

Produktion af humane mælkeoligosakkarider

Humane mælkeoligosakkarider er særlige kulhydrater i mælk, som har stor betydning for den nyfødtes helbred og udvikling. Disse molekyler mangler i modermælkserstatninger. Enzymer kan producere humane mælkeoligosakkarider, men der kræves optimering af både enzym og reaktionsbetingelser for at opnå et tilfredsstillende udbytte.

Af Birgitte Zeuner, Carsten Jers, Jørn Dalgaard Mikkelsen og Anne S. Meyer, Center for BioProcess Engineering, DTU Kemiteknik

Modermælk er rig på bestemte komplekse kulhydrater – humane mælkeoligosakkarider (HMO) – som er vigtige for den nyfødtes helbred og udvikling [1]. Da komælk, der bruges som basis for modermælkserstatning, ikke indeholder samme mængde og diversitet af denne type oligosakkarider, arbejdes der på at syntetisere HMO både enzymatisk og kemisk.

Sialidaser og transsialidaser

Omkring 28% af HMO er sialylerede [2], dvs. molekylerne er substituerede med sialinsyre. Sialinsyre kan tilføjes til en lang række sakkarider vha. enzymer med transsialidaseaktivitet. Den mest kendte, naturligt forekommende transsialidase stammer fra *Trypanosoma cruzi*. Denne organisme er en patogen parasit, som forårsager sygdommen amerikansk trypanosomiasis (Chagas' sygdom, som 7-8 mio. mennesker lider af i Sydamerika), og et enzym fra denne organisme er derfor problematisk at få godkendt til fødevarerbrug. Der findes imidlertid en

