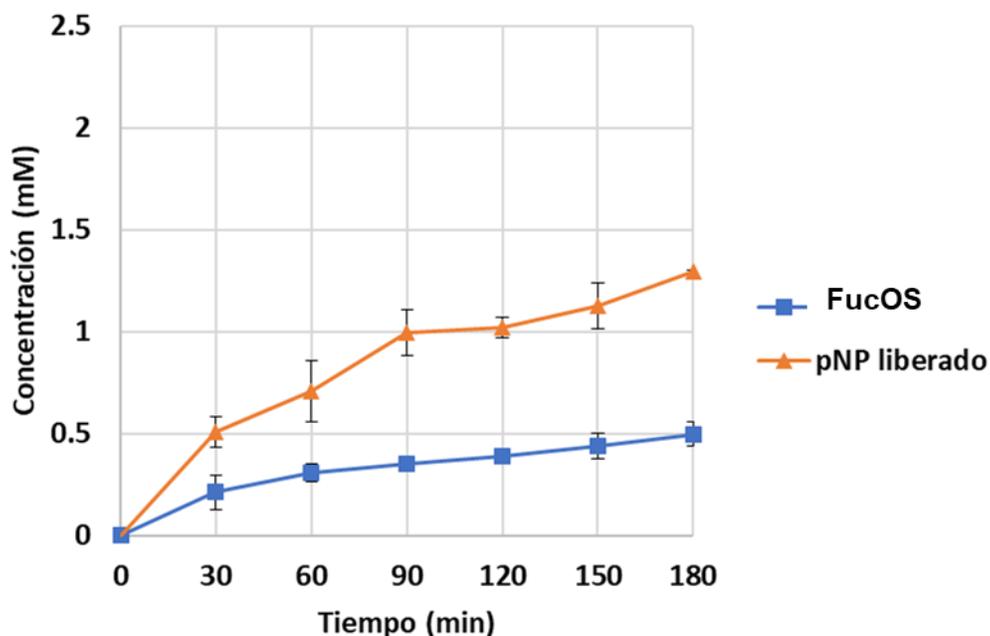


Figura 24. Cinética de transfucosilación catalizada por la FUC-Tm con 1.5 M de  $\text{CaCl}_2$ . La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 146 mM como aceptor en regulador de acetatos 1 mM a pH 5.0 por 3 h a 60 °C.

Comparando las reacciones de síntesis con presencia y ausencia de  $\text{CaCl}_2$  se notar que la hidrólisis de pNP-Fuc es similar a la de la reacción control en todos los casos, sin embargo, la reacción de síntesis se vió favorecida produciendo una mayor concentración de FucOS, logrando así, un aumento del 106.13% en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en una concentración de 0.5 M respecto a la reacción en ausencia de este ion.

Guzmán-Rodríguez *et al.* (2018c), llevaron a cabo una reacción de transfucosilación en presencia de  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 1.1 M y con las mismas concentraciones de pNP-Fuc y lactosa utilizadas en el presente estudio, encontrando también una duplicación en la concentración de FucOS sintetizados, aunque solamente fue evaluada la concentración de calcio antes mencionada.

Los resultados obtenidos en ambos estudios sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  presenta un efecto de activación sobre la FUC-Tm favoreciendo la síntesis de FucOS, por lo que se puede

plantear la hipótesis de un efecto estabilizador del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la FUC-*Tm*, logrando que la reacción de transfucosilación se lleve a cabo en mayor proporción. De hecho al calcular la relación entre la velocidad de transfucosilación sobre la velocidad de hidrólisis ( $V_{\text{trans}}/V_{\text{hid}}$ ) se observó que la reacción control tuvo una relación de 0.223, mientras que la reacción en presencia de 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$  fue de 0.534, siendo 2.39 veces mayor a la reacción control. De acuerdo con Rodríguez-Díaz *et al.* (2013) cuanto mayor sea la proporción  $V_{\text{trans}}/V_{\text{hid}}$  mayormente favorecida será la síntesis de FucOS, con lo cual es posible afirmar que la síntesis de FucOS se ve beneficiada en presencia de calcio.

Una vez que se determinó que la concentración de calcio que proporcionaba los mejores rendimientos en la síntesis de FucOS fue de 0.5 M, esta misma concentración fue utilizada para observar el efecto del ion magnesio sobre la reacción de transfucosilación.

Para ello se llevó a cabo de nuevo una reacción control en ausencia de  $\text{MgCl}_2$  cuya cinética se muestra en la Figura 25, teniendo una producción de FucOS de  $0.308 \pm 0.03$  mM en un tiempo de reacción de 3 h, con un rendimiento del 18% con base al sustrato donador que fue hidrolizado.

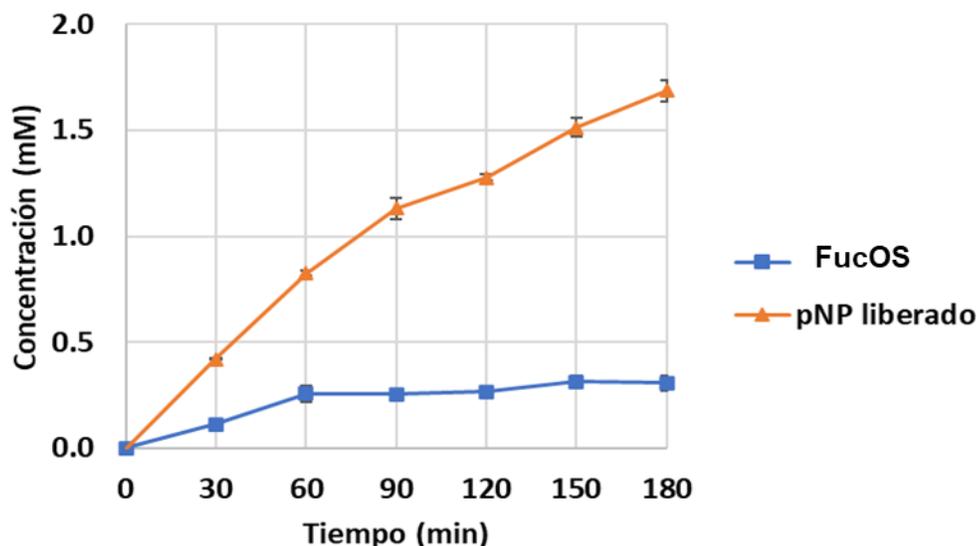


Figura 25. Cinética de transfucosilación en ausencia de  $\text{MgCl}_2$  (reacción control) catalizada por la FUC-*Tm*. La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 146 mM como aceptor, en regulador de acetatos 1 mM a pH 5.0 por 3 h a 60 °C.

En la Figura 26, se muestra la cinética de la reacción de transfucosilación en presencia de 0.5 M de  $MgCl_2$  en donde se observa que el aumento de la síntesis de FucOS es más lento en comparación con la reacción en presencia de  $CaCl_2$ . De acuerdo con los resultados obtenidos en esta reacción la concentración de FucOS sintetizados después de 3 h de reacción fue de  $0.508 \pm 0.03$  mM con un rendimiento con base al sustrato donador hidrolizado del 29%.

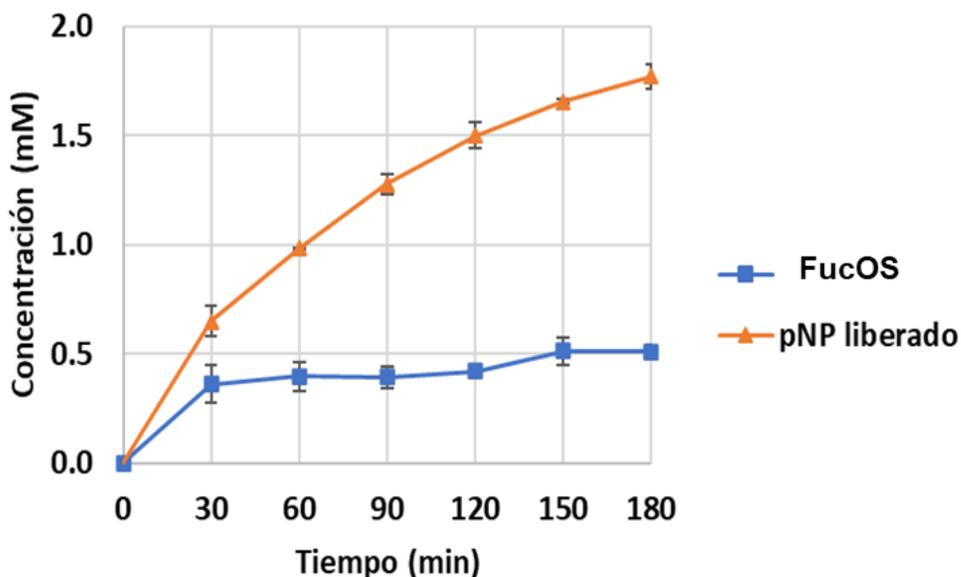


Figura 26. Cinética de transfucosilación catalizada por la FUC-Tm con 0.5 M de  $MgCl_2$ . La reacción se llevó a cabo utilizando pNP-Fuc 3.5 mM como donador y lactosa 146 mM como aceptor en regulador de acetatos 1 mM a pH 5.0 por 3 h a 60 °C.

Por lo tanto, de acuerdo con los resultados presentados en las Figuras 25 y 26, la presencia de magnesio también provocó un aumento en la actividad de síntesis de la enzima, teniendo un porcentaje de aumento del 64.95% respecto a la reacción control. Además es posible apreciar que al llegar a un tiempo de 150 min la síntesis de FucOS parece mantenerse constante (sin aumento). No obstante, al comparar con los resultados obtenidos en presencia de calcio, este ion sigue presentando el mayor efecto activador en la enzima.

Liu *et al.*, (2022) evaluaron la estabilidad de la FUC después de una incubación durante 60 min a 25 °C, en presencia de  $Mg^{2+}$  manteniendo solo el 65% de la actividad hidrolítica. Por otro lado, Shi *et al.* (2023) investigaron el efecto de  $Mg^{2+}$  en la actividad de la FUC de *Pedobacter* sp. CAU 209, donde se observó un aumento de la actividad enzimática de tan solo el 6%. Algo que resaltar de las investigaciones antes mencionadas es que solo se evaluó una única concentración, además de trabajar con concentración milimolar, por lo

que es posible atribuir la diferencia del aumento en la actividad de la enzima a estas razones.

Así también, Feng *et al.* (2024), reportaron un aumento del 47% en la actividad de la esterasa de *T. maritima*, en presencia de  $MgCl_2$  en una concentración de 1mM. Por otra parte, Arsov *et al.* (2022) realizaron una investigación sobre la síntesis de GOS utilizando una  $\beta$ -galactosidasa de *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, en presencia de  $Mg^{2+}$  y 80 g/L de lactosa, obteniendo un incremento de alrededor del 10% en la producción de GOS con grado de polimerización 3. Además, al trabajar con una concentración de 15 mM del ion magnesio tanto de forma separada como en conjunto con la lactosa, se produjo un efecto inhibitorio sobre la producción de GOS con el mismo grado de polimerización, indicando un efecto negativo al ir aumentando la concentración.

Es de gran relevancia mencionar que la FUC-*Tm* presenta una alta resistencia a concentraciones más altas de estos iones probablemente por su naturaleza, por lo que las altas concentraciones de magnesio y calcio utilizadas en el presente estudio provocaron efectos principalmente positivos en la actividad de la enzima. Aún no existen investigaciones que reporten como se lleva a cabo la interacción de este ion con la enzima, sin embargo, debido a los resultados obtenidos, es posible deducir que existen diferencias en la forma de activación que tiene cada uno de los iones evaluados, siendo el calcio el que presenta las mayores ventajas para la síntesis de FucOS (Tabla 3).

*Tabla 3. Efecto de iones bivalentes sobre la síntesis de FucOS.*

	Concentración (M)	Concentración de FucOS (mM)	*Rendimiento (%)
<b>Control</b>	0	0.481±0.03	21.64
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.25	0.562±0.01	34.21
	0.5	0.992±0.03	55.24
	1	0.853±0.06	44.67
	1.5	0.497±0.06	38.40
<b>Control</b>	0	0.308±0.03	18.26
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0.5	0.508±0.03	28.67

*\*El rendimiento se calculó en base al sustrato donador hidrolizado.*

### 7.3 Determinación de la actividad de agua

De acuerdo con diversos reportes de la literatura, la reducción en la actividad de agua ( $a_w$ ) puede favorecer la reacción de transfucosilación como es posible observar en el mecanismo de reacción mostrado en la Figura 3. En este sentido Robles-Arias et al. (2021b), llevaron a cabo una investigación sobre el efecto del uso de disolventes orgánicos miscibles en agua sobre la actividad de FUC-*Tm* para producir FucOS, esta investigación demostró que, al disminuir el valor de la  $a_w$  en el medio de reacción, es posible incrementar el rendimiento de síntesis de FucOS.

En la Tabla 4, se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la actividad de agua para las diferentes soluciones de los iones estudiados ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) en la reacción de transfucosilación.

*Tabla 4. Efecto de la actividad de agua sobre la síntesis de FucOS con diferentes concentraciones de iones.*

	<b>Concentración (M)</b>	<b>Actividad de agua (<math>a_w</math>)</b>	<b>Rendimiento síntesis (%)*</b>	<b>Relación Síntesis/Hidrólisis</b>
<b>Control</b>	0	0.995	21.64	0.22
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0.25	0.987	34.21	0.34
	0.5	0.976	55.24	0.55
	1	0.952	44.67	0.45
	1.5	0.920	38.40	0.38
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0.5	0.970	28.67	0.29

*\*El rendimiento se calculó en base al sustrato donador hidrolizado.  
La relación Síntesis/Hidrólisis se calculó dividiendo la concentración de FucOS sintetizados sobre el pNP-Fuc liberado.*

De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 4, se observa que el valor de  $a_w$  en la solución control fue de 0.995, mientras que al incrementar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  el valor fue disminuyó hasta 0.920 para una concentración de 1.5 M. Guzmán-Rodríguez et al. (2018c), llevaron a cabo la síntesis de FucOS en presencia de  $\text{CaCl}_2$  en una concentración de 1.1 M obteniendo un valor de  $a_w$  de 0.958, el cual es altamente similar al obtenido en esta investigación para una concentración de 1 M.

Además, al comparar los valores de  $a_w$  a la misma concentración para el calcio y el magnesio, se pudo establecer que estos son bastante cercanos. No obstante, al evaluar el rendimiento de la síntesis, el calcio fue el que presentó el mayor aumento, teniendo un máximo equivalente al 55.24%, así como una relación síntesis/hidrólisis de 0.55. Lo anterior indica que alrededor del 55% del sustrato donador hidrolizado fue transformado en FucOS, siendo el mayor rendimiento obtenido en esta investigación. De esta forma, es posible deducir que el aumento en la reacción de transfucosilación de la enzima no está relacionado únicamente con la disminución de  $a_w$ , sino que también depende del ion que se encuentre presente en la reacción.

La investigación realizada por Cruz-Guerrero *et al.* (2006), demostró que la síntesis de GOS depende de la flexibilidad de la enzima, ya que es necesario tener una mayor  $a_w$  para sintetizar GOS de mayor longitud. Esto estaría relacionado con el comportamiento obtenido en la presente investigación, debido a que el mayor beneficio en la reacción de transfucosilación fue obtenido a una  $a_w$  de 0.976, lo que podría relacionarse, con la flexibilidad de FUC-*Tm*, lo que podría estar involucrado en el favorecimiento de la síntesis de FucOS.

## 7.4 Estudio *in silico* de la interacción del calcio con la enzima

### 7.4.1 Dinámica molecular (DM)

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* sobre el efecto de iones en la actividad de FUC-*Tm*, se determinó que con el ion  $\text{Ca}^{2+}$  se obtuvo el mayor incremento de la actividad tanto hidrolítica como de transfucosilación, por lo que se decidió llevar a cabo el estudio de su interacción con la enzima a través de una simulación de DM por un tiempo de 500 ns como se describe en el apartado 6.2.1. Se realizaron dos simulaciones de los siguientes sistemas; uno en ausencia del ion  $\text{Ca}^{2+}$  (FUC-*Tm*) y otro en presencia de  $\text{CaCl}_2$  en concentración 0.5 M (FUC-*Tm*- $\text{Ca}^{2+}$ ), siendo la concentración con la cual se obtuvo el mayor rendimiento de síntesis de FucOS *in vitro*.

#### 7.4.1.1 Análisis de los parámetros *RMSD* y *Rg* de las trayectorias de DM

Las principales herramientas para analizar la estabilidad y los cambios estructurales de la enzima a lo largo de la simulación de DM son el *RMSD* y *Rg*, estos parámetros indican los cambios globales de la estructura de la proteína a lo largo del tiempo de simulación con respecto a la posición inicial de la estructura cristalográfica utilizada como base. Cabe mencionar que los resultados por triplicado de los parámetros antes mencionados se encuentran en la sección de Anexos, en donde se observó un comportamiento similar para las trayectorias de las DM de los dos sistemas evaluados, por lo que el siguiente análisis aplica para todas las repeticiones.

El *RMSD* es un parámetro utilizado para el análisis de la simulación de DM mediante el cual es posible establecer el periodo donde el sistema llegó al equilibrio, además de saber si la estructura de la proteína sufre cambios conformacionales. Es decir, es una medida del cambio de posición promedio global de los átomos de carbonos alfa con respecto a la estructura inicial durante toda la trayectoria de DM. Por tanto, este parámetro nos ayuda a identificar posibles cambios conformacionales de la proteína (Sargsyan *et al.*, 2017). Asimismo, está establecido que, si los valores del *RMSD* en toda la trayectoria no tienen fluctuaciones mayores a 2 Å, se puede concluir que el sistema está estable.

Por lo tanto, para determinar la estabilidad de la estructura de FUC-*Tm*, se calculó el *RMSD* en la trayectoria de los 500 ns, tanto en ausencia (Figura 27A) como en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 27B). Como es posible observar en los resultados obtenidos, a lo largo de los 500 ns no se denota una fluctuación mayor a lo ya establecido, para ambos sistemas evaluados. Además, a partir de los 300 ns se observaron fluctuaciones menores a 1 Å, lo que es

indicativo de un sistema estable. Por consiguiente, los valores obtenidos para el *RMSD* demuestran que en ambos sistemas la enzima mantuvo su conformación estable durante todo el tiempo de simulación, y por lo tanto, el  $\text{Ca}^{2+}$  no provocó cambios a nivel global en la estructura de la FUC-*Tm*.

