

**Oligosacàridos de la leche materna, un reto para las leches de fórmula:  
Ingeniería de proteínas de la enzima lacto-N-biosidasa de Bifidobacterium  
bifidum para la síntesis de lacto-N-tetraosa**

**Mireia Castejón Vilatersana**

<http://hdl.handle.net/10803/673531>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

## TESIS DOCTORAL

Título	Oligosacáridos de la leche materna, un reto para las leches de fórmula: Ingeniería de proteínas de la enzima lacto-N-biosidasa de <i>Bifidobacterium bifidum</i> para la síntesis de lacto-N-tetraosa.
Realizada por	Mireia Castejón Vilatersana
en el Centro	IQS School of Engineering
y en el Departamento	Bioingeniería
Dirigida por	Dra. Magda Fajjes y Dr. Antoni Planas



Con el soporte de los programas nacionales BFU2016-77427-C2-1-R y PID2019-104350RB-100 del  
Ministerio de Economía y Empresa de España.





Als meus pares, avis i àvies



*Always look on the bright side of life*

Eric Idle, Monty Python



## Agradecimientos

---



## Agradecimientos

Finalment ha arribat el famós moment d'escriure els agraïments! Amb aquestes línies tanco una de les millors etapes que he viscut (de moment, no dramatitzem), en la qual a part de créixer com a científica i persona, he tingut el plaer de tenir els millors companys i companyes de viatge! Així doncs, ha arribat el moment de donar-vos les gràcies per tot!

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies als meus directors de la tesi, la Dra. Magda Faijes i el Dr. Antoni Planas per tot. Gràcies per la vostra contribució en el projecte, per els esforços dedicats, les hores invertides, les idees aportades i per no deixar-me conformar mai, gràcies per fer-me créixer científicament. Toni, m'agradaria agrair-te haver-me deixat formar part del grup de Bioquímica on he tingut la sort de conèixer a grans persones i per ensenyar-me què és la recerca, per sempre anar més enllà. A tu Magda m'agradaria donar-te les gràcies per preocupar-te sempre per mi, per com estic, per com em va tot, gràcies per la teva empatia. Gràcies per la teva paciència, ja que de primera mà has conegut la meva tossuderia, tot i que sempre m'acabes convencent!

Al Dr. Xevi Biarnés, gràcies per la teva implicació en el projecte i les teves aportacions. Ha estat un plaer treballar amb tu, encara quan em proposaves més mutants (tenia ganes de plorar). Gràcies per tots els moments viscuts en els congressos, per ser un més, i sobretot per cridar als 4 vents el meu amor secret pel Dr. X.

I would like to thank Dr. Fauré for allowing me to stay at TBI, thanks for this opportunity! Thank you for all your opinions and advises, but specially for your attention and dedication. During these months I felt like home, thank you! I would also like to thank Awilda, Jao and Thomas thanks for your hospitality and for being so friendly and funny! Awilda muchas gracias por acogerme, por ser mi salvadora cuando me dejaba las llaves de casa y por enseñarme Toulouse!

A todos los miembros del tribunal, gracias aceptar formar parte de éste y por el tiempo invertido en la lectura y evaluación de esta tesis. Espero que la lectura haya sido lo más amena posible.

A tots els membres de Bioquímica només puc donar-vos les gràcies, Pau i Marc moltes gràcies per totes les vostres contribucions, consells i ajuda. Patri gràcies per interessar-te i preocupar-te sempre per mi, per ser la companyera de cotilleos, però sobretot gràcies per fer que les innumerables hores compartides d'auxiliaries hagin sigut més distretes! A tu Teresa, gràcies per ser una més de nosaltres, per escoltar-nos, valorar-nos, per cuidar-nos i mimar-nos com ningú més!