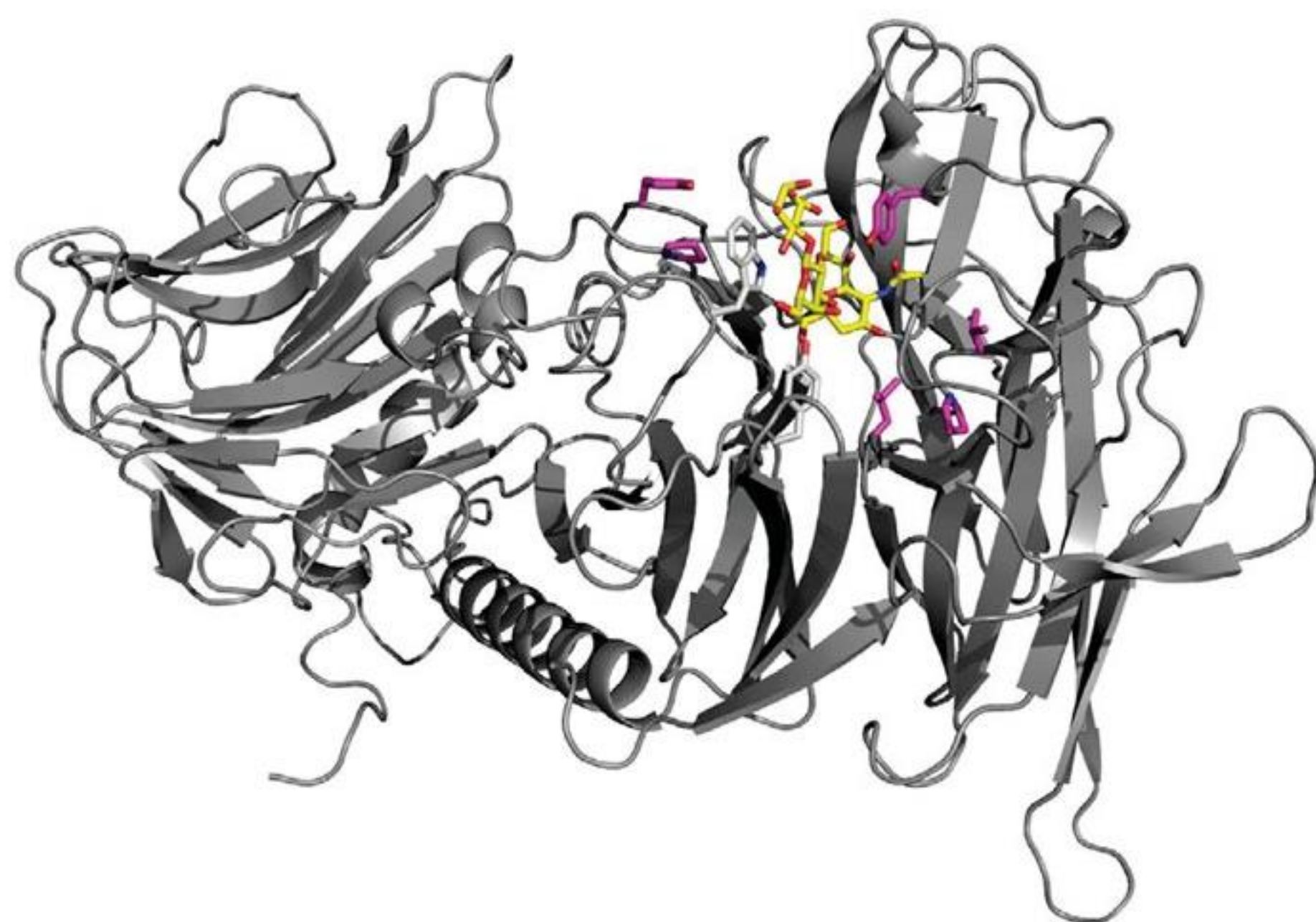
sialidase (dvs. et enzym, der katalyserer hydrolyse af sialinsyre fra kulhydrater) fra *Trypanosoma rangeli*, der ikke er patogen, som på aminosyreniveau er 70% identisk med transsialidasen fra *T. cruzi*. Sialidasen fra *T. rangeli* har fra naturens hånd en meget lav transsialidaseaktivitet. En række studier – også hos os – har arbejdet med at forøge transsialidaseaktiviteten ved at bruge aminosyresekvensen fra transsialidasen som skabelon for aminosyreændringer (figur 1) [3,4]. Selvom man med relativt få mutationer (6-13 aminosyrer) har tilført sialidasen fra *T. rangeli* markant højere transsialidaseaktivitet, besidder de muterede enzymer dog stadig sialidaseaktivitet, som hydrolyserer både substrat og produkt og dermed har negativ indflydelse på udbyttet. Derfor har vi yderligere arbejdet med at optimere reaktionsbetingelserne for på den måde at øge udbyttet af sialyleret produkt [5,6].