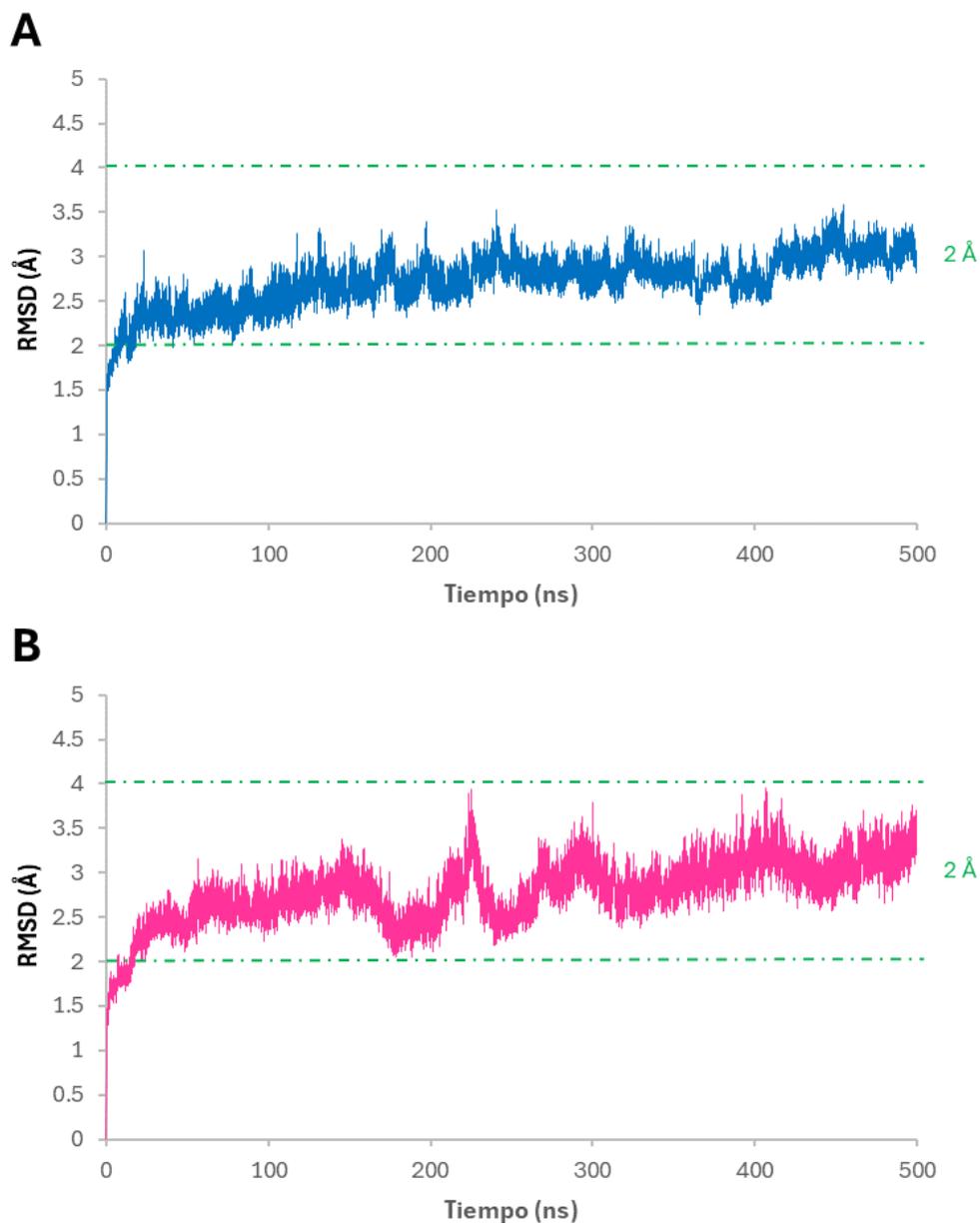


Figura 27. Comparación de la desviación cuadrática media (*RMSD*) de las posiciones atómicas de las trayectorias de los átomos pesados (C, O y N) en la cadena de la estructura de la enzima a lo largo de los 500 ns de simulación de DM. (A) FUC-*Tm* (azul); (B) y FUC-*Tm*- $\text{Ca}^{2+}$  (rosa).

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Gheibi *et al.* (2019) en donde se evaluó el efecto de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y sodio ( $\text{Na}^+$ ) en las subunidades A8 y A9 de la calprotectina a través de DM. Estos autores determinaron que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  no causan cambios estructurales en la subunidad A8, ya que observaron que las fluctuaciones del *RMSD* fueron menores a 2 Å, similar a lo obtenido en este trabajo con FUC-*Tm* en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, con la subunidad A9 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  las fluctuaciones llegaron hasta los 5 Å, con lo que concluyeron que esta subunidad presenta cambios estructurales.

Posteriormente, se determinó el *Rg*, el cual indica los cambios en conformación globular de la proteína a lo largo de la simulación, ayudando a establecer posibles cambios en el volumen de la FUC-*Tm* (Gheibi *et al.*, 2019). De acuerdo con la Figura 28, ambos sistemas presentaron valores promedio del *Rg* muy similares (en ausencia del ion fue de 23.93 Å y con  $\text{Ca}^{2+}$  de 24.11 Å), con lo que es posible determina que no existe un cambio significativo en la compactación de la enzima en ambos sistemas, es decir, no hubo un cambio significativo en el volumen de la enzima, pues al igual que en el *RMSD*, es necesario una fluctuación mayor a 2 Å para tener un indicio de estos cambios .

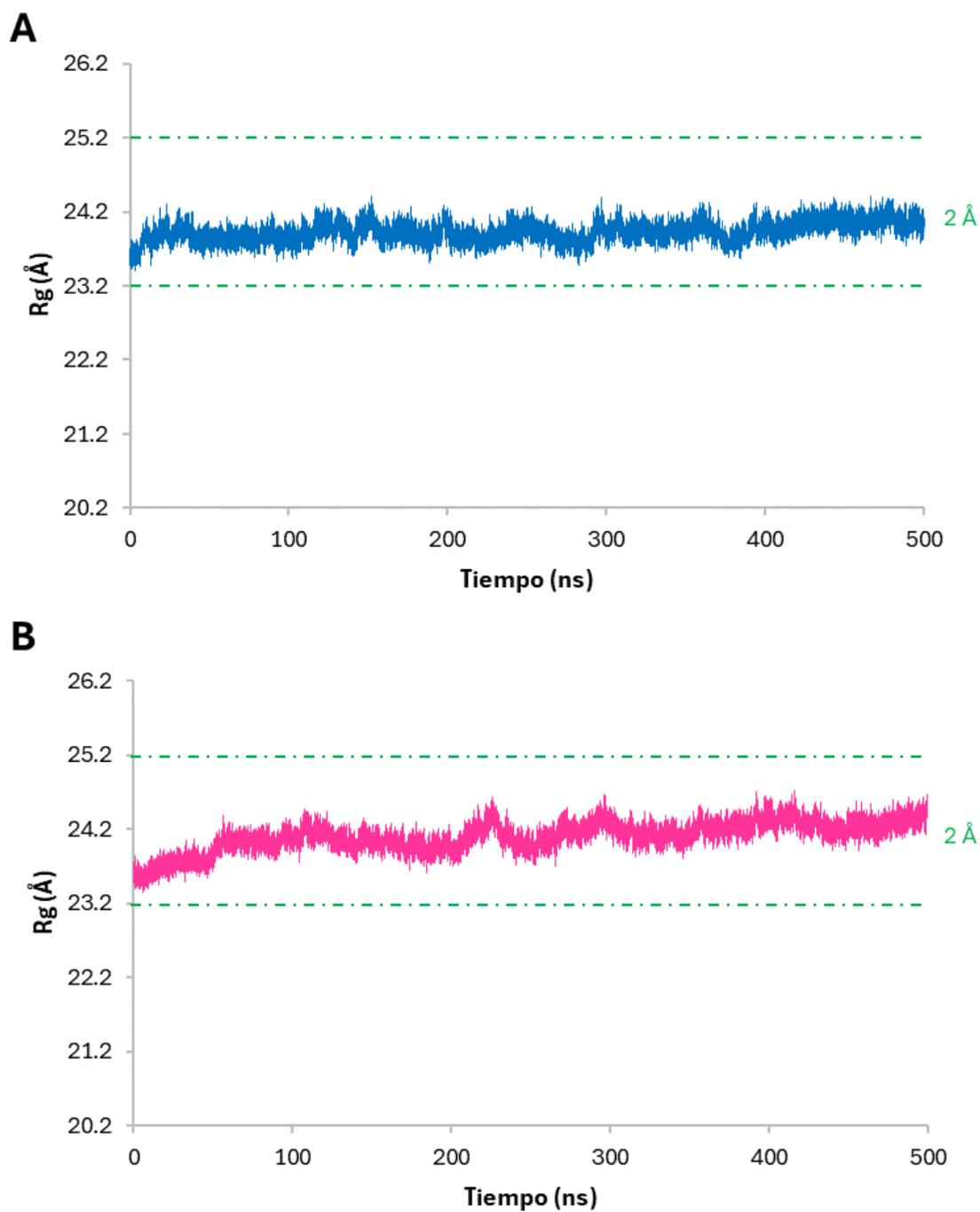


Figura 28. Comparación del radio de giro ( $R_g$ ) a lo largo de los 500 ns de simulación de DM. **(A)** FUC-Tm en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (azul); **(B)** FUC-Tm- $\text{Ca}^{2+}$  (rosa).

Retomando el trabajo de Gheibi *et al.* (2019) en donde se evaluaron los cambios en las subunidades de la calprotectina, estos investigadores obtuvieron que el valor promedio de  $R_g$  en la subunidad A9 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  es de aproximadamente 15 Å, siendo congruente con las altas fluctuaciones que observaron en el  $RMSD$ , ya que con  $\text{Na}^+$  es de 13 Å, demostrando mayor estabilidad con este último ion. Por otro lado, en la investigación de Hou *et al.* (2023), a través del análisis del  $R_g$  se determinó que al utilizar una concentración de 4 mM de  $\text{Mn}^{2+}$ , este parámetro se redujo, lo que indicó una mayor compactación de la xilanasa del salvado de trigo, en comparación con el sistema en ausencia del ion, confirmando un cambio estructural.

Para comprobar que no hubo cambios globales en las estructuras de la FUC-*Tm*, se tomaron estructuras en diferentes tiempos de las simulaciones de DM y se superpusieron. Como se puede ver en la Figura 29A, el alineamiento de los modelos estructurales de la enzima en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  son prácticamente idénticos, de igual forma, esto se observó en la Figura 29B, correspondiente a el sistema en presencia del ion. Lo anterior reafirma que no se producen cambios estructurales globales significativos.

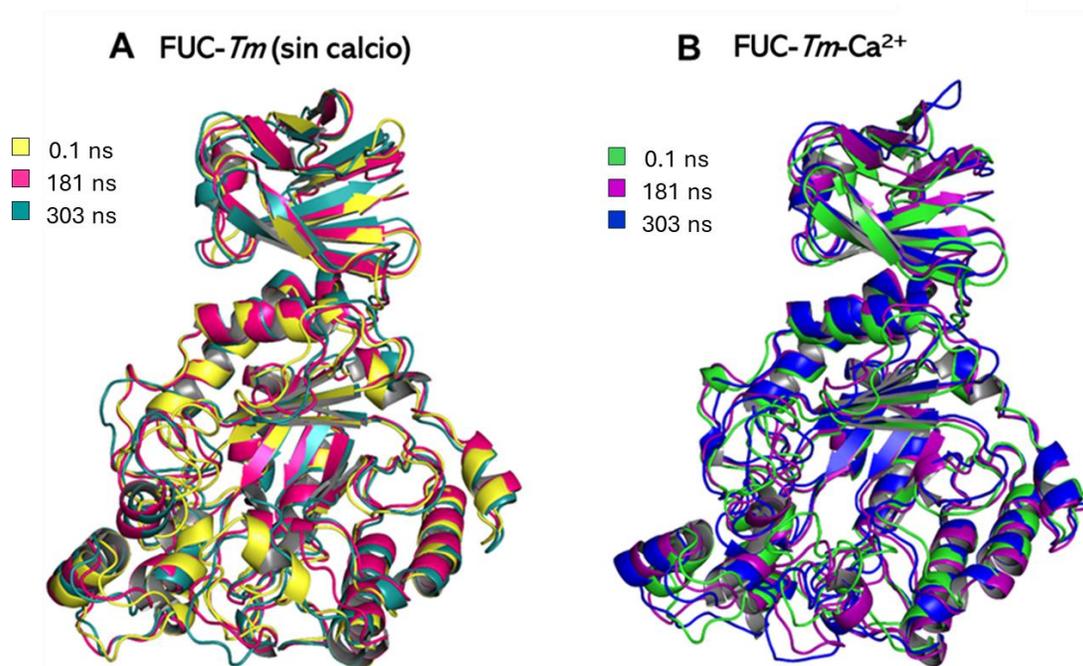


Figura 29. Comparación de las estructuras de FUC-*Tm* en diferentes tiempos (0.1, 181 y 303 ns de la simulación de DM. **(A)** Estructuras de FUC-*Tm* en el sistema en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  **(B)** Estructuras de FUC-*Tm* en el sistema en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 7.4.1.2 Análisis del parámetro *RMSF* de las trayectorias de DM

Debido a que no se observaron cambios globales en la estructura de FUC-*Tm* que pudieran explicar el aumento en su actividad enzimática por medio del *RMSD* y *Rg*, se decidió realizar un estudio más específico, a través del análisis del parámetro *RMSF*, el cual proporciona información directa sobre las fluctuaciones de las cadenas laterales con respecto al carbono alfa de los aminoácidos que conforman a la proteína, y así determinar si hay flexibilidad en regiones específicas (Chen *et al.* 2016; Mahapatra *et al.* 2017; Liu *et al.* 2020).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para este parámetro en el sistema en ausencia y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , además en la sección de Anexos, se encuentran los resultados por triplicado, en donde se observó la misma tendencia, por lo que el análisis es el mismo para las demás repeticiones.

En la Figura 30 se reportan las trayectorias del *RMSF* de las simulaciones en ausencia y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se observan que existen tres regiones donde se presentaron las mayores fluctuaciones, las cuales fueron denominadas como: *Loop-A* (residuos 46 a 100), *Loop-B* (residuos 181 a 208) y sitio activo (residuos 220 a 304). En particular, en la región señalada como *Loop-A*, hubo residuos con fluctuaciones mayores a 2 Å en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 30A), mientras que en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 30B) hay residuos con fluctuaciones de hasta 5 Å. En el caso del *Loop-B*, en el sistema sin el ion presentó las fluctuaciones más altas, con valores superiores a 5 Å, en comparación con el sistema con  $\text{Ca}^{2+}$  donde se observa que la fluctuación máxima fue de 4 Å. Por último, en la región del sitio activo, la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  generó fluctuaciones menores a 4 Å, mientras que en ausencia del ion existieron fluctuaciones superiores a los 4 Å. Basado en estos resultados, se puede deducir que en la estructura de FUC-*Tm* en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene mayor flexibilidad el *Loop-A*, mientras que en el sistema sin  $\text{Ca}^{2+}$  el *Loop-B* presentó mayor flexibilidad. Por otro lado, en la zona del sitio activo no se encontraron cambios importantes en la flexibilidad en ninguno de los sistemas.

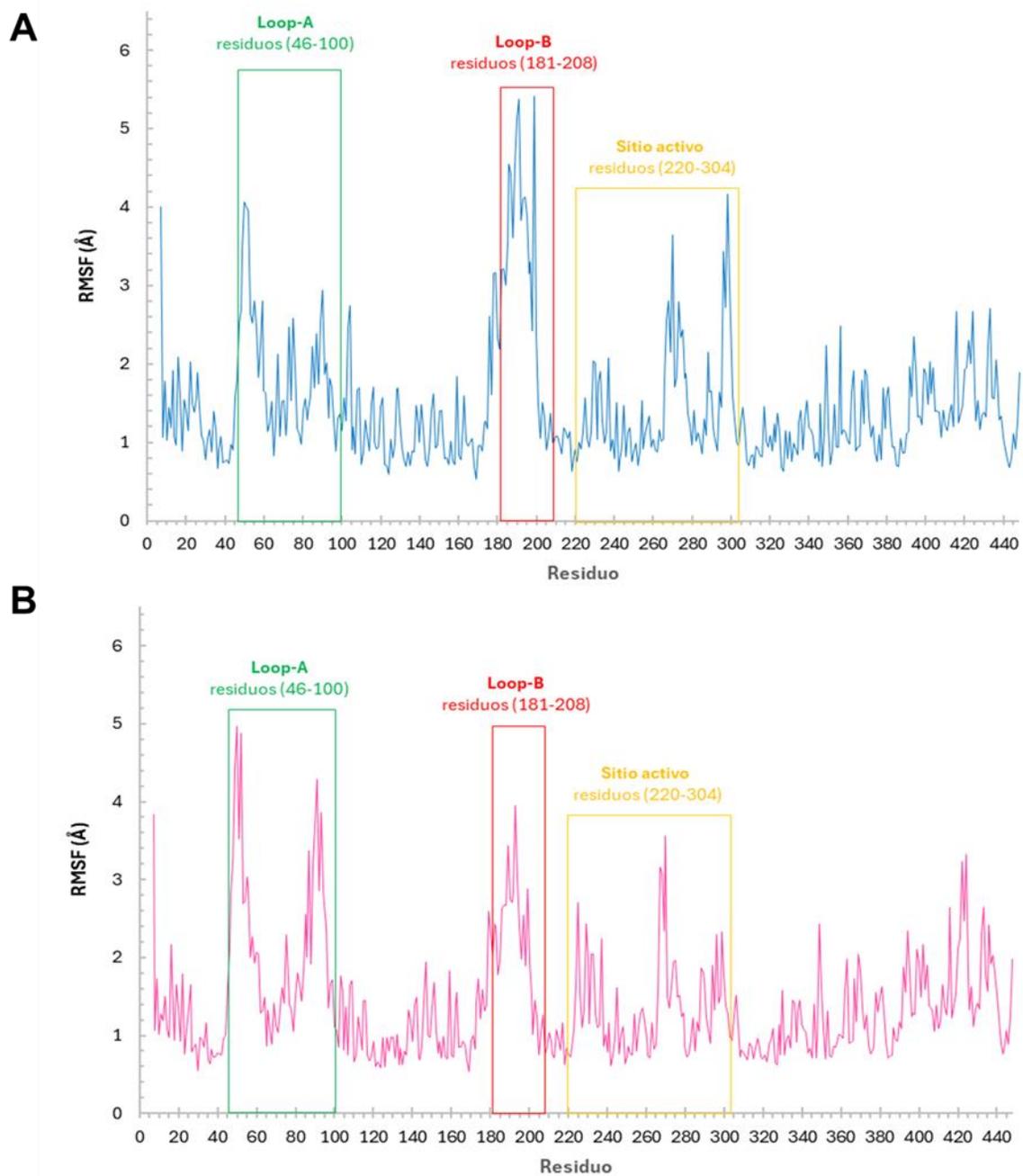
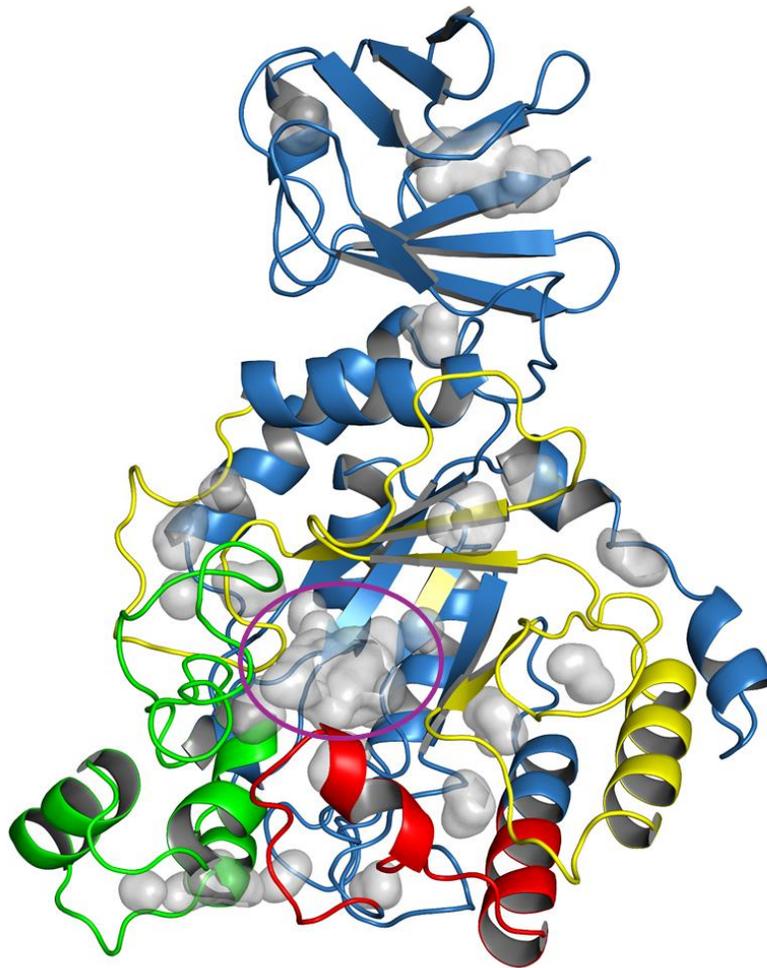


Figura 30. Comparación de la fluctuación cuadrática media de aminoácidos (RMSF) durante la simulación de DM de 500 ns para FUC-Tm **(A)** en ausencia de  $Ca^{2+}$  (línea azul); **(B)** en presencia de  $Ca^{2+}$  (línea rosa).