## Agradecimientos

---

I ara ha arribat el vostre moment, se que us estàveu buscant des de fa estona...! Amb vosaltres he passat més hores que amb ningú durant aquets any. Hem compartit de tot, penes, alegries, però sobretot riures! Gràcies per deixar-me formar part de la vostra vida però sobretot gràcies per formar part de la meva, ja que després d'aquets anys se que m'emporto amics i amigues per tota la vida! Aitor, llegaste y tuve un compi de proyecto gracias por formar parte de él. Gracias por toda tu ayuda y paciencia...mira que te he molestado veces. Álvaro, mi vecino de mesa, gracias por tolerar siempre mi desorden y al final sucumbir a la fusión de las mesas. Por ayudarme siempre con los dramas del HPLC, y por las charlas en el rinconcito soleado. ¡Ahora que ya no estoy, recuerda subir la persiana que no estamos en una cueva! Bernat, gràcies per la teva alegria, energia i optimisme i per portar sempre el bon rotllo a sobre! I en especial gràcies per ajudar-me a portar els tappers ben nets cap a casa sempre! Marc, gràcies per la teva paciència i bàsicament per aguantar-me. Durant aquets anys mira que te burxat i te molestat eh.. però sempre reacciones igual amb un somriure. Gràcies per ser el meu company de tonteries, bogeries i riures. Ah! I gràcies per fer que Bioquímica estigui ple de fotos meves! Pascu, vam començar aquesta etapa junts i així l'acabem. Mira que son anys aguantant-nos eh, però tot i així sempre seràs el meu cari. Gràcies per tots els moments, els nostres romances fingits, cabrejos (tot s'ha de dir), rajades, desesperacions, però sobretot per fer-me riure com ho has fet! Laia la meva Pimpinela! Gràcies per ser com ets, bondat, alegria i un toc de bogeria, perquè amb tu fins i tot arreglar un HPLC es divertit! Però sobretot per totes les rialles i alegries que em viscut, sempre seràs la meva companya incondicional de karaoke. A tu Núria gràcies per tots els moments que hem compartit, i mira que son variopintos. Gràcies per deixar-me robar el material de la teva poiata (sempre amb alguna mala mirada, evidentment), per aguantar les meves bogeries, per entendre el meu dramatisme, per totes les converses i riures compartits gràcies a les quals d'aquí molts anys en trobarem coronant l'infern. En definitiva gràcies per deixar-me ser el teu paràsit durant aquets anys i espero que durant molts més! A tu Cris, gràcies per ser la persona més bonica que conec. Gràcies per preocupar-te sempre per nosaltres, per ajudar-nos, però sobretot per com ets. Tu ets tot amabilitat, alegria i dolçor, gràcies per deixar-nos disfrutar de la teva essència tots aquets anys! A tu Estela gràcies pel teu optimisme, pel teu riure, per l'alegria que desprens, per preocupar-te sempre per els altres. En definitiva gràcies per ser així! Almu, vas estar poquet però vas calar fort! Gràcies per la teva simpatia, alegria i bogeries! Només tu podies aconseguir que venir a treballar un 16 d'Agost no fos una tortura!

També m'agradaria donar les gràcies a tots els estudiants que han format part del projecte durant aquets anys: Xavi, Pablo, Diego, Mònica, Fernando i Helena. Moltes gràcies per tot l'esforç, dedicació i per tota la feina que heu aportat!

Amb el final de la tesi, també tanco l'etapa d'IQS (que mira que ha sigut llarga al final) d'on m'emporto amistats que espero que siguin per sempre. Nina, Clau i Maria gràcies per tots aquets anys d'amistat, per els viatges, sopar, riures i casaments!! Gràcies per formar part de la meva vida i per anar creixement

## Agradecimientos

---

i vivint noves etapes juntes! Laura i Balmorio!! Que dir-vos, sou diversió, bogeria i alegria en estat pur! Perquè amb vosaltres només hi ha bons moments! Nunu, marixoxi! Gràcies per totes les converses, riures, cotilleos i balls, se't troba a faltar! Coines, el meu hipster preferit!! Gràcies per el teu tutorial de PyMOL, el qual et confesso que ha estat el correu més consultat de la meva safata d'entrada. Però sobretot gràcies per totes les cerveses arreglant el món científic o no.