Optimeret produktion af 3'-sialyllaktose

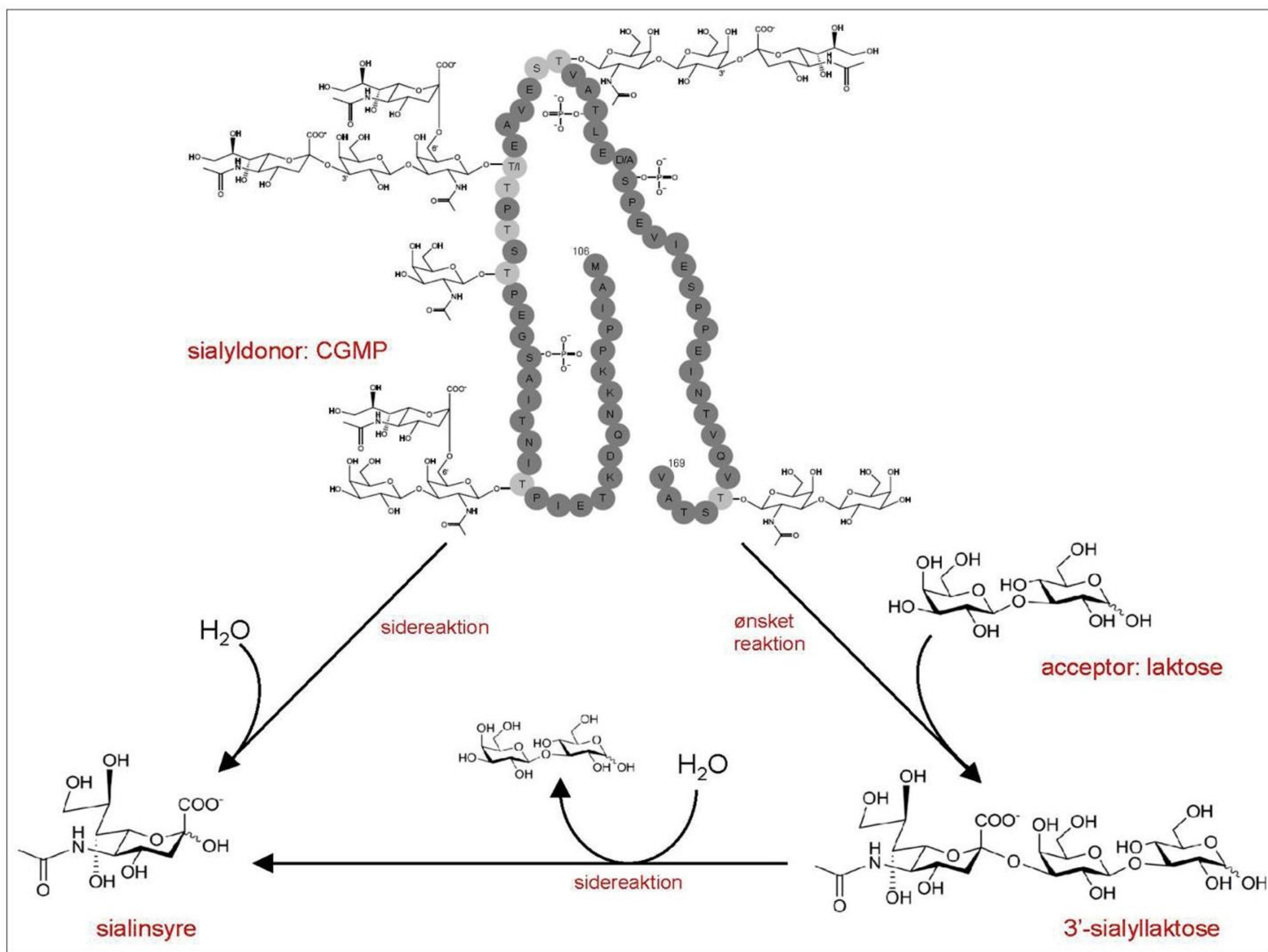
Som modelreaktion brugte vi produktionen af 3'-sialyllaktose ud fra to billige produkter fra mejeriindustrien: Laktose og kaseinglykomakropeptid (CGMP) (figur 2). CGMP er det opløselige glykoprotein, der bliver tilovers i osteproduktionen, når osteløben katalyserer spaltningen af κ -casein. Det er p.t. en af de billigste kilder til sialinsyre; indholdet af sialinsyre i CGMP er 5-11%.

Det gælder generelt for transglykosyleringer med uønsket substrat- og produkthydrolyse som sidereaktion, at et højt forhold mellem acceptorkoncentrationen (koncentrationen af laktose) og donorkoncentrationen (koncentrationen af sialinsyre i CGMP) giver optimale betingelser for transglykosyleringen. Det viste sig, at en forøgelse af acceptor/donor-forholdet fra 14 til 25 gav mere end 15 gange forbedring af transsialyleringsudbyttet ved brug af den optimerede sialidase Tr6; hvor Tr6 betegner et enzym med øget transsialidaseaktivitet, som er designet ved at ændre seks bestemte aminosyrer i *T. rangeli*-sialidasen. En yderligere forøgelse af forholdet til 50 gav ikke en yderligere effekt [5].