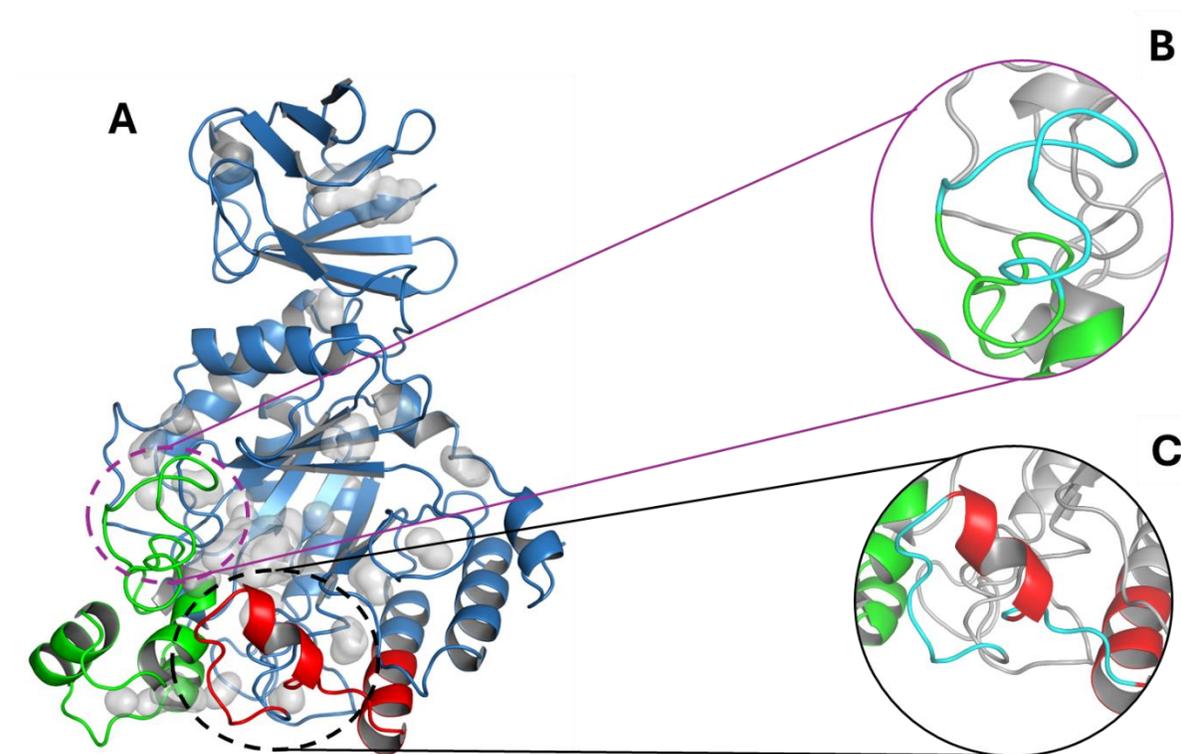
Los resultados anteriores coinciden con lo descrito por Liu *et al.* (2020), donde obtuvieron valores de *RMSF* de 4 a 6 Å, debido a cambios en la temperatura, lo que consideraron fluctuaciones significativas, que reflejan cambios en la flexibilidad de la enzima.

Dado que los resultados obtenidos no reflejaban cambios en la región del sitio activo, se decidió realizar un estudio sobre la influencia que pudieran tener el *Loop-A* y *Loop-B* en el bolsillo catalítico. En la Figura 31 se muestra la estructura secundaria de la *Fuc-Tm* en el sistema sin  $\text{Ca}^{2+}$ , en donde se indica la posición del *Loop-A* (verde), *Loop-B* (rojo) y Sitio activo (amarillo). Como es posible apreciar los *Loops* están cerca de la cavidad del sitio activo (círculo morado) por lo que pueden tener una influencia en su conformación.



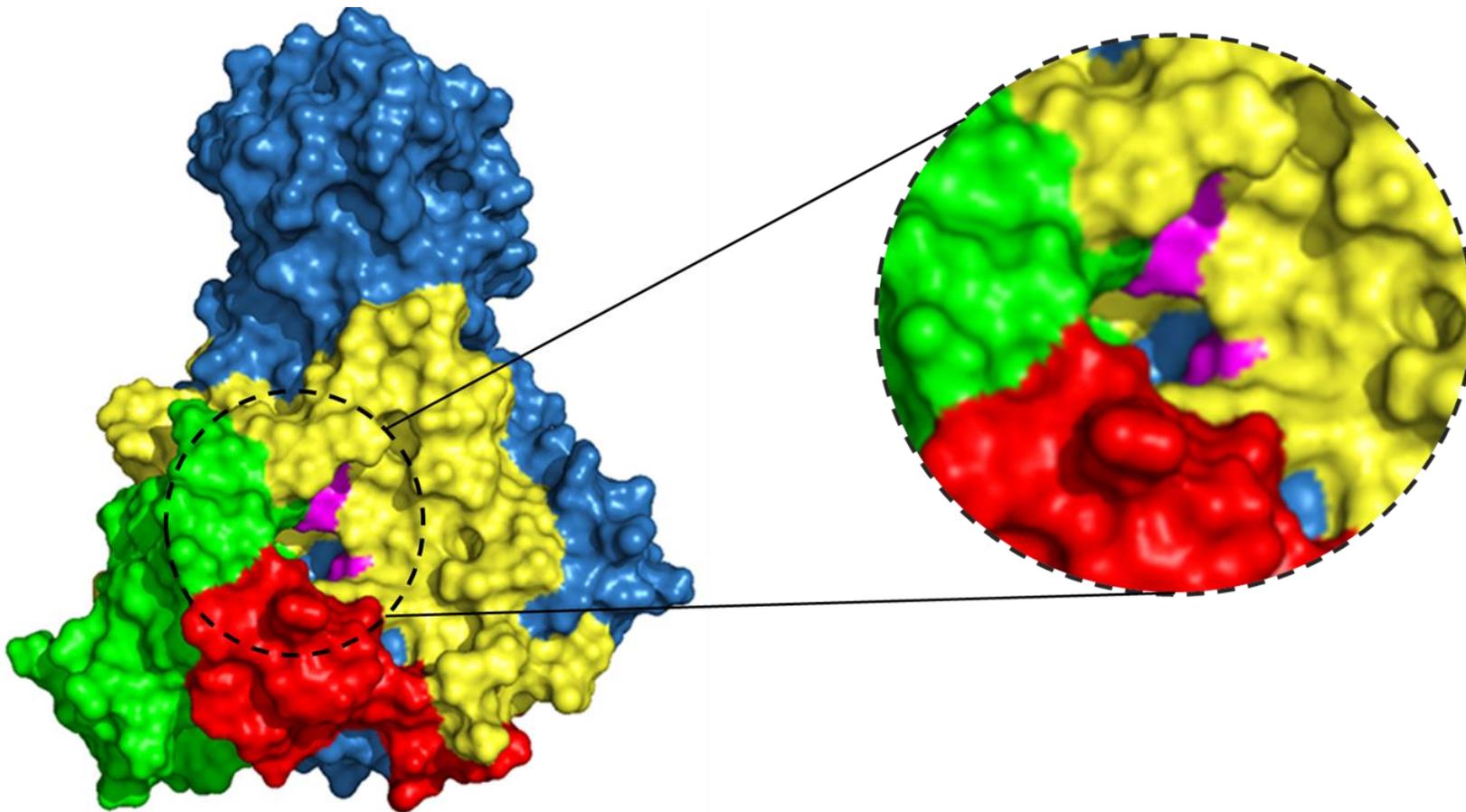
*Figura 31. Estructura secundaria del modelo de la FUC-Tm en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Loop-A (verde); Loop-B (rojo); Sitio activo (amarillo). La cavidad del sitio activo esta señalada con un círculo morado.*

Por otro lado, en la Figura 32 se puede observar que tanto el *Loop-A* como el *Loop-B* están compuestos por estructuras en desorden que pueden tener mayor flexibilidad y por tanto cercanía al sitio catalítico. Por lo anterior, se realizó un análisis de la composición de estructuras secundarias de ambos *Loops*, encontrando que en el *Loop-A* tiene una región de estructura *random coil* (Figura 32B), la cual es muy flexible, de igual forma, en el *Loop-B* (Figura 32C) hay dos secciones de este tipo de estructura que se encuentran entre una  $\alpha$ -hélice.



*Figura 32. Estructura secundaria del modelo de la FUC-Tm en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . (A) Región del Loop-A (línea punteada morada) y Loop-B (línea punteada negra). (B) Estructura random coil (azul) presente en el Loop-A. (C) Estructura random coil (azul) presente en el Loop-B.*

Ante esto, para poder conocer la importancia de la fluctuación de los residuos presentes en las regiones antes mencionadas, y su posible influencia sobre la cavidad del sitio activo de la FUC-Tm, se analizó el efecto de las fluctuaciones de los *Loops* A y B en los cambios de la cavidad del sitio activo (Figura 33), mediante el cálculo de su volumen a diferentes tiempos de la simulación de DM empleando el programa *Caver Analyst 64*.



*Figura 33. Estructura 3D de FUC-Tm a los 0.1 ns de la DM en el sistema en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el círculo punteado se presenta la cavidad del sitio activo por analizar.*

En la Figura 34 se presenta la comparación del volumen de la cavidad del sitio activo de la estructura de FUC-*Tm* en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en tres diferentes tiempos de la DM. Como es posible observar, el volumen de la cavidad aumenta de 198.7 Å a 636.5 Å conforme se incrementa el tiempo de la simulación de la DM.

Por otra parte, en la Figura 34A se aprecia que la estructura obtenida a los 0.1 ns muestra una interacción entre el *Loop-A* y una región del sitio activo (recuadro morado), lo que permite delimitar la cavidad catalítica (círculo negro). Mientras que en la Figura 34B se presenta la estructura en un tiempo de 130.1 ns, donde se denota que la interacción que existía entre el *Loop-A* y la región del sitio activo es suprimida, dando paso a la formación de una segunda cavidad junto a la cavidad catalítica, formada entre la región del *Loop-A* (parte delantera) y la parte adyacente perteneciente a la región del sitio activo (recuadro punteado de color rosa).

Finalmente, en la Figura 34C, se observa que las cavidades descritas anteriormente se unen aumentando el volumen de la cavidad catalítica; además, se observa que el *Loop-B* se aproxima a la región del sitio activo contribuyendo en el cambio del volumen de la cavidad. Por lo que los cambios mencionados y la segunda cavidad observada por efecto de los movimientos del *Loop-A* y B, influyeron en el incremento del volumen del bolsillo del sitio activo de hasta 3 veces. Por lo tanto, es probable que el sustrato donador (*pNP-Fuc*) pueda unirse en la segunda cavidad donde no se encuentran los residuos catalíticos, provocando una disminución en la actividad catalítica.

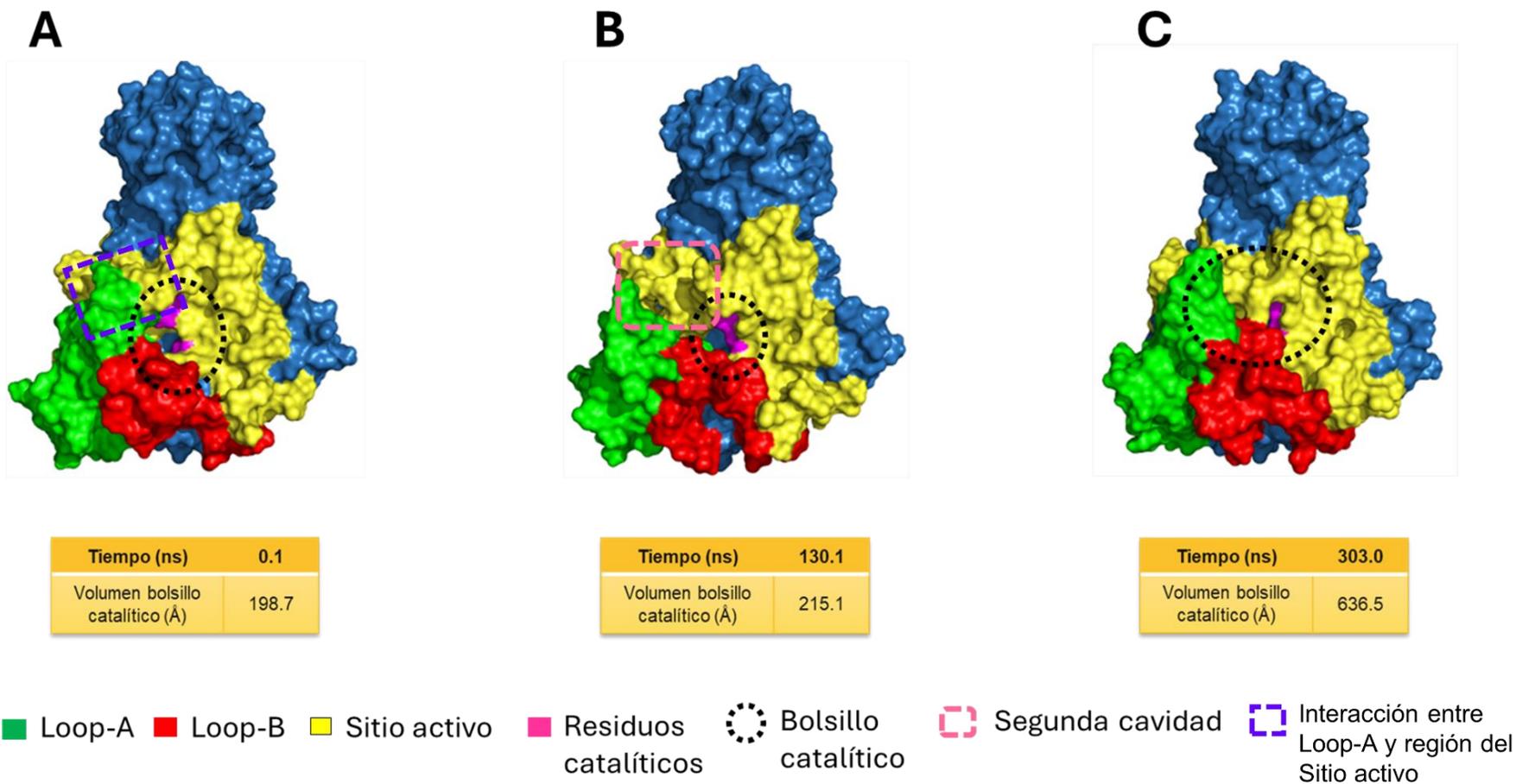


Figura 34. Estructura 3D de FUC-Tm en diferentes tiempos de la DM en el sistema en ausencia de  $Ca^{2+}$ . **(A)** Estructura en el tiempo 0.1 ns **(B)** Estructura en el tiempo 130.1 ns **(C)** Estructura en el tiempo 303 ns.

\*Para una mejor visualización véase Figuras 9 a 12 A del apartado de Anexos.

Por otra parte, en la Figura 35 se reportan las estructuras secundarias de la FUC-*Tm* en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando los residuos que intervienen en la interacción entre los *Loops* y la cavidad del sitio catalítico durante la simulación de la DM. En la Figura 35A se presenta la estructura de FUC-*Tm* a los 0.1 ns, en donde se observa que el grupo amino de la His<sup>268</sup> (morado) que forma parte la región del Sitio activo interacciona con el oxígeno del grupo carboxilo de la Leu<sup>50</sup> (naranja) del *Loop*-A. Mientras que en la Figura 35B se observa que el Asp<sup>190</sup> (negro) del *Loop*-B se acerca a la His<sup>268</sup> (sitio activo), interaccionando con la amina presente en su grupo imidazol, lo cual seguramente se debe a las fluctuaciones mayores a 4 Å del *Loop*-B, observadas en los resultados del *RMSF* (Figura 30A), lo que a su vez causa el desplazamiento de la Leu<sup>50</sup>, dando paso a la formación de la segunda cavidad antes mencionada (Figura 34B). Por ende, la influencia principal sobre el bolsillo catalítico está dada por la fluctuación del *Loop*-B.

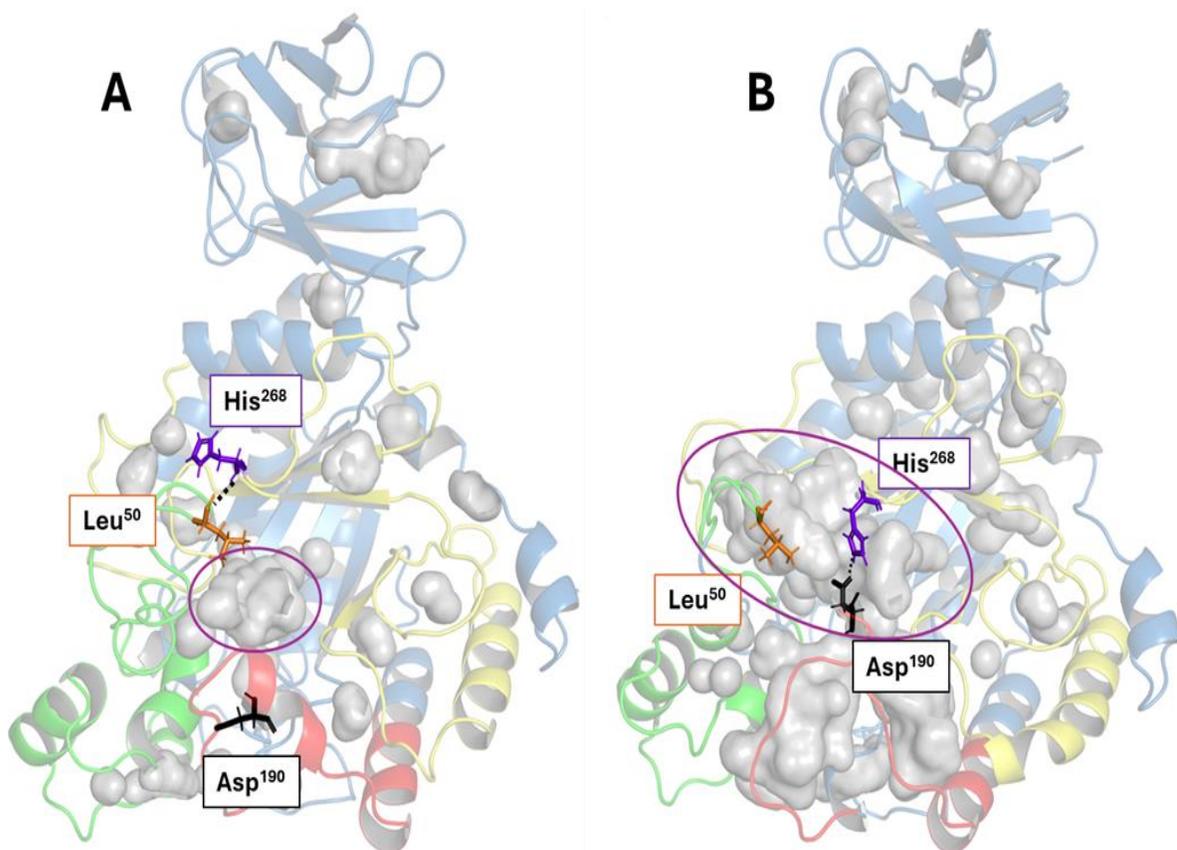


Figura 35. Cambios de la cavidad del sitio activo de la estructura de FUC-*Tm* en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a diferentes tiempos de la simulación. **(A)** 0.1 ns y **(B)** 303 ns. La cavidad del sitio activo esta señalada con un círculo morado; línea punteada negra indica la interacción entre los residuos.