I ara toca agrair a les de sempre, Maria i Olga. Als 8 anys vaig aparèixer al Nostre Llar i fins ara, 23 anys més tard no ens em separat. Gràcies per ser-hi sempre, per ser la família que una escull, les hem passat de tots colors, hem compartit penes i alegries i amb els anys ens em fet fortes, independents i lluitadores. Gràcies per aquesta eterna amistat! Sergi, Gere i Laia, gràcies per tots els moments viscuts, pels somriures, converses i per fer les millors abraçades del món! Ah! I Gere t'agraeixo d'avançat la super portada que em faràs! Amaia gràcies per totes les converses sempre acompanyades d'una o varies cerveses, i gràcies per compartir les desesperacions de fer un doctorat! També m'agradaria agrair a la Mireia, la Judit, la Marta, la Clàudia i la Silvia tot el suport i implicació en la tesi. Gràcies per estar grillades, i gràcies per descobrir Toulouse amb mi!

I finalment a la meva família, als que i són i als que ens han deixat, perquè ells ho han fet possible. Mama, papa, iaia Rosalia, iaia Esperanza, avi Pere i avi Alfred gràcies per tot el vostre esforç, lluita i sacrifici, gran part d'aquesta tesi és mèrit vostre! Gràcies per el vostre suport incondicional, per cuidar-me, per permetre'm arribar on he arribat, per la vida que meu donat, per sentir-me sempre estimada, per la vostra paciència i sobretot per el vostre amor. També m'agradaria donar les gràcies a la Tata, el Jordi i la Isabel, gràcies per ser la meva família, per cuidar-me, preocupar-vos i ajudar-me sempre! I per acabar, al meu company de trajecte, la meva rata, el Pol. Gràcies per entrar a la meva vida i quedar-te. Gràcies per estimar-me com soc, amb els meus defectes (però també virtuts eh!), les meves bogeries i les meves complicacions. Gràcies per totes les aventures viscudes, i d'avançat les que vindran!

I a tu estimat lector, gràcies per arribar fins aquí. El contingut de les següents pàgines serà menys emotiu, parlarem d'enzims i altres termes estranys, així que si finalitzes la lectura aquí no t'ho tindre en compte! Als que continueu, moltes gràcies per el temps que i dedicareu, si més no, espero que la lectura sigui amena!



Índice

---



Índice

Índice .....	I
Resumen .....	IX
Resum .....	X
Summary .....	XI
Lista de publicaciones y comunicaciones .....	XV
Lista de Figuras .....	XIX
Lista de Tablas .....	XXV
Abreviaturas .....	XXIX
Organización de la tesis .....	XXXIII
<b>Capítulo 1: Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La leche materna, un alimento esencial .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Los oligosacáridos de la leche humana .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Estructura y composición .....	2
1.2.2 Biosíntesis de los HMOs .....	9
1.2.3 Metabolismo de los HMOs.....	11
<b>1.3 Actividades biológicas de los HMOs.....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Efecto prebiótico.....	13
1.3.2 Inhibición de patógenos .....	14
1.3.3 Moduladores de las células epiteliales .....	16
1.3.4 Inmuno-moduladores .....	16
1.3.5 Nutrientes para el desarrollo neuronal .....	17
<b>1.4 Producción de HMOs.....</b>	<b>18</b>
1.4.1 Síntesis química.....	19
1.4.2 Síntesis enzimática .....	19
1.4.2.1 Glicosiltransferasas (GTs) .....	19
1.4.2.2 GTs para la síntesis de LNT .....	20
1.4.2.3 GHs para la síntesis de LNT.....	30
1.4.3 Síntesis mediante ingeniería metabólica.....	31