For at begrænse omfanget af produkthydrolyse mest muligt er det vigtigt at bestemme den optimale reaktionstid. Her kan enzymet inaktiveres eller – endnu bedre – fjernes fra reaktoren og siden genbruges. Alternativt kan produktet kontinuert fjernes fra reaktoren, f.eks. ved brug af en membranreaktor. For at optimere udbyttet af 3'-sialyllaktose pr. mængde anvendt enzym – den såkaldte biokatalytiske produktivitet – undersøgte vi potentialet i både immobilisering og brug af membranreaktor i forhold til batchreaktionen.



Figur 1. Tr6 (GenBank U83180.1) – en sialidase fra *Trypanosoma rangeli* optimeret vha. mutagenese til at katalysere transsialylering. De seks muterede aminosyrer omkring det aktive site er angivet (blå). Det ønskede produkt, 3'-sialyllaktose, er angivet i det aktive site (gul). Desuden er Trp313, som er vigtig for binding og korrekt orientering af acceptormolekylet laktose, samt den katalytiske nukleofil Tyr343 angivet (grå). Vist uden His-tag.



Figur 2. Enzymatisk produktion af 3'-sialyllaktose fra kaseinglykomakropeptid (CGMP) og laktose – begge sidestrømsprodukter fra mejeriindustrien. Der anvendes sialidaser optimeret til transsialylering, men disse katalyserer fortsat hydrolyse af såvel substrat som produkt til fri sialinsyre – to sidereaktioner, der skal holdes på så lavt et niveau som muligt vha. reaktionsoptimering.

Immobilisering eller membranreaktor?

Vi undersøgte tre forskellige metoder til immobilisering af den optimerede sialidase Tr6. Ved krydsbinding med glutaraldehyd og indkapsling i kalciumalginat mistede Tr6 al sin aktivitet, mens *fouling*-induceret membranimmobilisering blev fravalgt pga. for lav immobiliseringseffektivitet [6]. Derimod opnåede vi en høj immobiliseringseffektivitet (94%) ved immobilisering på magnetiske nanopartikler via enzymets His-tag (en "hale" af seks histidinenheder, som bruges i enzymoprensningen), og det viste sig desuden, at immobiliseringen havde en positiv effekt på forholdet mellem transsialylering og den uønskede hydrolyse af substrat og produkt (figur 3, side 10). Desværre viste det sig, at bindingen mellem enzymet og den magnetiske nanopartikel ikke var så stærk som ønsket: I løbet af syv på hinanden følgende reaktioner af en times varighed tabte nanopartiklerne så meget enzym, at der kun var 7% af den oprindelige aktivitet tilbage [6]. Det kan konkluderes, at immobilisering i sig selv kan have en positiv effekt på forholdet mellem transsialylering og hydrolyse, men at der kræves en stærkere immobiliseringsmetode førend enzymet, der i sig selv er stabilt i over 24 timer ved reaktionstemperaturen, kan genanvendes mange gange.

Det bedste resultat blev opnået ved at bruge fri Tr6 i en såkaldt "dead-end"-membranreaktor med en 10 kDa cellulosemembran, som tilbageholdt CGMP og enzym, men lod produktet 3'-sialyllaktose, acceptorsubstratet laktose og en del af

Sialidaser og transsialidaser

Sialidase: Et enzym, der katalyserer hydrolyse af glykosidbindingen mellem sialinsyre og især kulhydrater, glykoproteiner eller glykolipider.

