



På vej mod bedre modermælkserstatning

Modermælk indeholder særlige kulhydrater, humane mælkeoligosakkarider (HMO), som har afgørende betydning for spædbarnets sundhed. Modermælkserstatning baseret på komælk mangler disse unikke molekyler, hvorfor der er stor interesse for at fremstille HMO til industriel brug.

Af Birgitte Zeuner og Anne S. Meyer, Center for BioProcess Engineering, DTU Kemiteknik

Modermælk består primært af laktose (ca. 70 g/L), fedt (ca. 40 g/L), protein (ca. 8 g/L) og humane mælkeoligosakkarider (HMO; 5-20 g/L). I komælk, som bruges til fremstilling af modermælks-erstatning, er laktoseniveauet lavere (ca. 50 g/L), proteinniveauet højere (ca. 30 g/L) og mængden af oligosakkarider forsvindende lille (<0.05 g/L) [1].

Det er for længst bevist, at HMO har stor betydning for spædbarnets helbred - heriblandt beviselig præbiotiske effekter, dvs. gavnlig udvikling af barnets tarmbakterieflora, samt en række immuno-

modulerende effekter. Derfor er der naturligt nok stor interesse blandt producenter af modermælkserstatning for at udnytte årtiers forskningsresultater i fremstilling af HMO og deres individuelle biologiske effekter til at opnå et bedre produkt: modermælkserstatning med HMO.

Der er identificeret omkring 200 forskellige HMO-strukturer i modermælk. Interessen har naturligt nok koncentreret sig om at forsøge at producere de mest dominerende HMO. Sammensætningen af HMO i modermælk er afhængig af moderens såkaldte udskillerstatus og blodtype [2], se faktaboks 1.

Hos "udskillerne" (ca. 80% af mødrene) er 2'-fukosyllactose (2'FL) den mest udbredte HMO efterfulgt af lakto-*N*-fukopentaose I (LNFP I) og lakto-*N*-tetraose (LNT). Hos de resterende 20% ("ikke-udskillerne") er LNT mest udbredt efterfulgt af lakto-*N*-fukopentaose (LNFP II) [2], se faktaboks 1.

Produktion af HMO

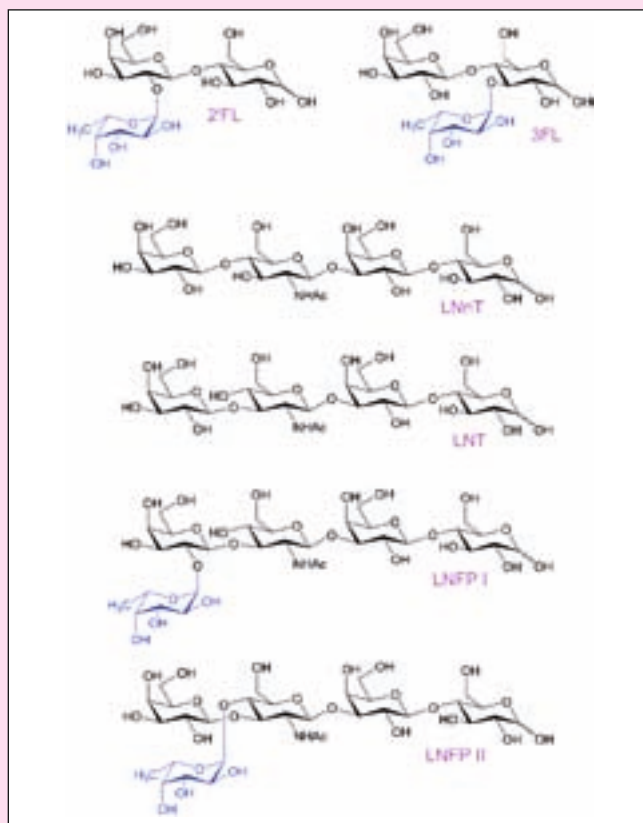
I 2016 sendte amerikanske Abbott modermælkserstatning med 2'FL på markedet under navnet Similac Pro-Advance. I 2017