Para conocer el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  en las fluctuaciones de los Loops A y B sobre el tamaño de la cavidad del sitio activo, se realizó el mismo análisis que en el sistema sin el ion. En la Figura 36 se presenta la comparación del volumen de la cavidad del sitio activo de la estructura de FUC-*Tm* en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en tres diferentes tiempos de la DM.

Como se puede observar el volumen de la cavidad catalítica aumento de 201.6 Å a los 0.1 ns, hasta llegar a un valor de 416.1 Å en los 303 ns, significando un aumento de 2 veces su tamaño, a diferencia del sistema sin el  $\text{Ca}^{2+}$  en donde aumento 3 veces.

Además, se observó que la interacción entre el *Loop-A* y la región del sitio activo (cuadro morado) se mantuviera sin cambio durante la simulación de DM Figuras 36 A, B y C, por lo que no se originó la formación de una segunda cavidad como si ocurrió en el sistema de la enzima sin  $\text{Ca}^{2+}$ .

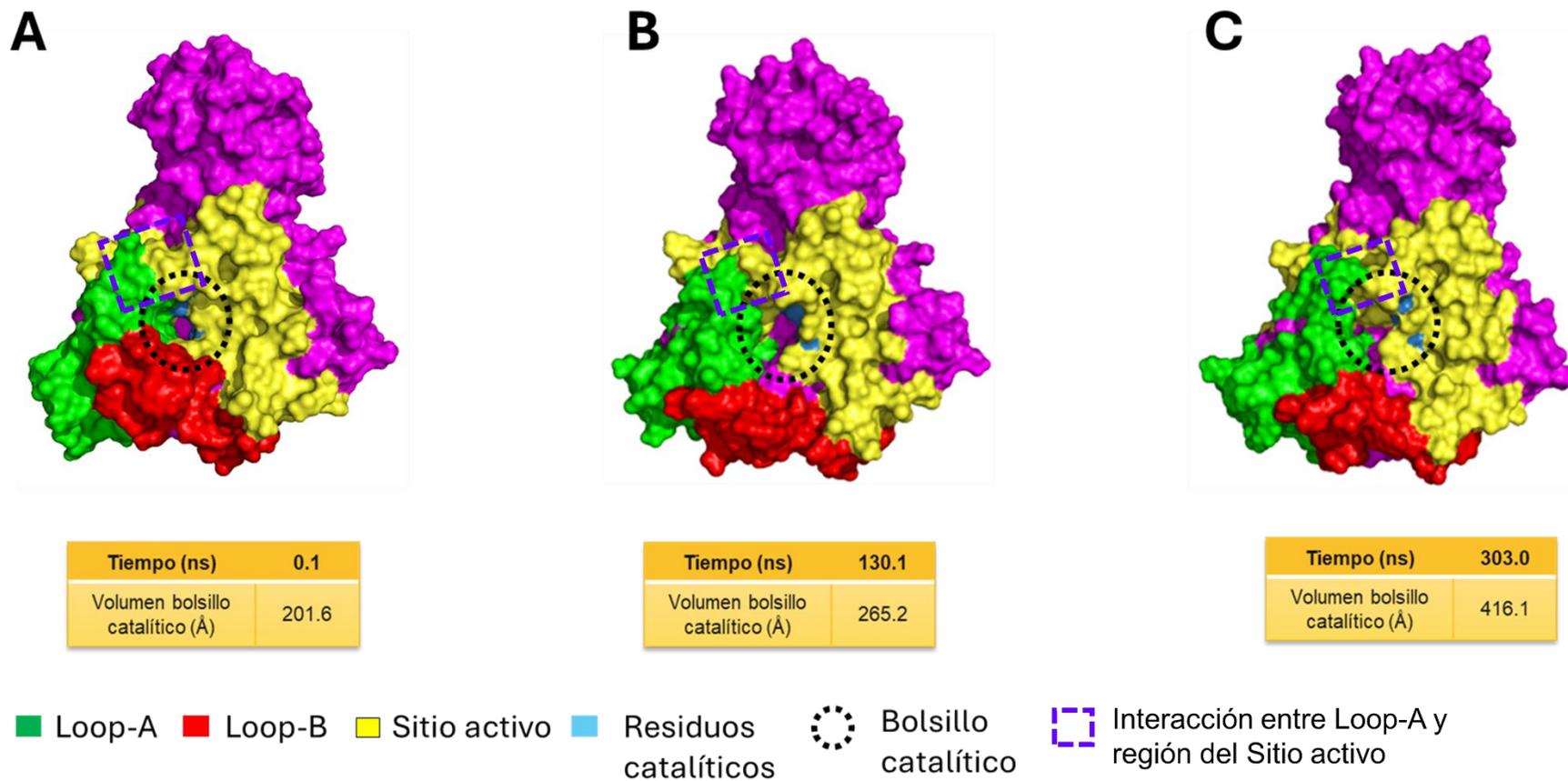


Figura 36. Estructura 3D de FUC-Tm en diferentes tiempos de la DM en el sistema en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . **(A)** Estructura en el tiempo 0.1 ns **(B)** Estructura en el tiempo 130.1 ns **(C)** Estructura en el tiempo 303.0 ns.

\*Para una mejor visualización véase Figuras 12 a 14 A del apartado de Anexos.

Por otra parte, en la Figura 37 se reportan las estructuras secundarias de la FUC-*Tm* en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrando los residuos que intervienen en la interacción entre los *Loops* y la cavidad del sitio catalítico durante la simulación de la DM. En la Figura 37A se presenta la estructura de FUC-*Tm* a los 0.1 ns, en donde se puede observar, que el grupo amino de la His<sup>268</sup> (morado) que forma parte la región del sitio activo interacciona con el oxígeno del grupo carboxilo de la Leu<sup>50</sup> (naranja) del *Loop*-A, como se observó previamente para el mismo tiempo de simulación en el sistema en ausencia del  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, en la Figura 37B se observa que se mantiene la interacción entre His<sup>268</sup> y Leu<sup>50</sup>; asimismo se observa que el *Loop*-B en este sistema tuvo una menor fluctuación, coincidiendo con lo reportado en el *RMSF* (Figura 30B), impidiendo que el Asp<sup>190</sup> se acerque a la región del sitio activo y por tanto no se forme la segunda cavidad observada en el sistema sin  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 36B). Con estos resultados es posible indicar que el *Loop*-B es el que tiene la mayor influencia en la conformación del bolsillo catalítico.

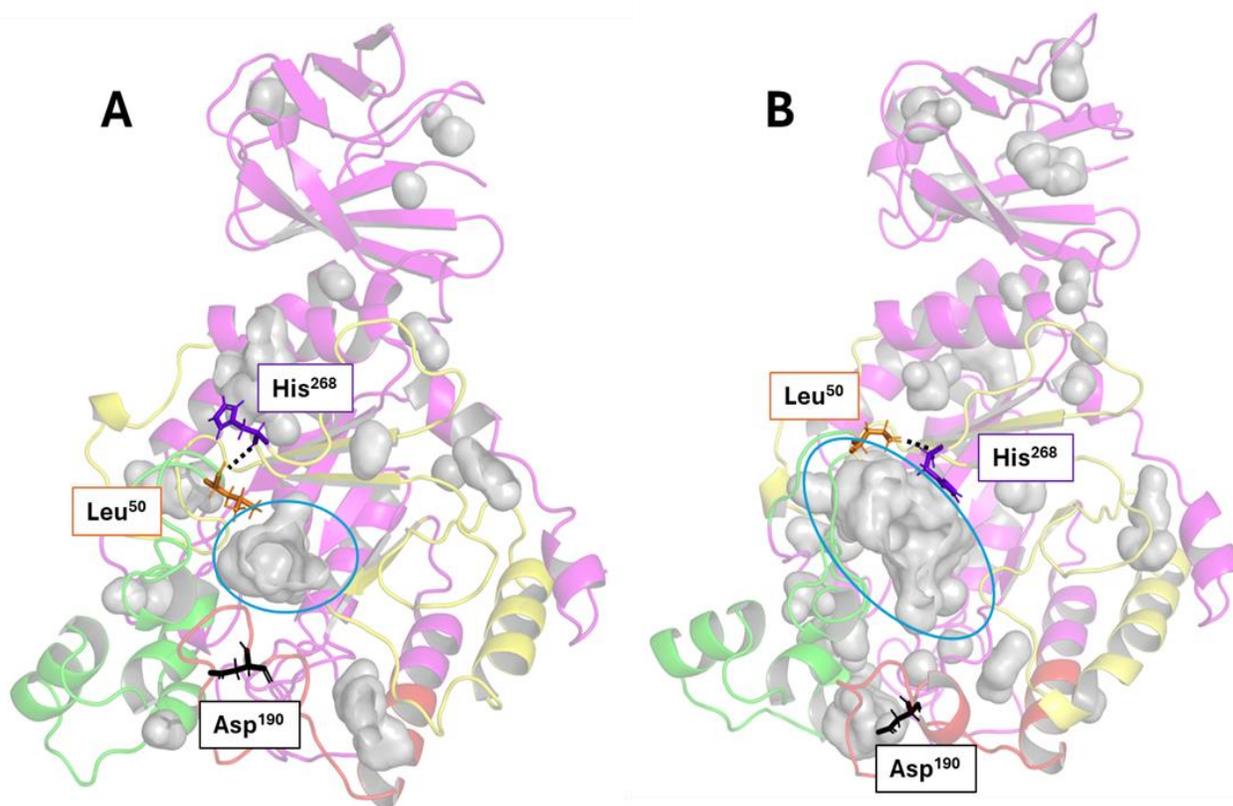


Figura 37. Cambios de la cavidad del sitio activo de la estructura de FUC-*Tm* en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a diferentes tiempos de la simulación. (A) 0.1 ns y (B) 303 ns. La cavidad del sitio activo esta señalada con un círculo azul; línea punteada negra indica la interacción entre los residuos.

De acuerdo con Dudev y Lim (2013), los aminoácidos cargados negativamente como el Asp (desprotonado), Glu y Cys, tienen interacciones carga-carga más favorables con un ion metálico que los residuos no cargados con interacciones más débiles. Además, los aminoácidos polares sin carga, como por ejemplo Asn o Gln y las cadenas laterales de His, tienen energías de unión a metales más favorables que aquellos con momentos dipolares más pequeños, como las cadenas laterales Ser o Thr. Por lo tanto, se puede inferir que el  $\text{Ca}^{2+}$ , estaría estabilizando la fluctuación de residuos pertenecientes al Loop-B, como por ejemplo el Asp<sup>190</sup>, contribuyendo en la estabilización de la cavidad del sitio activo.

Actualmente, no se han reportado estudios similares en fucosidasas, por lo que este es el primer estudio teórico que demuestra que el  $\text{Ca}^{2+}$  estabiliza zonas locales importantes para la formación del bolsillo catalítico y la interacción con el ligando, lo que contribuye con el aumento de la actividad catalítica que se obtuvo en las pruebas *in vitro* (Sección 7.1).

Hou *et al.* (2023), llevaron a cabo la determinación del *RMSF* en la DM de xilanasa en complejo con xilosa en presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  evaluando el efecto de dos concentraciones diferentes del ion (4 y 6 mM). Estos autores establecieron la existencia de 3 *Loops* mediante el análisis en la fluctuación del *RMSF*, encontrando que, existió una ligera disminución en la fluctuación de ciertos aminoácidos al estar presente el  $\text{Mn}^{2+}$ , los cuales forman parte del sitio catalítico de la enzima, adicionalmente, mediante un análisis *in silico* se determinaron cambios en el volumen del bolsillo catalítico, los cuales presentaron un aumento de 55 a 387 Å, lo que facilitó el acceso del sustrato. Lo anterior coincide con lo obtenido en este trabajo, en el sistema en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  el bolsillo incrementó 2 veces su tamaño, lo que puede aumentar la accesibilidad del *pNP-Fuc*, además de tener una mayor estabilidad en la formación de la cavidad del sitio activo.

### 7.4.1.3 Análisis de la energía cinética de las trayectorias de DM

Por otro lado, en la Figura 38 se muestra el análisis de la energía cinética en ambos sistemas. Como se puede apreciar, el sistema con  $\text{Ca}^{2+}$  (línea rosa) presentó un valor promedio de 245,030.57 kJ/mol, mientras que en el sistema sin el ion (línea azul) un valor de 261,068.46 kJ/mol, siendo este último el de mayor energía. Se sabe que la energía cinética de las trayectorias durante la DM es la que libera un cuerpo y/o sistema debido a su movimiento (Coluccio, 2021), por lo que los valores de energía cinética altos del sistema sin presencia del ion, implica que se presentan mayores movimientos, coincidiendo con los resultados de las fluctuaciones del *RMSF*.

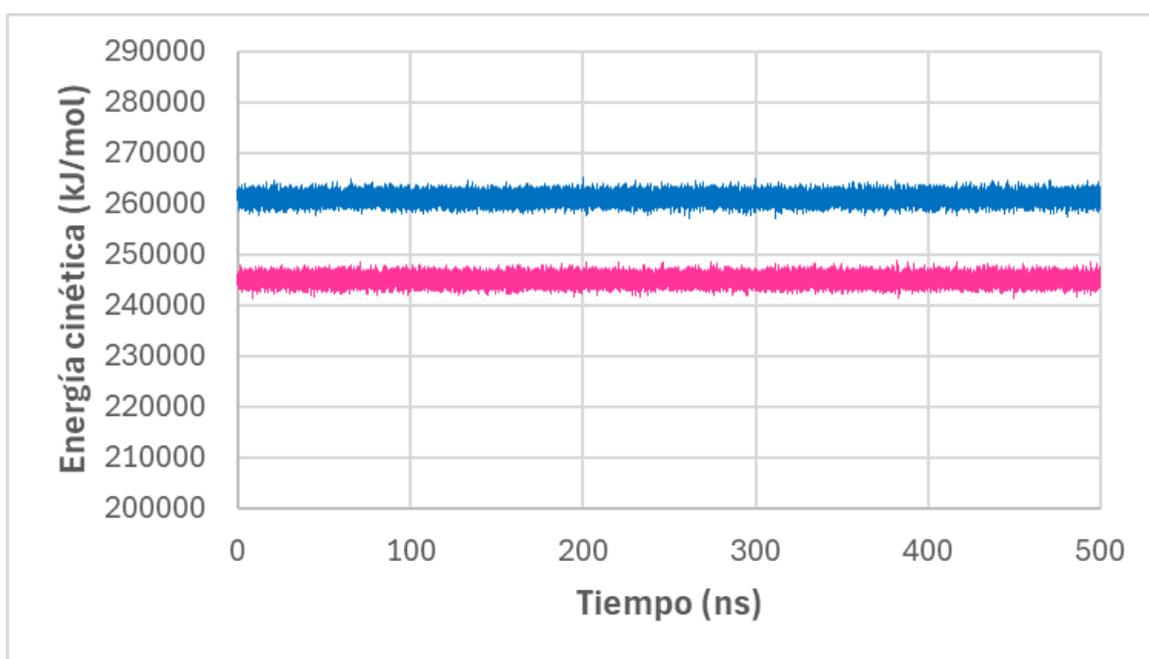


Figura 38. Comparación de la energía cinética entre el sistema FUC-Tm (azul) y FUC-Tm- $\text{Ca}^{2+}$  (rosa).

Estos resultados también pueden ser relacionados con lo obtenido en la medición de  $a_w$ , ya que el  $\text{Ca}^{2+}$  interactúa con las moléculas de agua disminuyendo sus movimientos en el sistema, es decir, una energía cinética baja.

#### 7.4.2 Dinámica molecular del complejo FUC-*Tm*-pNP-Fuc

Se realizaron simulaciones de DM en ausencia y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  con el complejo FUC-*Tm*-pNP-Fuc, con el propósito de verificar su efecto en la estabilidad del complejo.

En la Figura 39 se presenta el complejo FUC-*Tm*-pNP-Fuc de la simulación de DM en el sistema sin  $\text{Ca}^{2+}$  en un tiempo de 4.5 ns. Además, en el círculo rojo se observa que el residuo catalítico Asp<sup>224</sup> está a una distancia de 4.2 Å del C1 de la fucosa, mientras que, el Glu<sup>266</sup> se encontró a 6.03 Å, siendo mayor a lo reportado por Pavón-Chimal *et al.*, (2022a), quienes obtuvieron una distancia de 4.1 Å, es importante mencionar que en dicha investigación no se realizó la simulación de DM si no un acoplamiento molecular, sin embargo, se compararon las distancias con la estructura obtenida por cristalografía de rayos X realizada por Sulzenbacher *et al.* (2004), por lo que se considera que esta distancia es la óptima para la formación del complejo intermediario.