1.4.3.1	Ingeniería metabólica para la síntesis de LNT .....	32
<b>1.5</b>	<b>Lacto-N-biosidasa.....</b>	<b>34</b>
1.5.1	La familia GH20 .....	35
1.5.2	Mecanismo catalítico de las GH20 .....	37
<b>1.6</b>	<b>Marco del proyecto.....</b>	<b>38</b>
	<b>Objetivos .....</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 2: Rediseño de los subsitios negativos de LnbB para la síntesis de LNT .... 45</b>		
<b>2.1</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>48</b>
<b>2.2</b>	<b>Selección de los nuevo mutantes de LnbB .....</b>	<b>50</b>
2.2.1	Residuos catalíticos .....	56
2.2.2	Plataforma hidrofóbica (Trp373, Trp394 y Trp465 de LnbB) .....	57
2.2.3	Tyr419 de LnbB .....	58
2.2.4	Tyr427 de LnbB .....	59
2.2.5	Asp467 de LnbB .....	59
2.2.6	Residuos del susbitio -2.....	60
<b>2.3</b>	<b>Clonaje, expresión y purificación de los mutantes seleccionados.....</b>	<b>63</b>
<b>2.4</b>	<b>Caracterización de los mutantes .....</b>	<b>65</b>
2.4.1	Caracterización de los mutantes simples .....	67
2.4.1.1	Análisis de la actividad hidrolítica .....	67
2.4.1.2	Caracterización de la actividad TG.....	71
2.4.2	Caracterización de los dobles mutantes.....	76
2.4.2.1	Caracterización de la actividad hidrolítica y TG de los mutantes dobles de LnbB ....	76
2.4.3	Exploración del residuo Trp394.....	79
2.4.4	Relación entre la actividad hidrolítica y de transglucosidación de los mutantes de LnbB . .....	83
<b>2.5</b>	<b>Caracterización cinética de los mejores biocatalizadores.....</b>	<b>88</b>
2.5.1	Determinación de la actividad específica de transglucosidación a distintas concentraciones de aceptor.....	88
2.5.2	Determinación de los parámetros cinéticos.....	91
<b>2.6</b>	<b>Caracterización del mutante W394F .....</b>	<b>93</b>
2.6.1	Influencia del pH en la reacción TG .....	93

2.6.2	Estudio de la regioselectividad del nuevo enlace formado por el mutante W394F de LnbB .....	95
<b>2.7</b>	<b>Conclusiones del capítulo.....</b>	<b>97</b>
<b>Capítulo 3: Exploración de los subsitios positivos de LnbB .....</b>		<b>99</b>
<b>3.1</b>	<b>Diseño <i>in silico</i> de los mutantes de los subsitios positivos .....</b>	<b>103</b>
3.1.1	BINDSCAN como herramienta in silico .....	103
<b>3.2</b>	<b>BINDSCAN para el rediseño de los subsitios positivos de LnbB .....</b>	<b>104</b>
<b>3.3</b>	<b>Estudio <i>in vitro</i> de los mutantes de los subsitios positivos .....</b>	<b>112</b>
3.3.1	Clonaje, expresión y purificación de los mutantes seleccionados .....	112
3.3.2	Determinación de la actividad hidrolítica .....	113
3.3.3	Determinación de la actividad TG .....	115
<b>3.4</b>	<b>Caracterización cinética de los mutantes derivados de LnbB Trp394Phe .....</b>	<b>118</b>
3.4.1	Determinación del parámetro $SA_{T200}/SA_H$ .....	118
3.4.2	Determinación de los parámetros cinéticos.....	120
<b>3.5</b>	<b>Conclusiones del capítulo.....</b>	<b>124</b>
<b>Capítulo 4: Exploración de la síntesis secuencial de LNT.....</b>		<b>127</b>
<b>4.1</b>	<b>Clonaje, expresión y purificación de las enzimas .....</b>	<b>131</b>
4.1.1	Clonaje, expresión y purificación de la glicosintasa de BgaC .....	131
4.1.2	Clonaje del mutante D320E_W394F, “glicosintasa” de LnbB .....	133
4.1.3	Síntesis de sustratos.....	133
4.1.4	Síntesis del dador $\alpha$ -GalF.....	133
4.1.4.1	Síntesis del aceptor GlcN-oxazolina .....	136
<b>4.2</b>	<b>Exploración de la reacción glicosintasa de BgaC para la obtención del compuesto LNB-oxazolina .....</b>	<b>139</b>
4.2.1	Estudio de la actividad hidrolítica de BgaC.....	140
4.2.2	Estudio de la actividad glicosintasa de BgaC .....	141
4.2.3	Estudio de la hidrólisis del aceptor GlcN-oxazolina .....	146
4.2.4	Exploración de la reacción glicosintasa a pD alcalinos.....	148
<b>4.3</b>	<b>Conclusiones del capítulo.....</b>	<b>149</b>