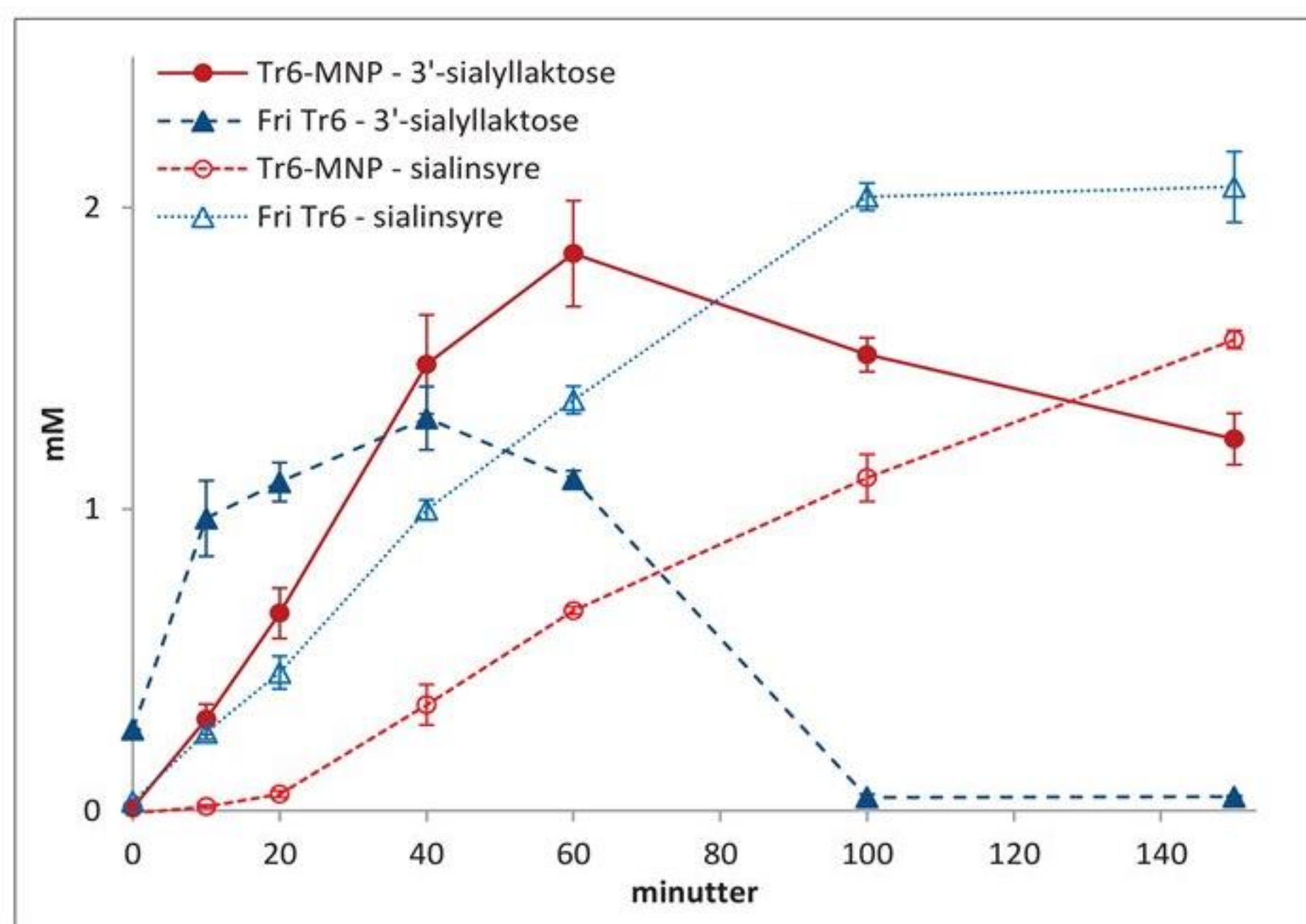
Transsialidase: Et enzym, der katalyserer hydrolyse af glykosidbindingen mellem sialinsyre og f.eks. kulhydrater og umiddelbart derefter katalyserer dannelsen af en ny glykosidbinding til et andet acceptormolekyle (populært sagt "flyttes" en sialinsyreenhed fra ét molekyle til et andet).