sendte schweiziske Nestlé i samarbejde med danske Glycom modermælkserstatning med både 2'FL og lakto-*N*-neotetraose (LNnT) på det spanske marked. I forhold til LNT er den terminale galaktose i LNnT bundet via en β 1,4-binding fremfor via en β 1,3-binding til *N*-acetylglukosamin, se faktaboks 1. LNnT er den tiende mest udbredte HMO-struktur. Både 2'FL og LNnT anvendt i modermælkserstatningen fra Nestlé er produceret vha. genetisk modificering af *Escherichia coli*; produkterne er godkendt af både EFSA og FDA. Desuden indgik amerikanske DuPont sidst i 2016 et samarbejde med belgiske Inbio om produktion af 2'FL via fermentering. Flere andre producenter af 2'FL opererer også på markedet med enten fermentering eller kemisk syntese [3], og som det vil fremgå nedenfor er det også muligt at producere HMO direkte via enzymatisk syntese.

Genetisk modificering af f.eks. *E. coli* til produktion af HMO kræver en række knock-in og knock-out af gener. Hvor selve fermenteringen let kan opskaleres, har oprensning af produktet længe været en udfordring - særligt hvis koncentrationen er lav og skalaen er stor. Når der arbejdes med genmodificerede organismer, er det et ufravigeligt krav, at slutproduktet er helt fri for disse [4]. Fermentering giver godt udbytte af simple HMO-strukturer som 2'FL, men generelt går udbyttet ned, når kompleksiteten i den ønskede HMO-struktur går op [5].

Et alternativ til fermentering med genetisk modificeret *E. coli* er brug af glykosylhydrolaser (GH) til enzymatisk fremstilling af HMO. I forhold til clean label bruges enzymer kun som proceshjælpemidler. I mennesket - og i modificeret

Faktaboks 1: Omtalte HMO-strukturer



Udskillerstatus og HMO

Forekomsten af bestemte HMO-strukturer i modermælken er afhængigt af moderens genetiske profil, nærmere bestemt hendes såkaldte udskillerstatus.

Omtrent 80% af befolkningen er "udskillerne" og producerer bl.a. 2'-FL vha. fukosyltransferase 2 (FUT2), hvorimod de resterende 20% ikke har aktivt FUT2 og derfor ikke producerer α -1,2-fukosyleret HMO (de kaldes "ikke-udskillerne") [2].

Det er vist, at denne forskel har effekt på spædbarnets tarmflora og dermed muligvis også på udvikling af immunforsvaret.

Svanholm.com

Test de sidste nye Svanholm.com produkter:

Nyhed! bug lab

Buglab BE3000 OD probe måler online OD i bakterie- og gær-fermenteringer lineært med DCW. Mange bobler + kraftig omrøring generer ikke!

securecell applikon

Svanholm.com sælger Lucullus PIMS software inklusiv Applikon fermentere. Lucullus styrer også Sartorius, Dasgip, Infors, Ambr, og øger funktionaliteten meget.

numera

Numera sampling system tager, håndterer og filtrerer prøver fra fermenteringer 24/7 fra lab til GMP.

Ny version! nanoAnalytics

Ny cellZscope2 og cZs+ måler TEER og cellelags-kapacitans under hypoxia og som drug response monitor.

Svanholm.com - Jeres fermenterings og biomedical ekspert
www.svanholm.com - Tlf. 7026 5811 - mail@svanholm.com

E. coli - er HMO-syntesen katalyseret af specifikke glykosyltransferaser (GT), men bortset fra enkelte mikrobielle GT kræver denne type enzymer nukleotid-bundne donorsubstrater, som på nuværende tidspunkt er for kostbare at bruge til industriel produktion. Fokus er i stedet på GH, som er nemme at udtrykke, robuste og kan anvende forholdsvis billige substrater, men som skal virke via en revers katalyse for, at syntesen af HMO opnås.