Conclusiones .....	151
<b>Capítulo 5: Materiales y métodos.....</b>	<b>155</b>
<b>5.1 Generación de mutantes .....</b>	<b>157</b>
5.1.1 Primera generación de mutantes de LnbB .....	157
5.1.2 Segunda generación de mutantes de LnbB .....	159
5.1.3 Mutantes de los subsitios positivos.....	160
5.1.4 Creación de la glicosintasa de BgaC .....	160
5.1.5 Creación de la “glicosintasa” de LnbB .....	162
<b>5.2 Expresión y purificación de proteínas .....</b>	<b>162</b>
5.2.1 Expresión de los diferentes mutantes de LnbB mediante medio de autoinducción...	162
5.2.2 Purificación mediante cromatografía de afinidad His SpinTrap de LnbB y sus mutantes.	163
5.2.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad HisTrap Column de LnbB y sus mutantes .....	164
5.2.4 Expresión de BgaC y su mutante Glu233Gly.....	165
5.2.5 Purificación de BgaC y su mutante Glu233Gly .....	166
5.2.6 Eliminación de imidazol mediante diálisis .....	167
<b>5.3 Caracterización enzimática de LnbB y sus mutantes.....</b>	<b>167</b>
5.3.1 Actividad hidrolítica de los diferentes constructos de LnbB.....	167
5.3.1.1 Determinación de la actividad específica .....	167
5.3.2 Estudio de la actividad de transglicosidación de los diferentes constructos de LnbB .....	169
5.3.2.1 Preparación de los patrones analíticos para HPLC-MS .....	169
5.3.2.2 Protocolo para la reacción de transglicosidación.....	170
5.3.2.3 Metodología HPLC-MS.....	170
5.3.3 Determinación de la ratio SA <sub>T</sub> /SA <sub>H</sub> .....	172
5.3.4 Determinación de los parámetros de Michaelis-Menten para la reacción de hidrólisis...	173
5.3.5 Determinación de los parámetros de Michaelis-Menten para la reacción TG.....	174
5.3.6 Determinación de la regioselectividad del tetrasacárido sintetizado por el mutante LnbB W394F mediante la enzima WT .....	175
<b>5.4 Caracterización enzimática de BgaC y su mutante glicosintasa E233G.....</b>	<b>175</b>
5.4.1 Síntesis de los sustratos $\alpha$ -GalF y 5 mM GlcN-oxazolina.....	175

5.4.1.1	Síntesis del dador $\alpha$ -GalF .....	176
5.4.1.2	Síntesis del aceptor GlcN-oxazolina .....	177
5.4.2	Actividad hidrolítica de BgaC wt y su mutante E233G .....	178
5.4.2.1	Determinación de la actividad específica.....	178
5.4.3	Actividad glicosintasa del mutante E233G de BgaC.....	179
5.4.3.1	Análisis de la reacción glicosintasa mediante TLC .....	179
5.4.3.2	Análisis de la reacción glicosintasa mediante 1H-RMN .....	180
5.4.4	Controles de la reacción glicosintasa .....	180
5.4.5	Estudio de la estabilidad del aceptor GlcN-oxazolina .....	180
5.4.6	Estudio de la reacción glicosintasa a pD 7.5 y 8 .....	181
<b>5.5</b>	<b>Protocolos bioquímicos y de biología molecular básicos .....</b>	<b>181</b>
5.5.1	Preparación células competentes .....	181
5.5.2	Transformación de células competentes por CaCl <sub>2</sub> .....	182
5.5.3	Transformación de células Stellar <sup>TM</sup> competent cells (ClonThec).....	182
5.5.4	Extracción de ADN plasmídico.....	183
5.5.5	Purificación de ADN .....	183
5.5.6	Cuantificación de ADN.....	183
5.5.7	Digestión de ADN: DpnI.....	183
5.5.8	Cuantificación de proteína .....	183
5.5.9	Medio Luria Bertani (LB) suplementado para autoinducción .....	184
<b>Bibliografía</b> .....	<b>187</b>	
<b>Anexos</b> .....	<b>199</b>	
Anexo 1: Rediseño de los subsitios negativos de LnbB para la síntesis de LNT.....	201	
Anexo 2: Exploración de los subsitios positivos de LnbB.....	201	
Anexo 3: Exploración de la síntesis secuencial de LNT .....	201	
Publicaciones .....	216	