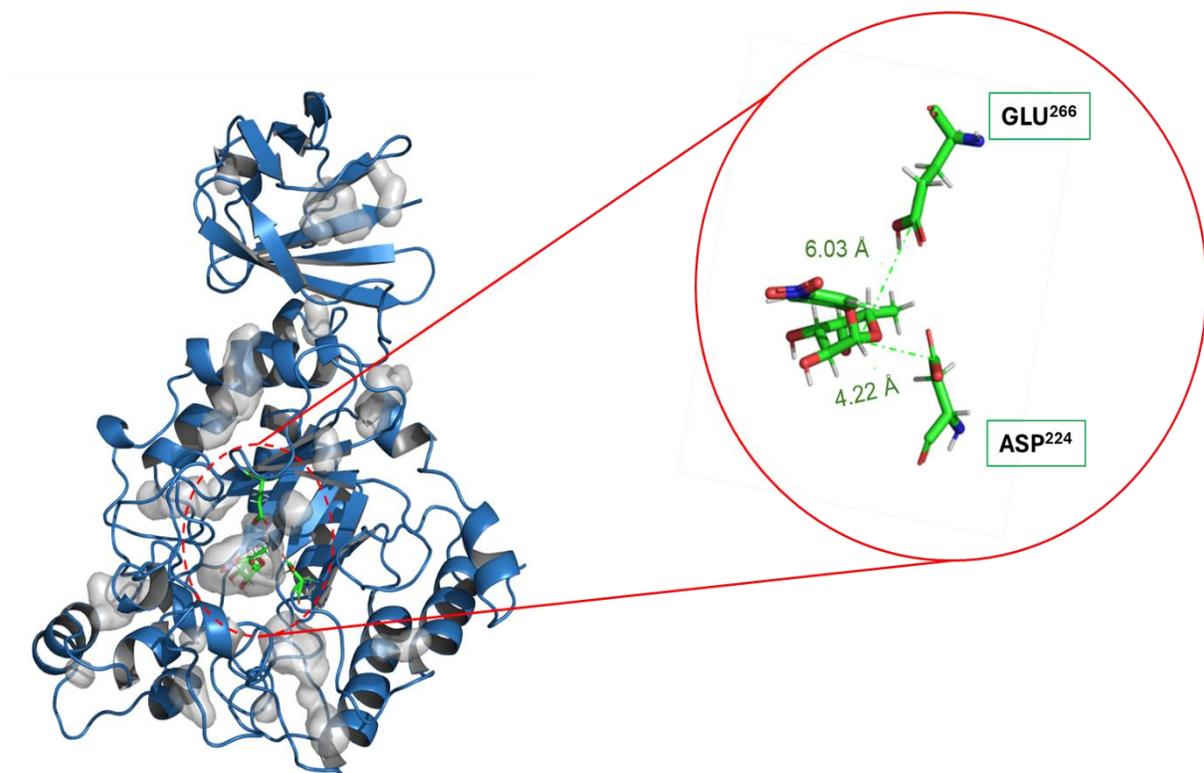
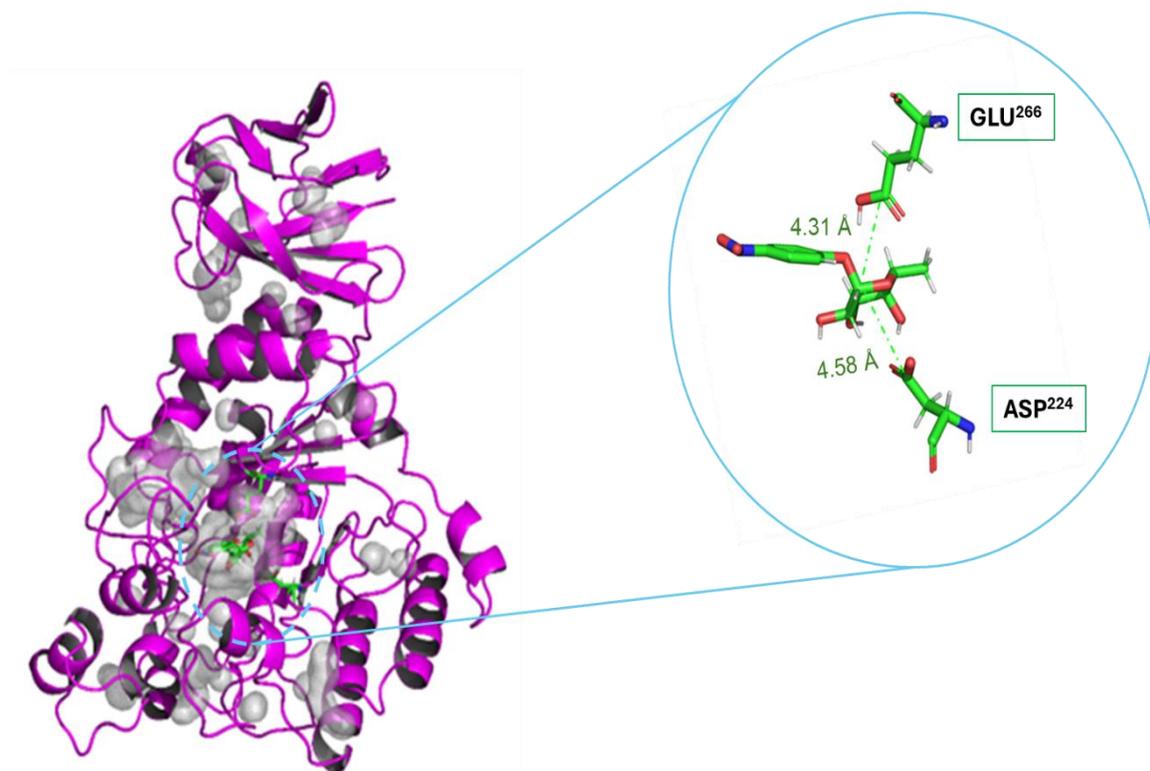


Figura 39. Estructura secundaria del complejo FUC-*Tm*-pNP-Fuc en el sistema en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a 4.5 ns de simulación. Círculo rojo: distancia entre los residuos catalíticos (ASP<sup>224</sup>, GLU<sup>266</sup>) y el C1 de la fucosa que forma parte del sustrato pNP-Fuc.

Por otro lado, en la Figura 40 se observa el complejo FUC-*Tm*-pNP-Fuc en el sistema en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  de la simulación de DM en un tiempo de 4.5 ns. En el círculo azul se puede observar que los dos residuos catalíticos mantuvieron distancias similares con el C1 de la fucosa (4.1 Å), como lo reportado por Pavón-Chimal *et al.*, (2022a), lo que indica una formación de complejo enzima-sustrato adecuada.



*Figura 40. Estructura secundaria del complejo FUC-*Tm*-pNP-Fuc en el sistema en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a 4.5 ns de simulación. Círculo azul: distancia entre los residuos catalíticos ( $\text{ASP}^{224}$ ,  $\text{GLU}^{266}$ ) y el C1 de la fucosa que forma parte del sustrato pNP-Fuc.*

Finalmente, se determinaron las  $\Delta G_u$  por medio de la simulación de 100 ns con los cálculos de MM/PBSA, obteniendo una  $\Delta G_u$  de -62.26 kJ/mol para el sistema en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y de -89.62 kJ/mol en el sistema en presencia del ion. Lo anterior indica que el complejo formado en el sistema con  $\text{Ca}^{2+}$ , es más estable. Esto concuerda con los resultados mencionados en las secciones anteriores, debido a que en el sistema en ausencia del ion existe un mayor aumento en el volumen del bolsillo catalítico, desfavoreciendo la correcta interacción con el sustrato, lo cual queda demostrado con el valor de  $\Delta G_u$ .

## 8 Conclusiones

En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis del efecto de diferentes iones bivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) sobre la actividad hidrolítica y de transfucosilación de la FUC-*Tm*.

Se demostró que el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  tienen un efecto activador sobre la enzima. Los mejores resultados para la actividad hidrolítica se obtuvieron en presencia de 1 M de  $\text{CaCl}_2$ . Además, se observó que el  $\text{Cu}^{2+}$  tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima.

Se encontró un aumento de 2.39 veces en la actividad de transfucosilación en presencia de 0.5 M de  $\text{CaCl}_2$ , con una proporción  $V_{\text{trans}}/V_{\text{hid}}$  de 0.534, orientando la selectividad de la reacción hacia la transfucosilación sobre la hidrólisis en presencia del calcio.

Por otro lado, mediante el análisis de DM se observó que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no provoca cambios estructurales a nivel global en la FUC-*Tm*. Además, el ion  $\text{Ca}^{2+}$  estabilizó regiones locales cercanas al sitio activo de la enzima, que influyen en la formación del bolsillo catalítico, explicando el aumento en su actividad.

Mediante el análisis del complejo enzima-sustrato en la simulación de DM se determinó que dicho complejo es más estable en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que las distancias entre los residuos catalíticos y el sustrato permitiría la formación del complejo intermediario.

Por último, este es el primer trabajo que aporta información del efecto de los iones metálicos sobre la FUC-*Tm* a través del uso de simulaciones de DM, contribuyendo en la descripción de la interacción entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y FUC-*Tm*, permitiendo mejorar la síntesis de FucOS.

## 9 Perspectivas

Debido a que la enzima utilizada para llevar a cabo los presentes estudios es una enzima recombinante, se recomienda expresar la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* en *Escherichia coli*, modificando la presencia de la cola de histidina en el extremo N-terminal, con el propósito de evitar la agregación de la enzima y poder realizar estudios espectroscópicos.

Para corroborar los resultados obtenidos en la simulación de DM sobre la estabilidad de la estructura secundaria de FUC-*Tm*, se recomienda llevar a cabo un análisis de la estructura enzimática en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la técnica de dicroísmo circular.

Para validar los valores de  $\Delta G_u$  obtenidos en la simulación de DM del complejo, se sugiere estudiar el efecto de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la enzima a través de la técnica de fluorescencia.

Debido a que los resultados de DM mostraron que existe una región en la estructura de la enzima (*Loop-B*) que influye en la formación del bolsillo catalítico y, por tanto, en la actividad de la enzima, se recomienda rediseñar la estructura de FUC-*Tm*, a través de técnicas *in silico*, específicamente en el aminoácido Asp<sup>190</sup>, para evitar su influencia sobre la conformación del bolsillo catalítico y aumentar la actividad de la enzima.

## 10 Referencias

- Amara, A. A. A. F. (2013). Pharmaceutical and industrial protein engineering: where we are? *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(1), 217-232.
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Le-Doare, K. M. (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, 91(11), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 39(2), 23-29. <https://doi.org/10.30827/ars.v39i2.6008>
- Arslanoglu, S., Moro, G. E., Schmitt, J., Tandoi, L., Rizzardi, S., & Boehm, G. (2008). Early Dietary Intervention with a Mixture of Prebiotic Oligosaccharides Reduces the Incidence of Allergic Manifestations and Infections during the First Two Years of Life. *Journal Of Nutrition*, 138(6), 1091-1095. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1091>
- Arsov, A., Ivanov, I., Tsigoriyna, L., Petrov, K., & Petrova, P. (2022). In Vitro Production of Galactooligosaccharides by a Novel  $\beta$ -Galactosidase of *Lactobacillus bulgaricus*. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(22), 14308. <https://doi.org/10.3390/ijms232214308>
- Ballón. P., & Granados. T. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2), 55-72. Recuperado en 16 de marzo de 2023, de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&tlng=es)
- Benešová, E., Lipovová, P., Dvořáková, H., & Králová, B. (2013).  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Paenibacillus thiaminolyticus*: Its hydrolytic and transglycosylation abilities. *Glycobiology*, 23(9), 1052-1065. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt041>
- Biesiada, J., Porollo, A., Velayutham, P., Kouril, M., & Meller, J. (2011). Survey of public domain software for docking simulations and virtual screening. *Human Genomics*, 5(5), 497. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-5-497>
- BIOVIA, Dassault Systèmes, (2020). Discovery Studio Visualizer, Version v20.1.0.19295, San Diego: Dassault Systèmes.

- Bishnoi, R., Mahajan, S., & Ramya, T. N. C. (2018). An F-type lectin domain directs the activity of *Streptosporangium roseum* alpha-L-fucosidase. *Glycobiology*, 28(11), 860-875. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy079>
- Bode, L. (2009). Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. *Nutrition Reviews*, 67, S183-S191. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00239.x>
- Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 22(9), 1147-1162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>
- BRENDA (Braunschweig Enzyme Database), disponible en <https://www.brenda-enzymes.org/sequences.php?AC=Q9WYE2> consultado el 21 de febrero de 2023.
- Bridiau, N., Issaoui, N., & Maugard, T. (2010). The effects of organic solvents on the efficiency and regioselectivity of N-acetyl-lactosamine synthesis, using the  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans* in hydro-organic media. *Biotechnology Progress*, 26(5), 1278-1289. <https://doi.org/10.1002/btpr.445>
- Brunser T. (2019a). Carbohidratos complejos en la leche materna: oligosacáridos (Parte 1). *Revista chilena de nutrición*, 46(5), 626-632. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000500626>
- Brunser T. (2019b). Carbohidratos complejos en la leche materna: oligosacáridos (Parte 2). *Revista chilena de nutrición*, 46(5), 633-643. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182019000500633>
- Cala U. S. (2020). Investigating the effects of different concentrations of copper sulfate on the oxygen rate of the catalytic reaction of catalase Exploration Research Question. *ResearchGate*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20034.91845>
- Casanovas, J., Armelin, E., Iribarren, J. I., Alemán, C., & Liesa, F. (2005). La modelización molecular como herramienta para el diseño de nuevos polímeros conductores. *Polímeros*, 15(4), 239-244. <https://doi.org/10.1590/s0104-14282005000400006>
- Chen, J., Wang, J., & Zhu, W. (2016). Molecular Mechanism and Energy Basis of Conformational Diversity of Antibody SPE7 Revealed by Molecular Dynamics Simulation and Principal Component Analysis. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36900>

Chin, Y. W., J. Y. Kim, J. H. Kim, S. M. Jung, & J. H. Seo. (2017). Improved production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* by expressing putative  $\alpha$ -1,2-fucosyltransferase, WcfB from *Bacteroides fragilis*. *J. Biotechnol* 257, 192–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.033>

Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Bedini, E., Corsaro, M. M., Parrilli, M., Sulzenbacher, G., Lipski, A., Piazz, F. D., Lepore, L., Rossi, M., & Moracci, M. (2009).  $\beta$ -Glycosyl Azides as Substrates for  $\alpha$ -Glycosynthases: Preparation of Efficient  $\alpha$ -L-Fucosynthases. *Chemistry & Biology*, 16(10), 1097-1108. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.09.013>

Coluccio L. (2021). Energía Cinética-Enciclopedia Concepto, tipos y ejemplos. Concepto. Recuperado el 1 de septiembre de 2024 de <https://concepto.de/energia-cinetica/>

Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L., Viniegra-González, G., Bárzana, E., & García-Garibay, M. (2006). Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase in an organic medium. *Biotechnology And Bioengineering*, 93(6), 1123-1129. <https://doi.org/10.1002/bit.20824>

Donovan, S. M., & Comstock, S. S. (2016). Human Milk Oligosaccharides Influence Neonatal Mucosal and Systemic Immunity. *Annals Of Nutrition And Metabolism*, 69(Suppl. 2), 41-51. <https://doi.org/10.1159/000452818>

Du, M., Yang, S., Jiang, T., Liang, T., Li, Y., Cai, S., Wu, Q., Zhang, J., Chen, W., & Xie, X. (2022). Cloning, Expression, Purification, and Characterization of  $\beta$ -Galactosidase from *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 27(14), 4497. <https://doi.org/10.3390/molecules27144497>

Dudev, T., & Lim, C. (2013). Competition among Metal Ions for Protein Binding Sites: Determinants of Metal Ion Selectivity in Proteins. *Chemical Reviews*, 114(1), 538-556. <https://doi.org/10.1021/cr4004665>

Escamilla-Lozano, Y. (2011). Síntesis de oligosacáridos fucosilados por vía enzimática mediante reacciones de fucosilación. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Feng, S., Xue, M., Xie, F., Zhao, H., & Xue, Y. (2024). Characterization of *Thermotoga maritima* Esterase Capable of Hydrolyzing Bis(2-hydroxyethyl) Terephthalate. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01973>

Fried, S. D., Wang, L., Boxer, S. G., Ren, P., & Pande, V. S. (2013). Calculations of the Electric Fields in Liquid Solutions. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 117(50), 16236-16248. <https://doi.org/10.1021/jp410720y>

Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H., Izmaylov, A., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J., Hada, M., Ehara, M., ... Fox, D. (2016). Gaussian 09 Revision A.02.

Garrido, D., Dallas, D. C., & Mills, D. A. (2013). Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology*, 159(Pt\_4), 649-664. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064113-0>

Gheibi, N., Ghorbani, M., Shariatifar, H., & Farasat, A. (2019). *In silico* assessment of human Calprotectin subunits (S100A8/A9) in presence of sodium and calcium ions using Molecular Dynamics simulation approach. *PLoS ONE*, 14(10), e0224095. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224095>

Gudiel-Urbano, M., & Goñi, I. (2001). Oligosacáridos de la leche humana: Papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4), 332-339. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222001000400002](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000400002)

Guzmán-Rodríguez F. J. (2018a). Síntesis de oligosacáridos fucosilados con actividad biológica empleando fucosidasa de *Thermotoga maritima*. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018b). Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 186(3), 681-691. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2771-x>

Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2018c). Improvement of the transfucosylation activity of  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* for the synthesis of fucosylated oligosaccharides in the presence of calcium and sodium. *Extremophiles*, 22(6), 889-894. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1045-4>

Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2021). Synthesis of fucosylated oligosaccharides

with  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* immobilized on Eupergit® CM. *Extremophiles*, 25(3), 311-317. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01230-3>

Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2019). Employment of fucosidases for the synthesis of fucosylated oligosaccharides with biological potential. *Biotechnology And Applied Biochemistry*, 66(2), 172-191. <https://doi.org/10.1002/bab.1714>

Hancock, S. M., Vaughan, M. D., & Withers, S. G. (2006). Engineering of glycosidases and glycosyltransferases. *Current Opinion In Chemical Biology*, 10(5), 509-519. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.015>

Henrick, B. M., Yao, X., Nasser, L., Roozrogousheh, A., & Rosenthal, K. L. (2017). Breastfeeding Behaviors and the Innate Immune System of Human Milk: Working Together to Protect Infants against Inflammation, HIV-1, and Other Infections. *Frontiers In Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01631>

Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129-1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>

Holscher, H. D., Bode, L., & Tappenden, K. A. (2017). Human milk oligosaccharides influence intestinal epithelial cell maturation *in vitro*. *Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition*, 64(2), 296-301. <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000001274>

Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: Advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 8(1), 37–47. <https://doi.org/10.2147/AABC.S70333>

Hou, M., Liang, C., Fei, Y., Yang, D., Zhang, N., Lu, Y., Wang, L., Xing, Z., & Zhao, Z. (2023). Analysis of the effect of metal ions on the ability of Xylanase to hydrolyze wheat bran by molecular dynamics simulations. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1142873>

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

Jahnen-Dechent, W., & Ketteler, M. (2012). Magnesium basics. *Clinical Kidney Journal*, 5(Suppl 1), i3-i14. <https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfr163>

Jeilu, O., Alexandersson, E., Johansson, E., Simachew, A., & Gessesse, A. (2024). A novel GH3- $\beta$ -glucosidase from soda lake metagenomic libraries with desirable properties for biomass degradation. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60645-4>

Klontz, E. H., Li, C., Kihn, K., Fields, J. K., Beckett, D., Snyder, G. A., Wintrode, P.L., Deredge, D., Wang, L.X. & Sundberg, E. J. (2020). Structure and dynamics of an  $\alpha$ -fucosidase reveal a mechanism for highly efficient IgG transfucosylation. *Nature Communications*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20044-z>

Kobayashi, M., Hondoh, H., Mori, H., Saburi, W., Okuyama, M., & Kimura, A. (2011). Calcium ion-dependent increase in thermostability of dextran glucosidase from *streptococcus mutans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(8), 1557–1563. <https://doi.org/10.1271/bbb.110256>

Konar, S., Sinha, S. K., Datta, S., & Ghorai, P. K. (2019). Probing the Effect of Glucose on the Activity and Stability of  $\beta$ -Glucosidase: An All-Atom Molecular Dynamics Simulation Investigation. *ACS Omega*, 4(6), 11189–11196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00509>

Koval'ová, T., Koval', T., Stránský, J., Kolenko, P., Dušková, J., Švecová, L., Vodičková, P., Spiwok, V., Benešová, E., Lipovová, P., & Dohnálek, J. (2022). The first structure–function study of GH151  $\alpha$ -L-fucosidase uncovers new oligomerization pattern, active site complementation, and selective substrate specificity. *FEBS Journal*, 289(16), 4998–5020. <https://doi.org/10.1111/febs.16387>

Krupinskaitė, A., Stanislauskienė, R., Serapinas, P., Rutkienė, R., Gasparavičiūtė, R., Meškys, R., & Stankevičiūtė, J. (2024).  $\alpha$ -L-Fucosidases from an Alpaca Faeces Metagenome: Characterisation of Hydrolytic and Transfucosylation Potential. *International Journal Of Molecular Sciences*, 25(2), 809. <https://doi.org/10.3390/ijms25020809>

Lan, H., Shi, Y., Zhang, L., & Zhou, P. (2022). Progress in qualitative and quantitative analysis of oligosaccharides in the milks of four mammalian species Shipin Kexue/ *Food Science*, 43(13), 370-378. doi:10.7506/spkx1002-6630-20210330-374 <https://www.spkx.net.cn/CN/Y2022/V43/I13/370>