Membranteknologi

Fouling: Ophobning af komponenter fra den filtrerede blanding på membranens overflade.

Dead-end membranreaktor: Flowet i reaktoren går på tværs af membranen; en typisk dead-end membranreaktor er en cylinder med en flad membran monteret i bunden, hvor det transmembrane tryk skabes vha. trykluft.

Cross-flow membranreaktor: Flowet i reaktoren går langs membranen; dette giver mindre fouling end i en dead-end membranreaktor.



Figur 3. Produktion af 3'-sialyllaktose og det uønskede hydrolyseprodukt sialinsyre ved brug af den optimerede sialidase Tr6 på hhv. fri form og immobiliseret på magnetiske nanopartikler (MNP). Reaktionen blev fulgt i op til 2,5 time for at fastslå den optimale reaktionstid. Niveauet af 3'-sialyllaktose når et maksimum (ved den optimale reaktionstid) inden den Tr6-katalyserede, uønskede produkthydrolyse tager over, jf. figur 2. Modificeret fra [6].

biproduktet sialinsyre passere. Udbyttet af 3'-sialyllaktose var stabilt over syv timers reaktion, hvor der blev fyldt nyt substrat på hver time, og på et niveau, som var sammenligneligt med det, der blev opnået ved immobilisering (figur 4). Den biokatalytiske produktivitet kunne øges mere end ni gange i forhold til batchreaktionen, som var udgangspunktet (tabel 1). Til sammenligning gav immobiliseringen kun en 2,5 ganges forøgelse pga. tabet af enzym fra immobiliseringssupporten (tabel 1) [6]. Med baggrund i Tr6s høje stabilitet ved reaktionstemperaturen er det sandsynligt, at reaktionen kan gentages endnu flere gange med samme høje udbytte, hvorved en endnu højere biokatalytisk produktivitet opnås.

	Biokatalytisk produktivitet	Molært udbytte
Fri Tr6 i batchreaktor	33,5 ^a	28 % ^e
MNP-Tr6 (1 gang)	47,6 ^b	40 % ^f
MNP-Tr6 (7 gange)	84,1 ^c	10 % ^g
Fri Tr6 i membranreaktor (1 gang)	34,3 ^a	29 % ^e
Fri Tr6 i membranreaktor (7 gange)	305,6 ^d	37 % ^f