## Resumen

---



## Resumen

Actualmente se tienen evidencias de los numerosos beneficios que los oligosacáridos de la leche materna (human milk oligosaccharides, HMOs) confieren a los recién nacidos, ya sea a nivel local o sistémico. La leche humana se considera única debido a la concentración, calidad y complejidad de sus HMOs. Es conocido que estas moléculas ejercen diversas funciones biológicas actuando como prebióticos, inmuno-moduladores, inhibidores de patógenos, entre otras. Hasta la fecha se han identificado más de 200 estructuras de HMOs diferentes, siendo imposible su obtención a partir de fuentes naturales. Debido a su elevada complejidad estructural la síntesis química a gran escala de estos carbohidratos sigue siendo un reto, requiriendo de numerosas etapas sintéticas. Por esto motivo, las leches de fórmula contienen principalmente HMOs de estructuras simples como 2'FL, DFL y 3'/6'-SL. La síntesis enzimática es una interesante alternativa sintética para la producción de estas moléculas, ya que, gracias a las enzimas, permite controlar la estero- y regioselectividad del oligosacárido formado. La leche humana presenta como HMO mayoritario el tetrasacárido lacto-N-tetraosa (LNT) y sus derivados fucosilados y/o sialilados. La enzima lacto-N-biosidasa de *B. bifidum* es la responsable de hidrolizar el tetrasacárido LNT en el metabolismo del recién nacido alimentado con leche materna.

Con el objetivo de producir el compuesto LNT, en esta tesis se ha llevado a cabo el rediseño de la enzima lacto-N-biosidasa de *B. bifidum* (LnbB) con el fin de obtener un biocatalizador eficiente para la producción de este tetrasacárido. Para ello, se han aplicado diferentes estrategias: i) rediseño racional basado en el estudio estructural de los subsitios negativos de la enzima LnbB, ii) rediseño de los subsitios positivos de LnbB a partir de herramientas computacionales y iii) síntesis secuencial del compuesto LNT.

La enzima LnbB pertenece a la familia GH20 y cataliza la hidrólisis de la molécula de LNT, dando lugar a los disacáridos lactosa y lacto-N-biosa. En esta tesis se han rediseñado los subsitios de la enzima LnbB empleando métodos de ingeniería de proteínas, para testar así su síntesis mediante la estrategia de transglicosidación por control cinético empleando dadores de glicosilo activados. Concretamente para el rediseño racional de los subsitios negativos de la enzima se han realizado estudios de conservación y estructurales, seleccionando y modificando aquellos aminoácidos involucrados en la unión y estabilización de la molécula dadora. Por otro lado, dado que la enzima no presenta subsitios definidos de unión al aceptor, para el rediseño de los subsitios positivos se ha empleado el software BINDSCAN desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica de IQS.

En esta tesis también se ha explorado la síntesis secuencial del compuesto LNT empleando la estrategia glicosintasa, combinando las enzimas  $\beta$ -galactosidasa *Bacillus circulans* (Bgac) E233G y LnbB (D320E\_W394F).

## Resum

Actualment es tenen clares evidències dels nombrosos beneficis que els oligosacàrids de la llet materna (human milk oligosaccharides, HMOs) proporcionen als nounats, ja sigui a nivell local o sistèmic. La llet humana es considera única degut a la concentració, qualitat i complexitat dels seus HMOs. Es coneix que aquestes molècules exerceixen diverses funcions biològiques actuant com a prebiòtics, immuno-moduladors, inhibidors de patògens, entre altres. A dia d'avui s'han identificat més de 200 estructures d'HMOs diferents, essent impossible la seva obtenció a partir de fonts naturals. Degut a la seva elevada complexitat estructural, la síntesi química a gran escala d'aquests carbohidrats segueix sent un repte, requerint de nombroses etapes sintètiques. Per aquest motiu, les llets de fórmula sol contenen principalment HMOs d'estructures simples com 2'FL, DFL y 3'/6'-SL. La síntesi enzimàtica es una interessant alternativa sintètica per la producció d'aquests compostos, ja que, gràcies als enzims, permet controlar la estereo- y regioselectivitat de l'oligosacàrid format. La llet humana presenta com a HMO majoritari el tetrasacàrid lacto-N-tetraosa (LNT) i els seus derivats fucosilats i/o sialilats. L'enzim lacto-N-biosidasa de *B.bifidum* es el responsable d'hidrolitzar el tetrasacàrid LNT en el metabolisme dels infants alimentats amb llet materna.