Latif, H., Lerman, J. A., Portnoy, V. A., Tarasova, Y., Nagarajan, H., Schrimpe-Rutledge, A. C., Smith, R. D., Adkins, J. N., Lee, D., Qiu, Y., & Zengler, K. (2013). The Genome

Organization of *Thermotoga maritima* Reflects Its Lifestyle. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003485.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003485>

Lefebvre, G., Shevlyakova, M., Charpagne, A., Marquis, J., Vogel, M., Kirsten, T., Kiess, W., Austin, S., Sprenger, N., & Binia, A. (2020). Time of Lactation and Maternal Fucosyltransferase Genetic Polymorphisms Determine the Variability in Human Milk Oligosaccharides. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.574459>

Lewis, Z. T., Totten, S. M., Smilowitz, J. T., Popovic, M., Parker, E., Lemay, D. G., Van Tassell, M. L., Miller, M. J., Jin, Y., German, J. B., Lebrilla, C. B., & Mills, D. A. (2015). Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0071-z>

Lezyk, M. J., Jers, C., Kjaerulff, L., Gottfredsen, C. H., Mikkelsen, M. D., & Mikkelsen, J. D. (2016). Novel  $\alpha$ -L-Fucosidases from a Soil Metagenome for Production of Fucosylated Human Milk Oligosaccharides. *PLOS ONE*, 11(1), e0147438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147438>

Liu, P., Zhang, H., Wang, Y., Chen, X., Jin, L., Xu, L., & Xiao, M. (2020). Screening and characterization of an  $\alpha$ -L-fucosidase from *Bacteroides fragilis* NCTC9343 for synthesis of fucosyl-N-acetylglucosamine disaccharides. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 104(18), 7827-7840. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10759-w>

Liu, S., Kulinich, A., Cai, Z. P., Y, H., MA, Du, Y. M., Lv, Y. M., Liu, L., & Voglmeir, J. (2016). The fucosidase-pool of *Emericella oligotrophica*: Biochemical characterization and transfucosylation potential. *Glycobiology*, 26(8), 871-879. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww030>

Liu, X., Geng, X., Liu, W., & Lyu, Q. (2022). Biochemical characterization of an  $\alpha$ -fucosidase PsaFuc from the GH29 family. *Process Biochemistry*, 122, 258-266. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.09.004>

López-Pérez, J. L. (2017). El modelado molecular: una herramienta para la mejora y obtención de nuevos fármacos. *FarmaJournal*, 2(1), 141–142. Recuperado a partir de <https://revistas.usal.es/cinco/index.php/2445-1355/article/view/15142>

Lozano-Aponte, J., & Scior, T. (2014). ¿Qué sabe Ud. Acerca de. . . Dinámica Molecular? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(1), 86-88. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57932293010.pdf>

- Lundemo, P., Karlsson, E. N., & Adlercreutz, P. (2017). Eliminating hydrolytic activity without affecting the transglycosylation of a GH1  $\beta$ -glucosidase. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 101(3), 1121-1131. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7833-9>
- Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2020). Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients*, 12(4), 1039. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>
- Madrazo de la Garza, J. A. (2017). Oligosacáridos de la leche humana. Crecimiento y desarrollo. *Acta Pediátrica de México*, 38(5), 295. <https://doi.org/10.18233/apm38no5pp295-2981468>
- Mahapatra, M. K., Bera, K., Singh, D. V., Kumar, R., & Kumar, M. (2017). *In silico* modelling and molecular dynamics simulation studies of thiazolidine based PTP1B inhibitors. *Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics*, 36(5), 1195-1211. <https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1317026>
- Martínez-Gascueña, A., Wu, H., Wang, R., Owen, C. D., Hernando, P. J., Monaco, S., Penner, M., Xing, K., Gall, G. L., Gardner, R., Ndeh, D., Urbanowicz, P. A., Spencer, D. I. R., Walsh, M., Angulo, J., & Juge, N. (2024). Exploring the sequence-function space of microbial fucosidases. *Communications Chemistry*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01212-4>
- Meng, X., Zhang, H., Mezei, M., & Cui, M. (2011). Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-aided Drug Design*, 7(2), 146-157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>
- Mestrom, L., Przypis, M., Kowalczykiewicz, D., Pollender, A., Kumpf, A., Marsden, S. R., Bento, I., Jarzębski, A. B., Szymańska, K., Chruściel, A., Tischler, D., Schoevaart, R., Hanefeld, U., & Hagedoorn, P. (2019). Leloir Glycosyltransferases in Applied Biocatalysis: A Multidisciplinary Approach. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(21), 5263. <https://doi.org/10.3390/ijms20215263>
- Minteer, S. D., Monaco, M. H., Wang, M. L., Comstock, S. S., Kuhlenschmidt, T. B., Fahey, G. C., Miller, M. I., Kuhlenschmidt, M. S., & Donovan, S. M. (2014). Human milk oligosaccharides shorten rotavirus-induced diarrhea and modulate piglet mucosal immunity and colonic microbiota. *The ISME Journal*, 8(8), 1609-1620. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.10>

- Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D. & Olson, A. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256.AutoDock4>
- Morrow, A.L., Newburg D., Neu J., & Poindexter B. (2019). Human milk oligosaccharide. *Gastroenterology and Nutrition, Elsevier*, pp. 43-57 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54502-0.00004-9>
- Mosca, F., & Gianni, M. L. (2017). Human milk: composition and health benefits. *La Pediatria Medica E Chirurgica*, 39(2). <https://doi.org/10.4081/pmc.2017.155>
- Moubareck, C. A. (2021). Human Milk Microbiota and Oligosaccharides: A Glimpse into Benefits, Diversity, and Correlations. *Nutrients*, 13(4), 1123. <https://doi.org/10.3390/nu13041123>
- Moya-González, E. M., Peña-Gil, N., Rubio-Del-Campo, A., Coll-Marqués, J. M., Gozalbo-Rovira, R., Monedero, V., Rodríguez-Díaz, J., & Yebra, M. J. (2022). Infant Gut Microbial Metagenome Mining of  $\alpha$ -L-Fucosidases with Activity on Fucosylated Human Milk Oligosaccharides and Glycoconjugates. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01775-22>
- Neville, M. C. (2009). Introduction: Alpha-Lactalbumin, a Multifunctional Protein that Specifies Lactose Synthesis in the Golgi. *Journal Of Mammary Gland Biology And Neoplasia*, 14(3), 211-212. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9149-1>
- O’Sullivan, A., Salcedo, J., & Rubert, J. (2018). Advanced analytical strategies for measuring free bioactive milk sugars: from composition and concentrations to human metabolic response. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3445-3462. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0913-1>
- Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C., & Tellier, C. (2007). Directed Evolution of the  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* into an  $\alpha$ -L-Transfucosidase. *Biochemistry*, 46(4), 1022-1033. <https://doi.org/10.1021/bi061444w>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91-102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>

Palcic, M. M. (2011). Glycosyltransferases as biocatalysts. *Current Opinion In Chemical Biology*, 15(2), 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.022>

Parkot, J., Hüfner E., Jennewein S., elling L., Engels L. (2011). Novel fucosyltransferases and their applications. *Jennewein Biotechnologie GmbH*. EP 2479263. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/MY-189569-A>

Pasricha, S., & Gahlot, P. (2022). How enzyme inhibition works! *Resonance*, 27(5), 825-834. <https://doi.org/10.1007/s12045-022-1375-5>

Pavón-Chimal, M. E., Jiménez-Pérez, C., Guzmán-Rodríguez, F., Alatorre-Santamaría, S., González-Olivares, L. G., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. E. (2022a). Mechanistic insight into the synthesis of fucooligosaccharides by  $\alpha$ -L-fucosidase from *Thermotoga maritima* belonging to the GH29 family: *in silico* study. *Biologia*, 78(7), 1825-1832. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01296-0>

Pavón-Chimal, ME, Jiménez-Pérez, C., Guzmán-Rodríguez, F. et al. (2022b). An *In silico* Analysis of Enzyme-Substrate Interaction in  $\alpha$ -L-Fucosidases Belonging to the GH29 Family. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 13. 1-15. 10.33263/BRIAC135.404. <https://biointerfaceresearch.com/wp-content/uploads/2023/01/BRIAC135.404.pdf>

Perdew, J. P., Burke, K., & Ernzerhof, M. (1996). Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*, 77(18), 3865-3868. <https://doi.org/10.1103/physrevlett.77.3865>

Perna, V. N., Meier, S., & Meyer, A. S. (2023). Enzymatic production of a suite of human milk oligosaccharides directly in milk. *Enzyme And Microbial Technology*, 165, 110196. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110196>

Ravindran S. (2015). Producing human milk sugars for use in formula. SPLASH! Milk science update. *J Internat Milk Genomics Consortium*. <https://www.milkgenomics.org/?splash=producing-human-milk-sugars-for-use-in-formula>

RCSB-PDB - 1HL8: Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-fucosidase, disponible en <https://www.rcsb.org/structure/1HL8> consultado el 2 de Marzo de 2023.

Robles-Arias, M. A., García-Garibay, M., Alatorre-Santamaría, S., Tello-Solís, S. R., Guzmán-Rodríguez, F., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. E. (2021b). Improvement of Fucosylated Oligosaccharides Synthesis by  $\alpha$ -L-Fucosidase from

*Thermotoga maritima* in Water-Organic Cosolvent Reaction System. Applied Biochemistry And Biotechnology, 193(11), 3553-3569. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03628-3>

Robles-Arias, M., Guzmán-Rodríguez, F., García-Garibay, M., Alatorre-Santamaría, S., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. (2021a).  $\alpha$ -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima*: hydrolytic and transfucosylation activities. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(3), 1-10. <https://doi.org/10.24275/rmiq/bio2407>

Rodríguez-Díaz, J., Carbajo, R. J., Pineda-Lucena, A., Monedero, V., & Yebra, M. J. (2013). Synthesis of Fucosyl- N -Acetylglucosamine Disaccharides by Transfucosylation Using  $\alpha$ -L-Fucosidases from *Lactobacillus casei*. *Applied And Environmental Microbiology*, 79(12), 3847-3850. <https://doi.org/10.1128/aem.00229-13>

Rudloff, S., & Kunz, C. (2012). Milk Oligosaccharides and Metabolism in Infants. *Advances In Nutrition*, 3(3), 398S-405S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001594>

Ruiz-Palacios, G. M., Cervantes, L. E., Ramos, P., Chávez-Munguía, B., & Newburg, D. S. (2003). *Campylobacter jejuni* Binds Intestinal H(O) Antigen (Fuc $\alpha$ 1, 2Gal $\beta$ 1, 4GlcNAc), and Fucosyloligosaccharides of Human Milk Inhibit Its Binding and Infection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14112-14120. <https://doi.org/10.1074/jbc.m207744200>

Salazar, S., Chávez, M., Delgado, X., & Pacheco, E. R. T. (2009). Lactancia materna. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 72(4), 163-166. [https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06492009000400010&script=sci\\_abstract](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06492009000400010&script=sci_abstract)

Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 13(4), 1518–1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.7b00028>

Schrodinger € LLC. (2015). The PyMOL molecular graphics system (2.4.0). Schrodinger, € LLC.

Scior, T., Morales, E. M., & Stefanón, E. S. (2007). Los modelos *in silico*. Una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos: Ciencia y cultura*. <http://elementos.buap.mx/num68/htm/45.htm>

Seydametova, E., J. Yu, J. Shin, Y. Park, C. Kim, H. Kim, S. H. Yu, Y. Park, & D. H. Kweon. (2019). Search for bacterial  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferases for whole-cell biosynthesis of 2'-

fucosyllactose in recombinant *Escherichia coli*. *Microbiological Research*, 222. 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.009>

Shaikh, F. A., Van Bueren, A. L., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2013). Identifying the Catalytic Acid/Base in GH29  $\alpha$ -L-Fucosidase Subfamilies. *Biochemistry*, 52(34), 5857-5864. <https://doi.org/10.1021/bi400183q>

Shapiro, L., & Harris, T. (2008). The rough guide to in silico function prediction, or how to use sequence and structure information to predict protein function. *PLoS Computational Biology*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000160>

Shen, J., Li, J., Zhang, Y., Mei, X., Xue, C., & Chang, Y. (2024). Characterization of an  $\alpha$ -L-fucosidase in marine bacterium *Wenylingzhuangia fucanilytica*: new evidence on the catalytic sites of GH95 family glycosidases. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 104(13), 8240-8247. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13659>

Shi, H., Zhang, Y., Li, X., Huang, Y., Wang, L., Wang, Y., Ding, H., & Wang, F. (2013). A novel highly thermostable xylanase stimulated by  $\text{Ca}^{2+}$  from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-26>

Shi, R., Yang, S.-Q., Wang, N.-N., Yan, Q.-J., Yan, X.-M., & Jiang, Z.-Q. (2023). Synthesis of 2'-fucosyllactose from apple pomace-derived xyloglucan oligosaccharides by an  $\alpha$ -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. CAU209. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(11), 3579–3591. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12533-0>

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. *Annual Review Of Nutrition*, 34(1), 143-169. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105721>

Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C. A., Withers, S. G., Henrissat, B., & Bourne, Y. (2004). Crystal structure of *Thermotoga maritima*  $\alpha$ -L-fucosidase. Insights into the catalytic mechanism and the molecular basis for fucosidosis. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(13), 13119-13128. <https://doi.org/10.1074/jbc.m313783200>

Summers, E. L., Moon, C. D., Atua, R., & Arcus, V. L. (2016). The structure of a glycoside hydrolase 29 family member from a rumen bacterium reveals unique, dual carbohydrate-binding domains. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 72(10), 750-761. <https://doi.org/10.1107/s2053230x16014072>

- Valdés-Tresanco, M. S., Valdés-Tresanco, M. E., Valiente, P. A., & Moreno, E. (2021). gmx\_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *Journal Of Chemical Theory And Computation*, 17(10), 6281-6291. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>
- Van Bueren, A. L., Fayers-Kerr, J., Luo, B., Zhang, Y., Sollogoub, M., Blériot, Y., Rovira, C., & Davies, G. J. (2010). Analysis of the Reaction Coordinate of  $\alpha$ -L-Fucosidases: A Combined Structural and Quantum Mechanical Approach. *Journal Of The American Chemical Society*, 132(6), 1804-1806. <https://doi.org/10.1021/ja908908q>
- Vargas-Aguilar, A. A., & Fuentes-Condori. (2021). Estudios *in Silico*, Simulando Vida en un Entorno Virtual. *Gaceta Médica Boliviana*, 44(2), 278-279. <https://doi.org/10.47993/gmb.v44i2.263>
- Venditti, J. J., Swann, J. M., & Bean, B. S. (2010). Hamster Sperm-Associated Alpha-L-Fucosidase functions during fertilization. *Biology Of Reproduction*, 82(3), 572-579. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076695>
- Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., & Illanes, A. (2017). Optimization of reaction conditions and the donor substrate in the synthesis of hexyl- $\beta$ -d-galactoside. *Process Biochemistry*, 58, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.005>
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.1.1-43.2001>
- Wang, H., Qi, X., Gao, S., Kan, G., Damdindorj, L., An, Y., & Lu, F. (2024). Characterization of a novel multifunctional  $\beta$ -glucosidase/xylanase/feruloyl esterase and its effects on improving the quality of Longjing tea. *Food Chemistry*, 453, 139637. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139637>
- Wu, S., Snajdrova, R., Moore, J. C., Baldenius, K., & Bornscheuer, U. T. (2020). Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angewandte Chemie*, 60(1), 88-119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>
- Yan, J., Liu, L., Zhu, Y., Huang, G., & Wang, P. P. (2014). The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1267>.

Zehra, S., Khambati, I., Vierhout, M., Mian, M.F., Buck, R. and Forsythe, P. (2018). Human milk oligosaccharides attenuate antigenantibody complex induced chemokine release from human intestinal epithelial cell lines. *Journal of Food Science* 83, 499-508. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14039>

Zeuner, B., & Meyer, A. S. (2020). Enzymatic transfucosylation for synthesis of human milk oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 493, 108029. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108029>

Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2014). Methods for Improving Enzymatic Trans-glycosylation for Synthesis of Human Milk Oligosaccharide Biomimetics. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 62(40), 9615-9631. <https://doi.org/10.1021/jf502619p>

Zeuner, B., M. Vuillemin, J. Holck, J. Muschiol, & A. S. Meyer. (2018). Loop engineering of an  $\alpha$ -1, 3/4-L-fucosidase for improved synthesis of human milk oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 115, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.04.008>

Zeuner, B., Muschiol, J., Holck, J., Lezyk, M., Gedde, M. R., Jers, C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2018). Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29  $\alpha$ -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology*, 41, 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.002>

Zeuner, B., Teze, D., Muschiol, J., & Meyer, A. S. (2019). Synthesis of Human Milk Oligosaccharides: Protein Engineering Strategies for Improved Enzymatic Transglycosylation. *Molecules*, 24(11), 2033. <https://doi.org/10.3390/molecules24112033>

Zhao, C., Wu, Y., Liu, X., Liu, B., Cao, H., Yu, H., Sarker, S. D., Nahar, L., & Xiao, J. (2017). Functional properties, structural studies and chemo-enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Trends In Food Science & Technology*, 66, 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.008>

Zhong, R., Gao, L., Chen, Z., Yuan, S., Chen, X., & Zhao, C. (2021). Chemoenzymatic synthesis of fucosylated oligosaccharides using *Thermosynechococcus*  $\alpha$ 1–2-fucosyltransferase and their application in the regulation of intestinal microbiota. *Food Chemistry X*, 12, 100152. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100152>

Zhou, W., Jiang, H., Wang, L., Liang, X., & Mao, X. (2021). Biotechnological Production of 2'-Fucosyllactose: A Prevalent Fucosylated Human Milk Oligosaccharide. *ACS Synthetic Biology*, 10(3), 447-458. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00645>

Zhu, L., Xu, Q., Liu, W., Xu, Q., Zhang, L., Gao, X., & Cai, J. (2024). Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -AFase, for hydrolyzed ginsenoside Rc from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression And Purification*, 217, 106432. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106432>

Zuurveld, M., Van Witzenburg, N. P., Garssen, J., Folkerts, G., Stahl, B., Land, B. V., & Willemsen, L. E. M. (2020). Immunomodulation by Human Milk Oligosaccharides: The Potential Role in Prevention of Allergic Diseases. *Frontiers In Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00801>

## 11. Anexo

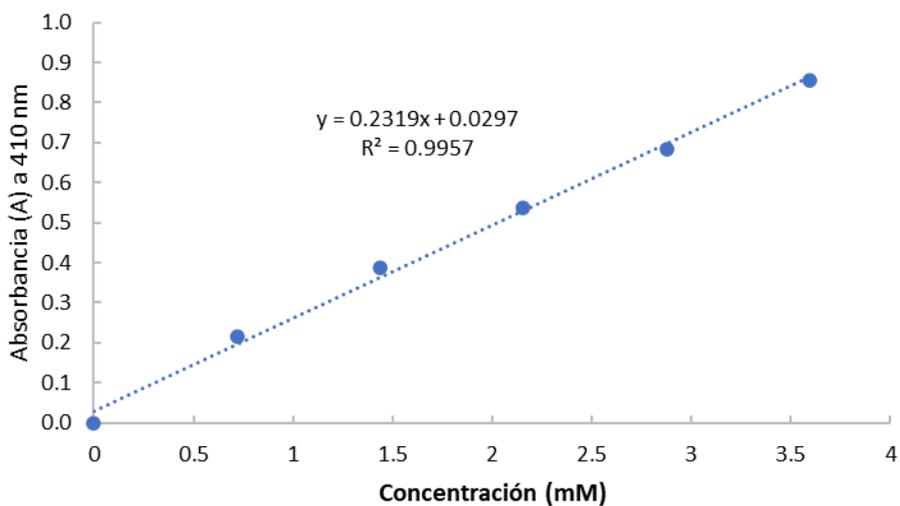


Figura 1 A. Curva patrón de 4-nitrofenol (pNP) diluido en regulador de acetatos 1 mM pH 5. Esta curva fue empleada para la cuantificación de pNP liberado en la reacción de hidrólisis catalizada por FUC-Tm.