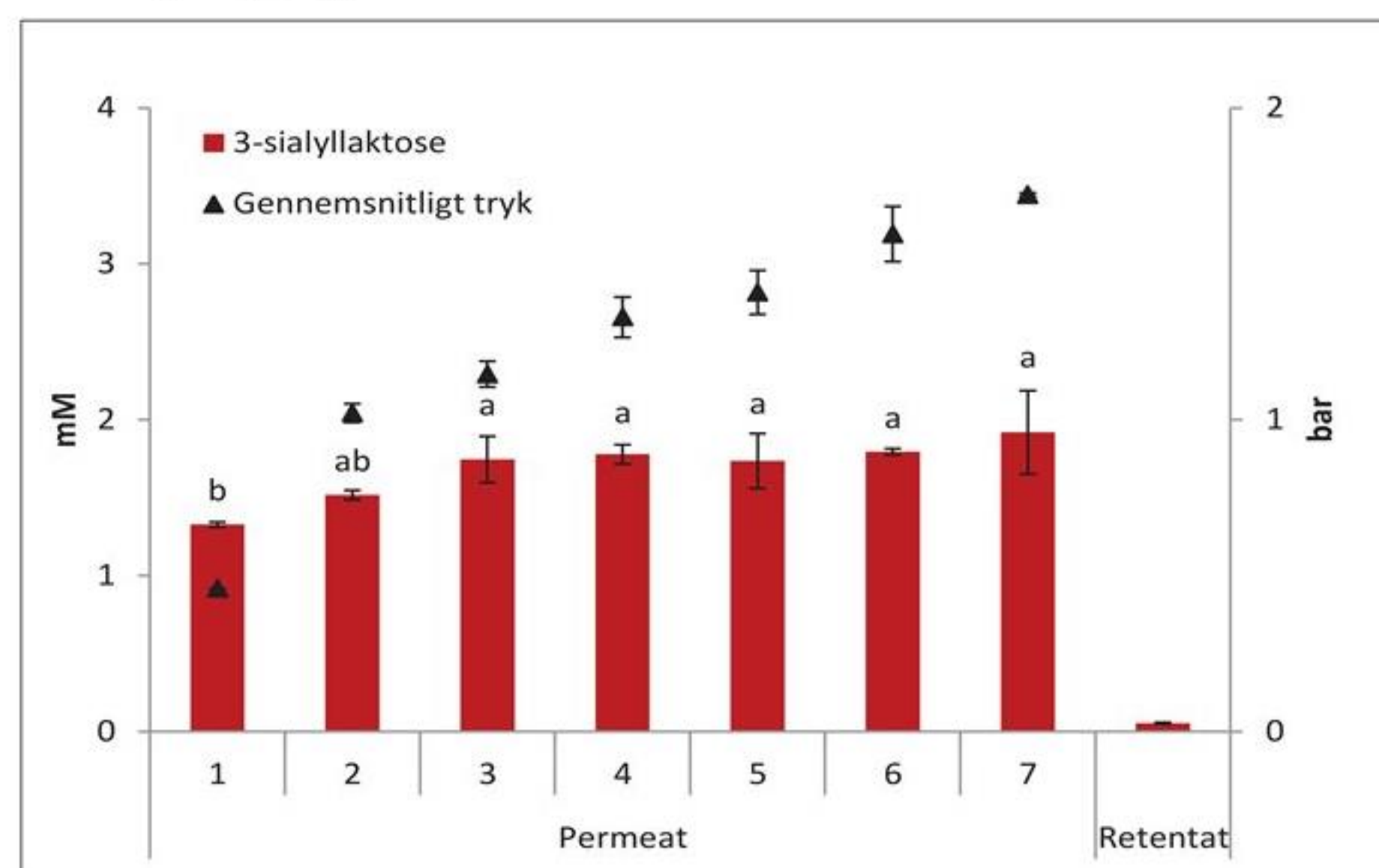
Tabel 1. Biokatalytisk produktivitet (mg 3'-sialyllaktose/mg enzym) og molært udbytte baseret på bundet sialinsyre i CGMP (donor) opnået med 1) fri Tr6 i batchreaktor, 2) Tr6 immobiliseret på magnetiske nanopartikler (MNP), og 3) fri Tr6 i membranreaktor. For de sidste to er antal på hinanden følgende reaktioner med samme enzym angivet. Bogstaverne a-g angiver statistisk signifikans mellem niveauerne.

Fordi CGMP blev tilbageholdt i membranreaktoren, steg niveauet af fri sialinsyre lineært over reaktionens forløb, og ophobning af glykoproteinet på membranen gjorde det nødvendigt at bruge et gradvist højere tryk for at opretholde et jævnt flux (figur 4) [6]. Med et andet set-up – f.eks. en *cross-flow*-membran – og optimering af membranprocessen kan *fouling* forårsaget af CGMP i højere grad undgås [9]. Desuden kan acceptorsubstratet laktose genanvendes vha. nanofiltrering [10]. Således ser det lovende ud i forhold til en opskalering af en kontinuert membranproces til enzymatisk produktion af 3'-sialyllaktose fra laktose og CGMP.