Amb l'objectiu de produir el compost LNT, en aquesta tesi s'ha realitzat el redisseny de l'enzim lacto-N-biosidasa de *B.bifidum* (LnbB) amb la finalitat d'obtenir un biocatalitzador eficient per a la producció d'aquest compost. Per aquest fita, s'han aplicat diferents estratègies: i) redisseny racional basat en l'estudi estructural dels subsetis negatius de l'enzim LnbB, ii) redisseny dels subsetis positius de LnbB emprant eines computacionals i iii) síntesis seqüencial de la molècula LNT.

L'enzim LnbB pertany a la família GH20 i catalitza la hidròlisi de LNT generant els disacàrids lactosa i lacto-N-biosa. En aquesta tesi s'han redissenyat els subsetis de LnbB emprant mètodes d'enginyeria de proteïnes, per avaluar la síntesi del tetrasacàrid mitjançant la estratègia de transglicosidació per control cinètic utilitzant donadors glicosídics activats. Concretament pel redisseny racional dels subsetis negatius de la proteïna, s'han realitzat estudis de conservació i estructurals, seleccionant i modificant aquells aminoàcids involucrats en la unió i estabilització de la molècula donadora. D'altra banda, degut a que l'enzim no presenta subsetis definits d'unió per la molècula acceptora, s'ha utilitzat el software BINDSCAN desenvolupat en el Laboratori de Bioquímica d'IQS per al redisseny dels subsetis positius.

En aquesta tesi també s'ha explorat la síntesis seqüencial del compost LNT basada en la estratègia glicosintasa, combinant els enzims  $\beta$ -galactosidasa *Bacillus circulans* (Bgac) E233G i LnbB (D320E\_W394F).

## Summary

Nowadays there are evidences of the potentials health benefits that human milk oligosaccharides (HMOs) confer to the babies at local and systemic levels. Human milk is considered as a gold standard for the infant nutrition due to the concentration, quality, and complexity of their HMOs. Are known that these compounds play essential biological functions acting as a prebiotics, inmuno-modulators, pathogens inhibitors, such others. To date, more than 200 HMOs structures have been identified, being their obtention from natural resources impossible. Due to their structural complexity, the large-scale chemical synthesis of these carbohydrates remains a challenge. For this reason, formula milks only contain HMOs with simple structures such as 2'FL, DFL y 3'/6'-SL. Enzymatic synthesis is an alternative synthetic tool to synthetize HMOs, due to the stere- and regioselectivity action of enzymes. Lacto-N-tetraose (LNT) and their sialylated and fucosylated derivatives are the most abundant HMOs in human milk. Lacto-N-biosidase from *B.bifidum* is responsible for the hydrolysis of this compound in the metabolism of breast fed-babies.

With the aim to synthesize LNT, in this thesis the enzyme lacto-N-biosidase from *B.bifidum* (LnbB) has been redesigned in order to generate an efficient biocatalyst able to synthetize the desired tetrasaccharide. For this, different strategies have been applied: i) rational redesign based on structural studies of the negative subsites of LnbB, ii) redesign of the positive subsites of LnbB using computational tools and iii) sequential synthesis of LNT.