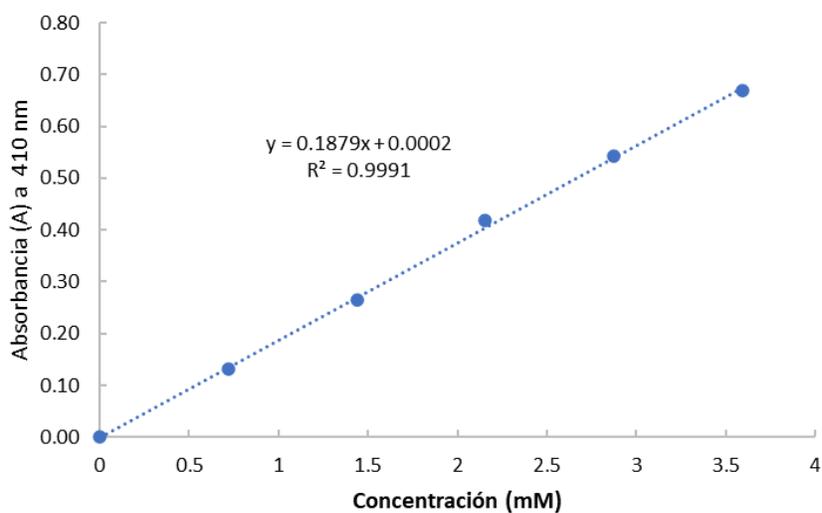


Figura 2 A. Curva patrón de 4-nitrofenol (pNP) diluido en regulador de acetatos 1 mM pH 10. Esta curva fue empleada para la cuantificación de pNP liberado en la reacción de transfucosilación catalizada por FUC-Tm.

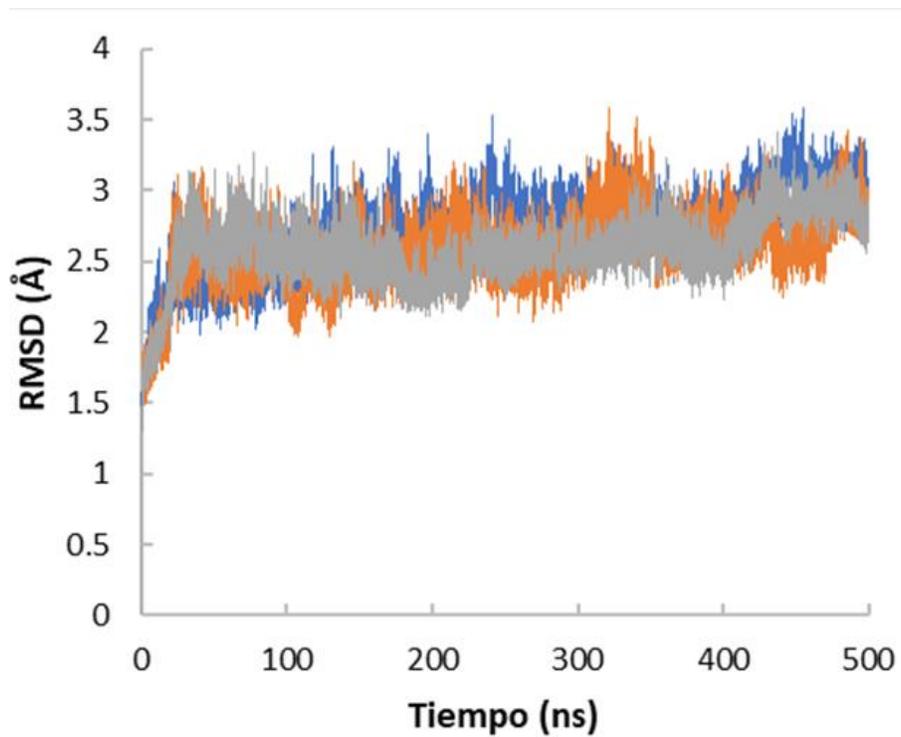


Figura 3 A. RMSD de FUC-Tm en el sistema en ausencia de  $Ca^{2+}$  a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado.

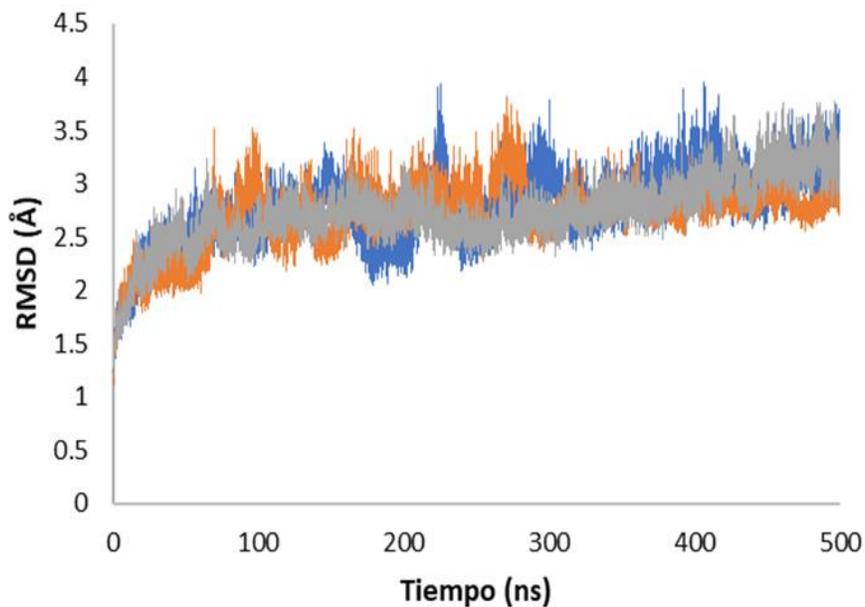


Figura 4 A. RMSD de FUC-Tm en el sistema con  $Ca^{2+}$  a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado.

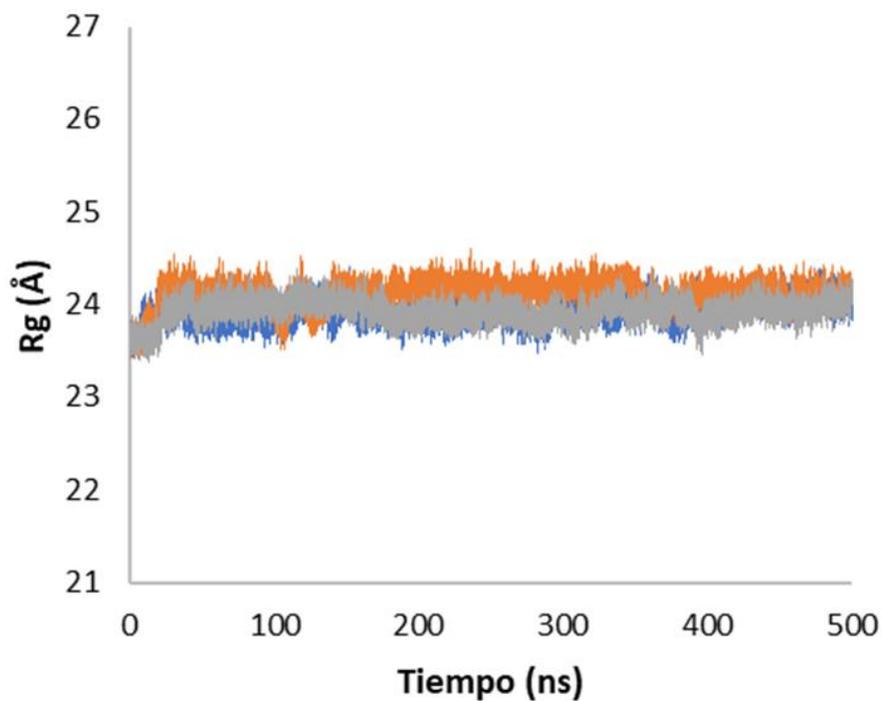


Figura 5 A. Radio de giro ( $R_g$ ) de FUC-Tm en el sistema en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado.

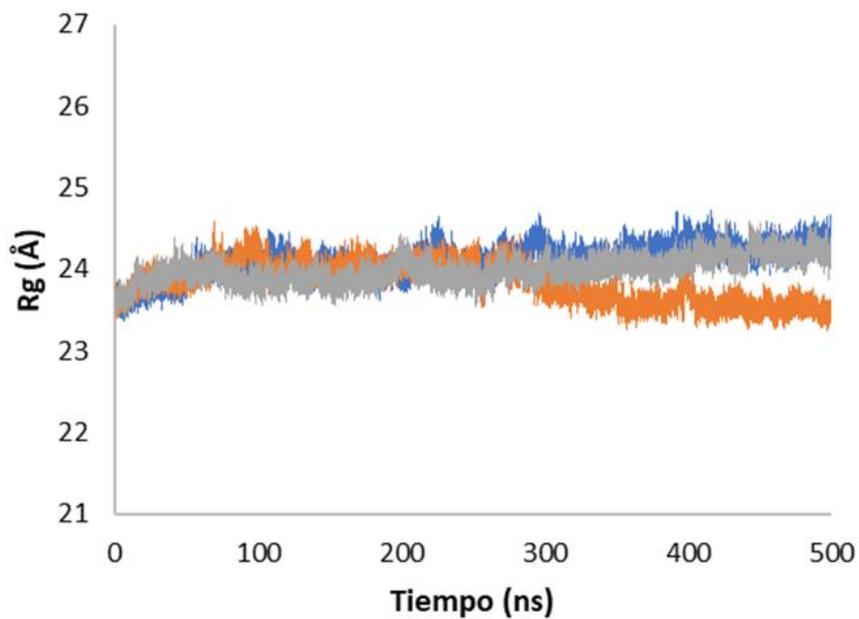


Figura 6 A. Radio de giro ( $R_g$ ) de FUC-Tm en el sistema con  $\text{Ca}^{2+}$  (FUC-Tm- $\text{Ca}^{2+}$ ) a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado.

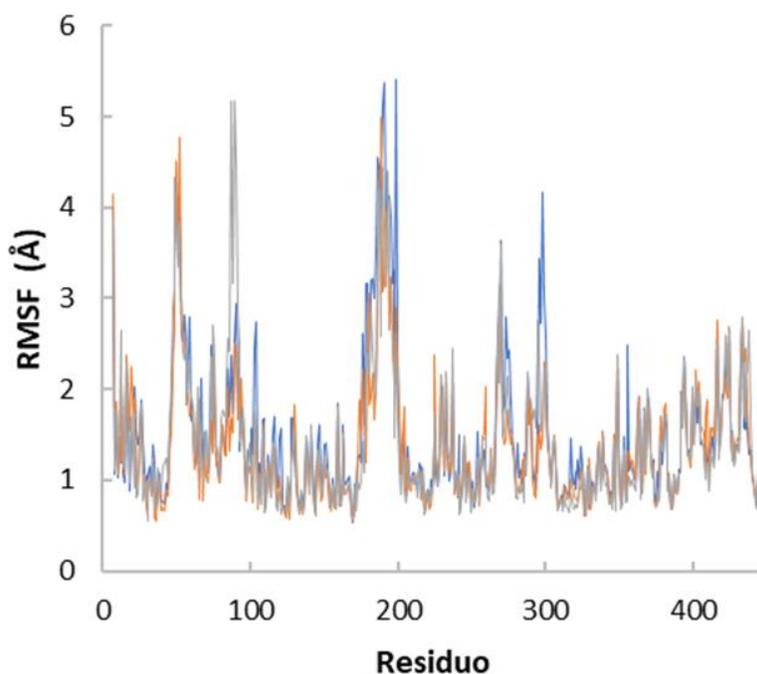


Figura 7 A. RMSF de FUC-Tm en el sistema en ausencia de  $Ca^{2+}$  a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado.

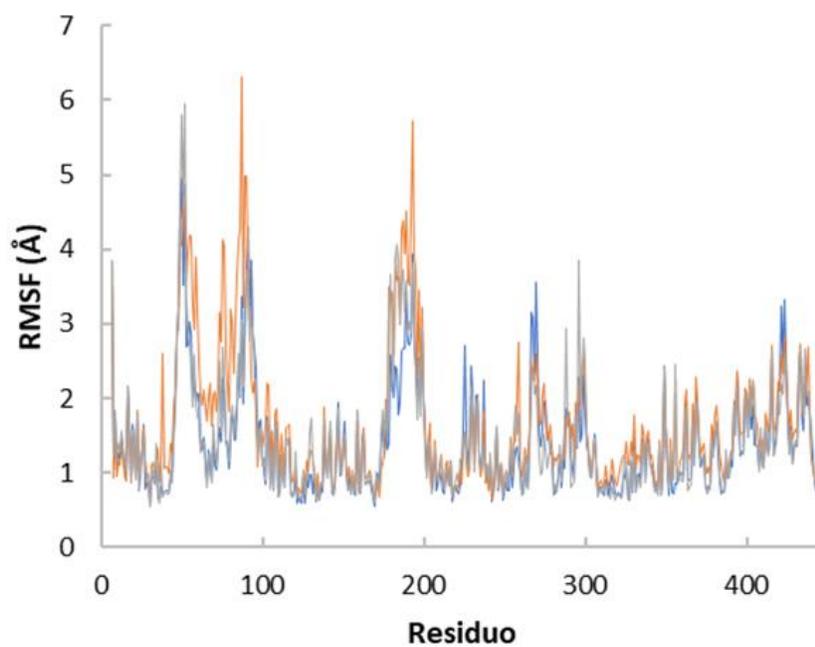
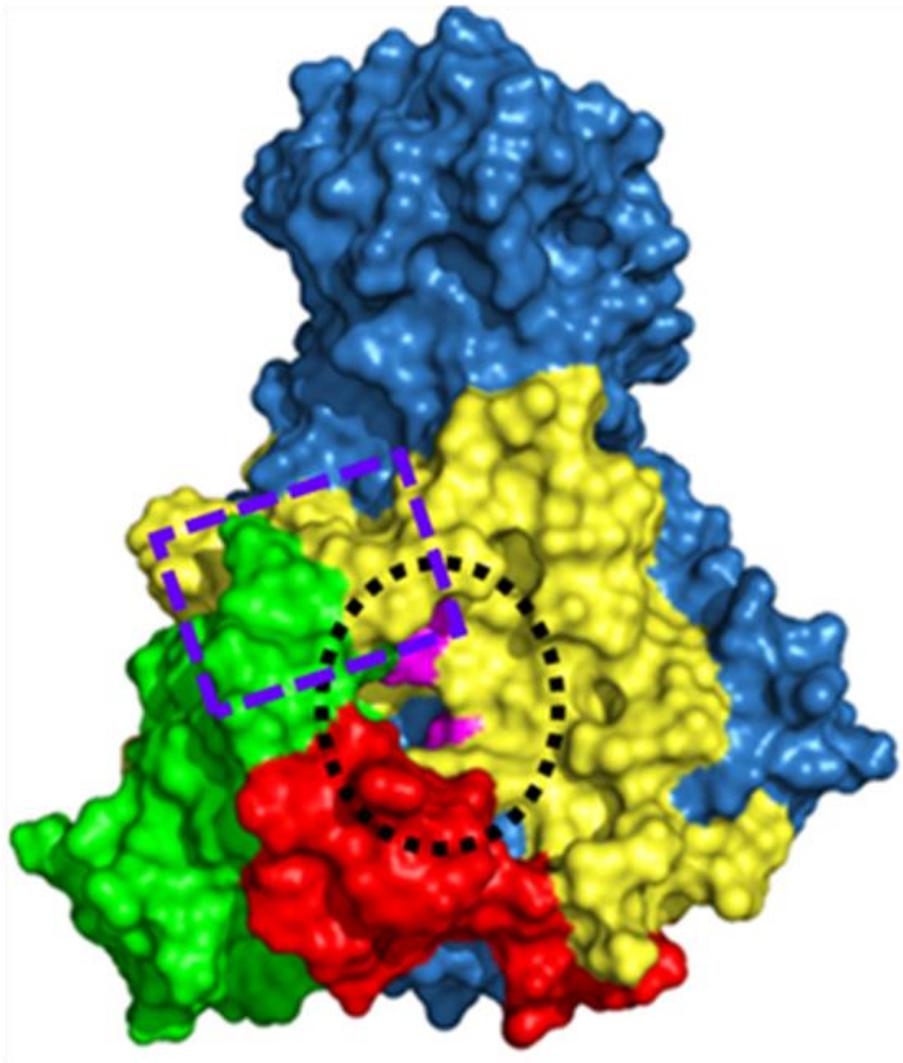


Figura 8 A. RMSF de FUC-Tm en el sistema con  $Ca^{2+}$  a lo largo de los 500 ns de simulación de DM por triplicado.