Vi har tidligere beskrevet både genetisk modificerede og nyopdagede sialidaser til enzymatisk produktion af sialylerede HMO ud fra substrater fra mejeriindustrien (se bl.a. Dansk Kemi 2015, 96, nr. 3, s. 8-10). Sialylerede HMO udgør 15-35% af mængden af HMO i modermælk [2]. Til sammenligning udgør fukosylerede HMO 30-70% af mængden - i begge tilfælde afhængigt af moderens udskillerstatus [2].

Xyloglukan: en naturligt forekommende fukosyldonor

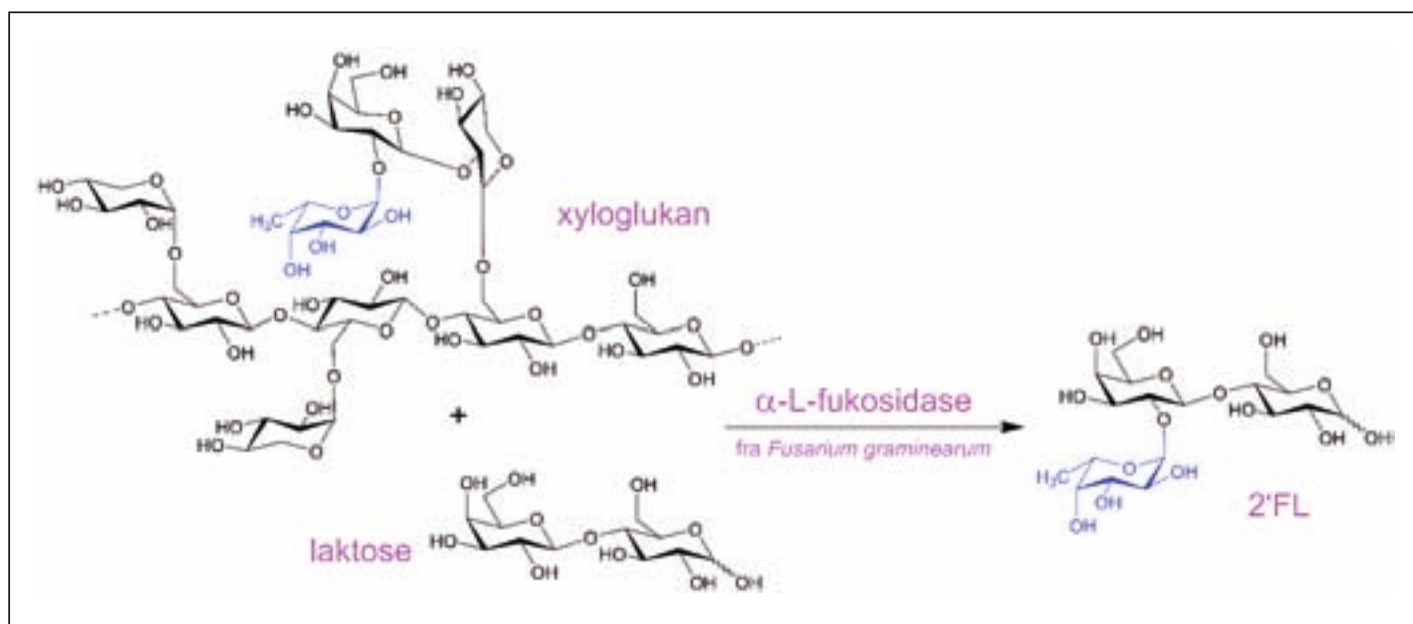
Indtil videre har brugen af fukosidaser (GH familie 29) til produktion af fukosylerede HMO været begrænset både af manglen på en forholdsvis billig, naturligt forekommende fukosyldonor og af manglen på tilstrækkeligt effektive transfukosylaser med den rette katalytiske regioselektivitet, dvs. sikring af korrekt placering af fukose-enheden på acceptorsubstratet. Produktionsprocessen for 2'FL og andre fukosylerede HMO patenteret af danske Glycom vedrører således brug af enten kemisk syntetiserede aromatiske fukosylderivat eller



andre fukosylerede HMO som fukosyldonorer. Særligt populær i laboratoriet er f.eks. *p*-nitrophenyl α -L-fukopyranosid, som frigiver giftig *p*-nitrophenol under reaktionen(!). I naturen findes fukose - udover i HMO og i en række glykaner på celleoverfladerne - i bl.a. xyloglukan fra visse planter. I vores nye studie [6] har vi udvundet fukosyleret xyloglukan fra citrusskræl og anvendt dette som fukosyldonor.