Udbytte og perspektiv

Det molære udbytte baseret på sialyldonoren CGMP var 37%

ved syv timers reaktion i membranreaktoren (tabel 1) [6], men dette svarer reelt til et molært udbytte på 74%, idet kun halvdelen af den bundne sialinsyre i CGMP er tilgængelig for enzymet (transsialidasen fra *T. cruzi* kan kun bruge α -2,3-bundet sialinsyre [7,8]).



Figur 4. Koncentrationer af produktet 3'-sialyllaktose i permeatet fra syv på hinanden følgende reaktioner på en time i en membranreaktor. Enzymet og sialyldonoren CGMP blev tilbageholdt af membranen, og der blev tilsat frisk substrat hver time. Det gennemsnitlige transmembrane tryk er angivet for hver af de syv reaktioner (højre akse). Bogstaverne a og b angiver statistisk signifikans mellem 3'-sialyllaktoseniveauerne i hver reaktion. Koncentrationen af 3'-sialyllaktose i retentatet efter de syv timers reaktion er også angivet. Modificeret fra [6].

Udover laktose kan de designede sialidasemutanter også katalysere transsialylering af en række oligosakkarider, som også er relevante som HMO og HMO-lignende molekyler [4,5]. Dermed er vi godt på vej mod en forbedring af den nuværende modermælkserstatning. Samtidigt fungerer studierne som et eksempel på, hvor lidt der skal til for at få et hydrolytisk enzym til at katalysere den "baglæns" syntesereaktion.

E-mail:

Birgitte Zeuner: biz@kt.dtu.dk

Referencer

1. Bode, L. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* **2012**, 22, 1147-1162.
2. Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, German JB, Freeman SL, Killeen K, Grimm R, Lebrilla CB. A strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem* **2006**, 54, 7471-7480.
3. Paris G, Ratier L, Amaya MF, Nguyen T, Alzari PM, Frasch ACC. A sialidase mutant displaying *trans*-sialidase activity. *J Mol Biol* **2005**, 345, 923-934.
4. Jers C, Michalak M, Larsen DM, Kepp KP, Li H, Guo Y, Kirpekar F, Meyer AS, Mikkelsen JD. Rational design of a new *Trypanosoma rangeli* trans-sialidase for efficient sialylation of glycans. *PLOS One* **2014**, 9, e83902.
5. Michalak M, Larsen DM, Jers C, Almeida JRM, Willer M, Li H, Kirpekar F, Kjærulff L, Gottfredsen CH, Nordvang RT, Meyer AS, Mikkelsen JD. Biocatalytic production of 3'-sialyllactose by use of a modified sialidase with superior *trans*-sialidase activity. *Process Biochem* **2014**, 49, 265-270.
6. Zeuner B, Luo J, Nyffenegger C, Aumala V, Mikkelsen, JD, Meyer AS. Optimizing the biocatalytic productivity of an engineered sialidase from *Trypanosoma rangeli* for 3'-sialyllactose production. *Enzyme Microb Technol* **2014**, 55, 85-93.
7. Saito T, Itoh T. Variations and distributions of *o*-glycosidally linked sugar chains in bovine κ -casein. *J Dairy Sci* **1992**, 75, 1768-1774.
8. Vandekerckhove F, Schenkman S, Pontes de Carvalho L, Tomlinson S, Kiso M, Yoshida M, Hasegawa A, Nussenzweig V. Substrate specificity of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology* **1992**, 2, 541-548.
9. Luo J, Morthensen ST, Meyer AS, Pinelo M. Filtration behavior of casein glycomacropptide (CGMP) in an enzymatic membrane reactor: fouling control by membrane selection and threshold flux operation. *J Membr Sci* **2014**, 469, 127-139.
10. Luo J, Nordvang RT, Morthensen ST, Zeuner B, Meyer AS, Mikkelsen JD, Pinelo M. An integrated membrane system for the biocatalytic production of 3'-sialyllactose from dairy by-products. *Bioresour Technol* **2014**, 166, 9-16.