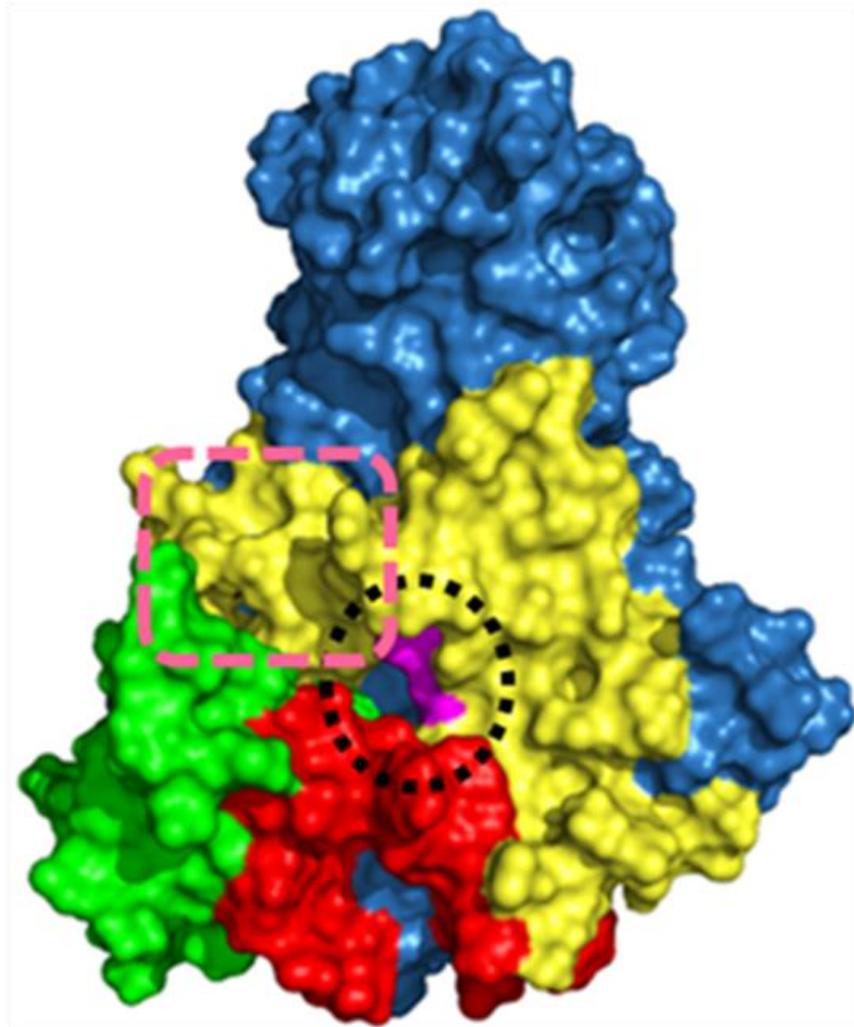
# A



■ Loop-A ■ Loop-B ■ Sitio activo ■ Residuos catalíticos ● Bolsillo catalítico □ Segunda cavidad □ Interacción entre Loop-A y región del Sitio activo

Figura 9 A. Estructura 3D de FUC-Tm a los 0.1 ns de la DM en el sistema en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

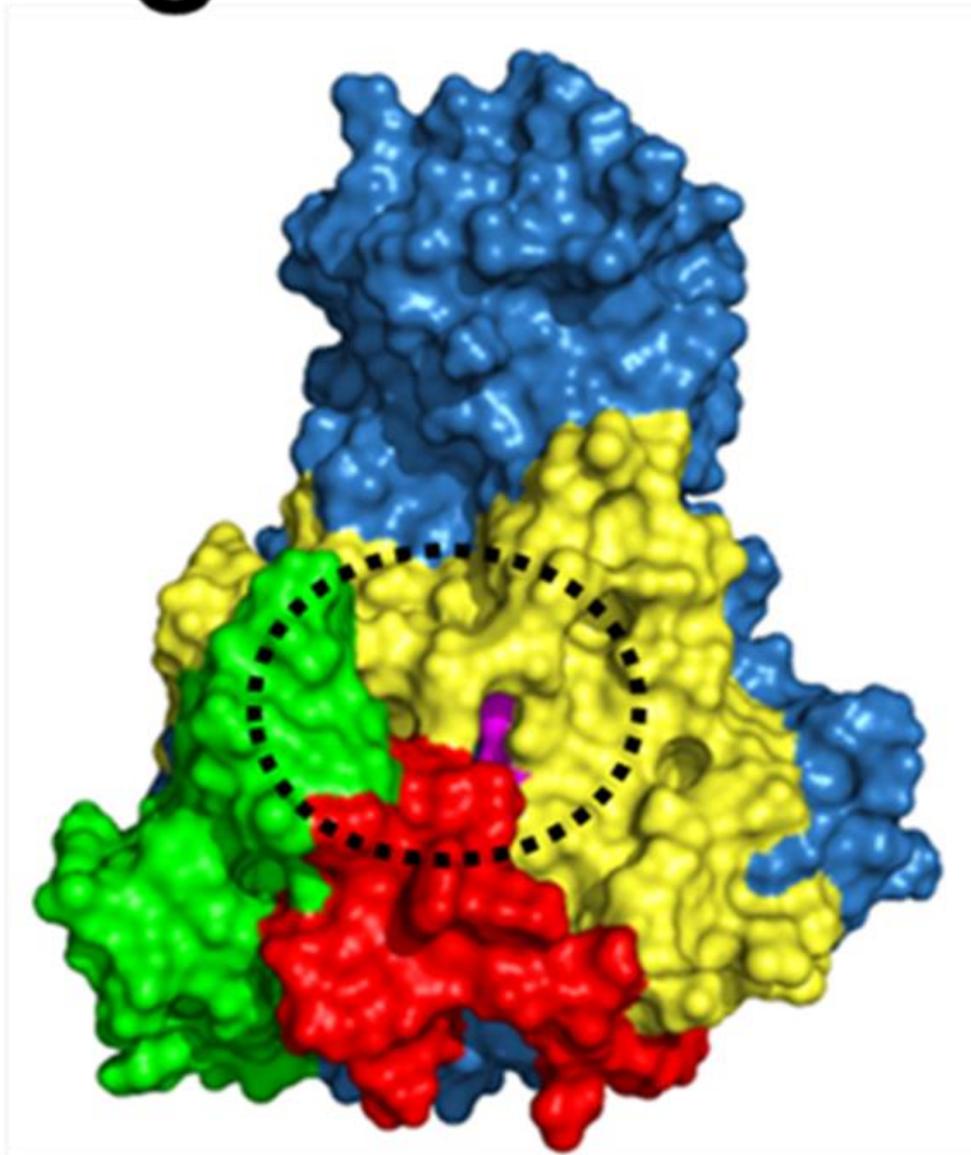
# B



■ Loop-A ■ Loop-B ■ Sitio activo ■ Residuos catalíticos ● Bolsillo catalítico □ Segunda cavidad catalítica

Figura 10 A. Estructura 3D de FUC-Tm a los 130.1 ns de la DM en el sistema en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

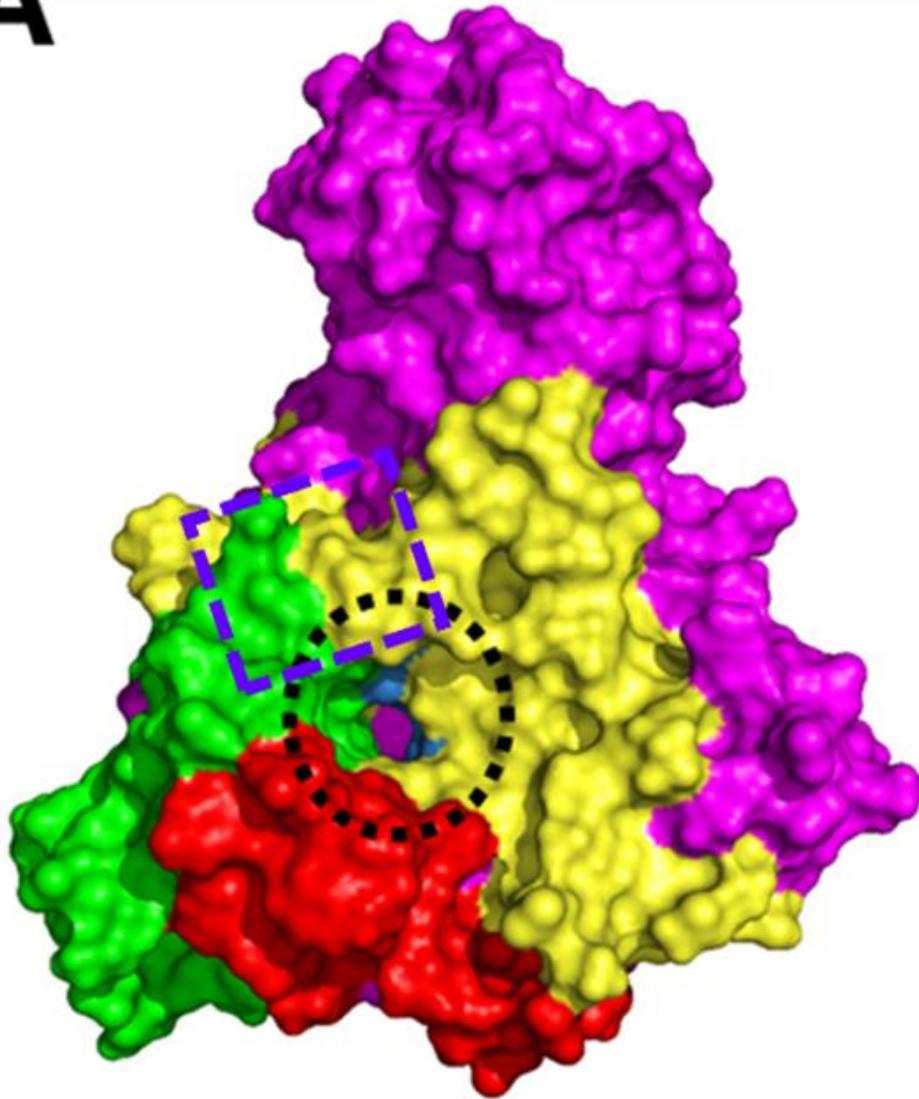
C



■ Loop-A ■ Loop-B ■ Sitio activo ■ Residuos catalíticos ● Bolsillo catalítico

Figura 11 A. Estructura 3D de FUC-Tm a los 303 ns de la DM en el sistema en ausencia de  $Ca^{2+}$ .

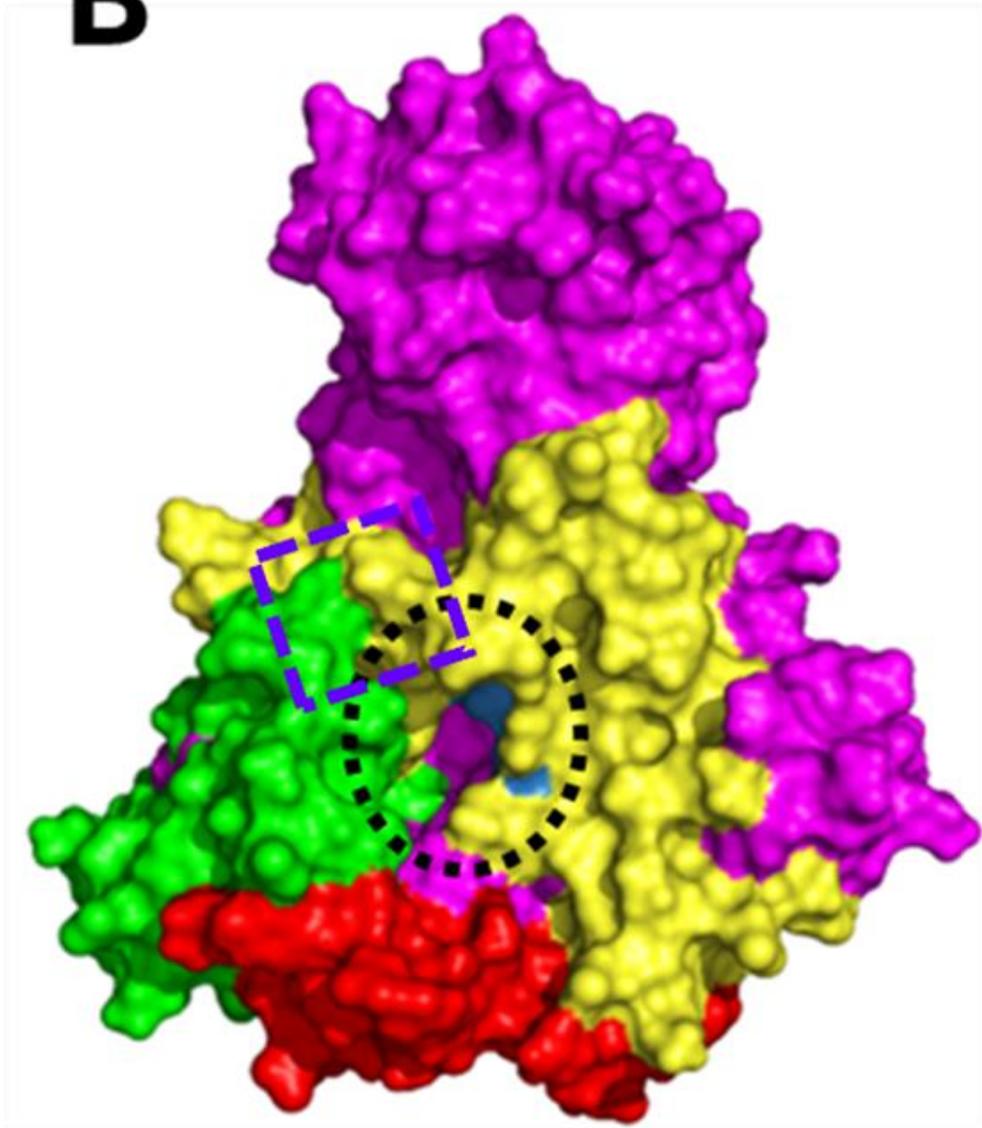
# A



■ Loop-A ■ Loop-B ■ Sitio activo ■ Residuos catalíticos ● Bolsillo catalítico □ Interacción entre Loop-A y región del Sitio activo

Figura 12 A. Estructura 3D de FUC-Tm a los 0.1 ns de la DM en el sistema en presencia de  $Ca^{2+}$ .

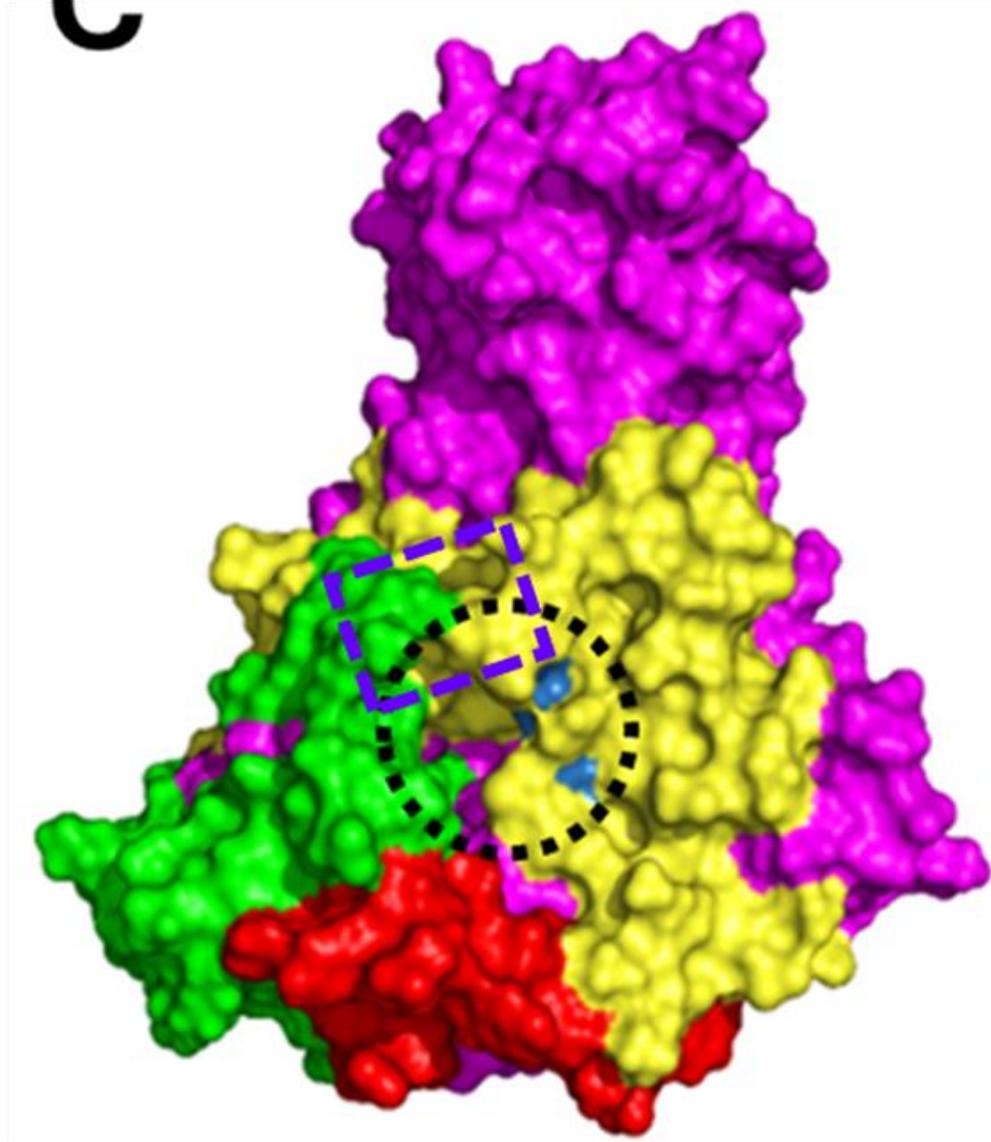
# B



■ Loop-A ■ Loop-B ■ Sitio activo ■ Residuos catalíticos ● Bolsillo catalítico □ Interacción entre Loop-A y región del Sitio activo

Figura 13 A. Estructura 3D de FUC-Tm a los 130.1 ns de la DM en el sistema en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

C



■ Loop-A ■ Loop-B ■ Sitio activo ■ Residuos catalíticos ● Bolsillo catalítico □ Interacción entre Loop-A y región del Sitio activo

Figura 14 A. Estructura 3D de FUC-Tm a los 303 ns de la DM en el sistema en presencia de  $Ca^{2+}$ .

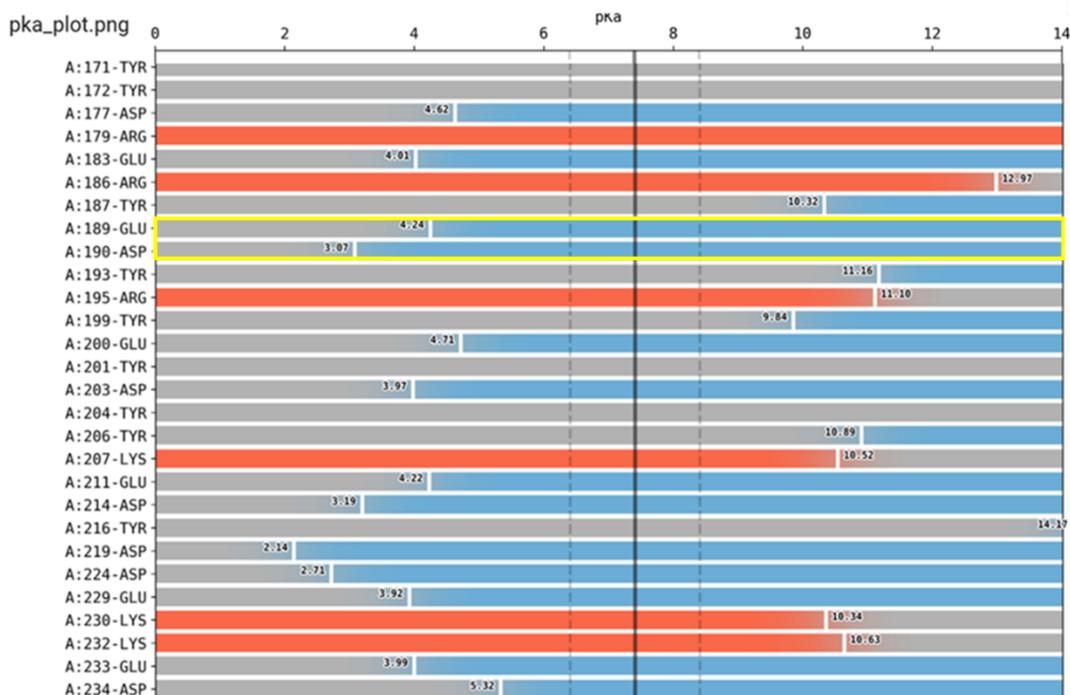


Figura 15 A. Estado de protonación de FUC-Tm en el sistema de reacción en presencia de  $Ca^{2+}$ , resultados obtenidos del programa PlayMolecule.

En la Figura 15 A, cada aminoácido se representa con su propio pKa (intersección blanca), que se puede describir como el pH al que el residuo coexiste en la forma protonada y desprotonada (50% protonado y 50% desprotonado). En color gris indica la "forma neutra" del residuo, el color rojo significa que el residuo está en su "forma positiva" y el color azul muestra que el residuo está en su "forma negativa". El estado de protonación de GLU<sup>189</sup> y ASP<sup>190</sup> presentes en el *Loop-B*, está señalado por un recuadro amarillo.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00313

Matrícula: 2223801903

Efecto de iones en la actividad de la  $\alpha$ -L-fucosidasa de *Thermotoga maritima* empleada en la síntesis de oligosacáridos fucosilados.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 5 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS  
 DR. MAURICIO EDUARDO PAVON CHIMAL  
 DR. EMMANUEL PEREZ ESCALANTE  
 M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: CATALINA TORRES OCHOA

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

Aprobar

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



REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
 DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. SALVADOR RAMON TELLO SOLIS

VOCAL

DR. MAURICIO EDUARDO PAVON CHIMAL

VOCAL

DR. EMMANUEL PEREZ ESCALANTE

SECRETARIA

M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