I xyloglukan er fukose bundet til

galaktose med en α -1,2-binding, figur 1. Brug af dette substrat som fukose-donor kræver derfor en fukosidase, som er aktiv på α -1,2-fukosyleringer. Netop de α -1,2-fukosylerede er de mest udbredte HMO-strukturer [2]. Blandt fem udvalgte α -L-fukosidaser fra GH29 subfamilie A, som alle havde transfukosyleringsaktivitet med 2'FL som donor og LNT som acceptor, gjorde en enkelt sig særlig bemærket, nemlig FgFCO1 fra plantepatogen *Fusarium*



Figur 1. Produktion af den mest udbredte HMO-struktur 2'-fukosyllaktose (2'FL) kan katalyseres af α -L-fukosidasen FgFCO1 fra *Fusarium graminearum* ud fra biomasse: vi anvendte laktose og fukosyleret xyloglukan udvundet af citrusskræl. Udover 2'FL (14% udbytte) dannes også fri fukose [6].

■ Enzymatiske katalysatorer i HMO-produktion

Glykosylhydrolaser (GH):

Fra et aktiveret donorsubstrat (f.eks. naturligt forekommende di-/oligo-/polysakkarid eller *p*-nitrophenyl glykosid) kan GH katalysere transglykosylering i konkurrence med hydrolyse af donorsubstratet. Ofte er transglykosyleringsproduktet også substrat for en efterfølgende hydrolyse. Produktudbyttet afhænger således af balancen mellem enzymets transglykosyleringsaktivitet og dets hydrolyseaktivitet, og kan bl.a. forøges ved at anvende en høj acceptorkoncentration.

Transglykosidaser (TG):

Egentlig GH, hvor hydrolyseaktiviteten er (stort set) fraværende. Forholdsvist sjældne i naturen, især inden for HMO-strukturer. Dog findes et enkelt velstuderet eksempel, nemlig transsialidaser fra *Trypanosoma*-parasitter - mest kendt er transsialidasen fra *Trypanosoma cruzi*.

Glykosyltransferaser (GT):

Katalyserer HMO-syntesen *in vivo*. Kræver nukleotid-aktiverede donormolekyler og er ofte membranbundne - og derfor vanskelige at arbejde med *in vitro*.

Glykosyntaser (GS):

Ved substitution af den katalytiske nukleofil med en ikke-nukleofil aminosyre fjernes hydrolyseaktiviteten fra GH. GS anvender gerne glykosylfluorider som substrater. α -L-Fukosyntaser benytter syntetisk β -fukosylfluorid, som er ustabil. Syntetisk β -fukosylazid er et alternativ.

Genetisk modificeret *E. coli*:

Gennem en række knock-in af gener for f.eks. glykosyltransferaser og transportere til at få substrat ind og produkt ud af cellen samt knock-out af bl.a. *lacZ* β -galactosidase, kan simple HMO-strukturer som 2'FL produceres ved fermentering.

Selvom det er to kostbare HMO-strukturer (3FL og LNT), der er i brug som substrater, kan der med denne metode opnås en blanding med tre forskellige HMO-strukturer, nemlig LNT, 3FL og LNFP II. LNT er som nævnt blandt de tre mest udbredte HMO-strukturer generelt, mens den mere komplekse LNFP II er den næstmest udbredte i modermælk fra de ca. 20% "ikke-udskillere". Mens fermentering af modificeret *E. coli* med rimeligt udbytte af LNT og 3FL er beskrevet, er det hidtil ikke lykkedes at producere den mere komplekse LNFP II ved fermentering [3,5]. En kombination af fermentering og fukosidase-katalyseret transfukosylering er således en oplagt mulighed.

Vores forskning i enzymatisk transfukosylering er støttet af Det Frie Forskningsråd - Teknologi og Produktion (bevilling til BZ).

E-mail:

Birgitte Zeuner: biz@kt.dtu.dk

Anne S. Meyer: am@kt.dtu.dk

Referencer

1. Bode L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 2012; 22: 1147-1162.
2. Kunz C, Meyer C, Collado YC, Geiger L, Garcia-Manzana Y, Bertua-Rios Z, Martinez-Costa Z, Borsch C, Rudloff S. Influence of gestational age, secretor, and Lewis blood group status on the oligosaccharide content of human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2017; 64: 789-798.
3. Sprenger GA, Baumgärtner F, Albermann C. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations. *Journal of Biotechnology* 2017; 258: 79-91.
4. Bode L, Contractor N, Barile D, Pohl N, Prudden AR, Boons GJ, Jin YS, Jennewein S. Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: challenges and opportunities for research and application. *Nutrition Reviews* 2016; 74: 635-644.
5. Petschacher B, Nidetzky B. Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: Prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems. *Journal of Biotechnology* 2016; 235: 61-83.
6. Zeuner B, Muschiol J, Holck J, Lezyk M, Gedde MR, Jers C, Mikkelsen JD, Meyer AS. Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29 α -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology* 2018; 41: 34-45.
7. Fan S, Zhang H, Chen X, Lu L, Xu L, Xiao M. Cloning, characterization, and production of three α -L-fucosidases from *Clostridium perfringens* ATCC 13124. *Journal of Basic Microbiology* 2016; 56: 347-357.
8. Saumonneau A, Champion E, Peltier-Pain P, Molnar-Gabor D, Hendrickx J, Tran V, Hederos M, Dekany G, Tellier C. Design of an α -L-transfucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs. *Glycobiology* 2016; 26: 261-269.

graminearum: FgFCO1 katalyserede dannelsen af 2'FL - den mest udbredte HMO - med fukosyleret xyloglukan som fukosyldonor og laktose som acceptor, figur 1. Udbyttet var 8% efter fire timer og 14% efter 24 timer [6]. FgFCO1 havde lav hydrolyseaktivitet på 2'FL, og derfor faldt produktudbyttet ikke i løbet af de 24 timers reaktion, som det ellers ofte er tilfældet med glykosidase-katalyseret transglykosylering.

Ny fukosidase med høj transfukosyleringsaktivitet

For nyligt blev tre nye fukosidaser fra patogene *Clostridium perfringens* ATCC 13124 beskrevet [7]. Én af dem - CpAfc2 - havde hydrolytisk aktivitet på HMO-lignende strukturer og blev klassificeret som medlem af GH29 underfamilie B, der indeholder α -1,3/4-fukosidaser, som specifikt er aktive på forgrenede α -1,3- og α -1,4-fukosyleringer. I vores nye studie [6] viste vi, at rekombinant CpAfc2 katalyserede dannelsen af LNFP II fra 3FL og LNT med et udbytte på 34-39%. Dette er et langt højere udbytte, end hvad der er rapporteret for to native α -L-1,3-fukosidaser fra *Bifidobacterium* sp. og på niveau med hvad der er opnået med en genetisk modificeret variant af α -L-1,3/4-fukosidase fra *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* [6,8]. Det er således sandsynligt, at flere effektive transfukosidaser kan identificeres, selvom ingen i dag er kendte.



Pipetteservice

Akkrediteret kalibrering
Reparation • Vedligeholdelse

Gilson Center of Excellence • Certificerede teknikere • 20 års erfaring
• Alle førende fabrikater • Elektroniske certifikater • Serviceaftaler



Biolab A/S,
Sindalsvej 29, DK-8240 Risskov,
Tlf: 8621 2866 Fax: 8621 2301
E-mail: pipetteservice@biolab.dk
www.biolab.dk



Cal. Reg. Nr. 482