LnbB belongs to GH20 family and catalyses the hydrolysis of LNT compound giving the disaccharides lactose and lacto-N-biose. In this thesis the subsites of LnbB have been redesign using protein engineering methods, to test its synthesis by kinetically controlled transglycosylation using activated glycosyl donors. For the rational redesign of the negative subsites of LnbB, conservation and structural studies have been carried out, selecting and modifying the residues involved in the binding and stabilization of the donor molecule. By contrast, the redesign of the positive subsites of the enzyme has been done using the software BINDSCAND developed in the IQS Biochemistry Laboratory since LnbB doesn't present defined acceptor binding subsites,

Also, in this thesis the sequential synthesis of LNT molecule has also been explored based on the glycosynthase strategy, combining the  $\beta$ -galactosidasa from *Bacillus circullas* (Bgac) E233G and LnbB (D320E\_W394F) enzymes.





## Lista de publicaciones y comunicaciones

---



## Lista de publicaciones y comunicaciones

### Publicaciones

1. Faijes, M.; Castejón-Vilatersana, M.; Val-Cid, C.; Planas, A. Enzymatic and Cell Factory Approaches to the Production of Human Milk Oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.014>.
2. Castejón-Vilatersana, M.; Faijes, M.; Planas, A. Transglycosylation Activity of Engineered Bifidobacterium Lacto-n-Biosidase Mutants at Donor Subsites for Lacto-n-Tetraose Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22 (6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22063230>.

### Comunicaciones orales

1. Protein engineering of Lacto-N-biose from B. Bifidum for HMOs production. 1a Jornada de Doctorands d'IQS (16-17 de Maig 2019, Barcelona)
2. Protein engineering of Lacto-N-biose from B. Bifidum for HMOs production. 1st Introductory Workshop on Biomedical Glycoscience, (3-5 June 2019, San Sebastián)
3. Oligosacàrids de la llet materna, un repte per les llets de fórmula. Enginyeria enzimàtica de la lacto-N-biosidasa de *Bifidobacterium* per bioacatàlisi. XI Trobada de Joves Investigadors dels Països Catalans (28-30 de gener de 2020, Vilanova i la Geltrú).

### Poster

1. Protein engineering of Lacto-N-biose from B. Bifidum for HMOs production. 19th European Carbohydrate Symposium Eurocarb (2-6 July 2017, Barcelona).
2. Protein engineering of Lacto-N-biose from B. Bifidum for HMOs production. 29th International Carbohydrate Symposium (14-20 July 2018, Lisbon)
3. Protein engineering of Lacto-N-biose from B. Bifidum for HMOs production. 1a Jornada de Doctorands d'IQS (16-17 de Maig 2019, Barcelona)
4. Protein engineering of Lacto-N-biose from B. Bifidum for HMOs production. 1st Introductory Workshop on Biomedical Glycoscience, (3-5 June 2019, San Sebastián)
5. Protein engineering of Lacto-N-biose from B. Bifidum for HMOs production. XX European Carbohydrate Symposium Eurocarb (1-6 July 2019, Leiden).

6. Oligosacàrids de la llet materna, un repte per les llets de fórmula. Enginyeria enzimàtica de la lacto-N-biosidasa de *Bifidobacterium* per bioocatàlisi. XI Trobada de Joves Investigadors dels Països Catalans (28-30 de gener de 2020, Vilanova i la Geltrú).

## Lista de Figuras

---



## Lista de Figuras

<b>Figura 1. 1.</b> Composición de la leche humana madura (Hennet <i>et al.</i> , 2014).....	1
<b>Figura 1. 2.</b> Esquema general de formación de HMOs.....	4
<b>Figura 1. 3.</b> Clasificación de los HMOs según grupos Lewis y secretores. ....	6
<b>Figura 1. 4.</b> Biosíntesis de HMOs neutros y fucosilados. ....	10
<b>Figura 1. 5.</b> Ruta metabólica de los HMOs en <i>B. bifidum</i> (intracelular) y <i>B. infantis</i> (extracelular). ....	12
<b>Figura 1. 6.</b> Mecanismo de inhibición de patógenos gracias a la acción de los HMOs.....	15
<b>Figura 1. 7.</b> Influencia de los HMOs en el proceso inflamatorio .....	17
<b>Figura 1. 8.</b> Síntesis preparativa de LNT propuesto en Chen <i>et al.</i> 2019. ....	21
<b>Figura 1. 9.</b> Mecanismos de acción de las GH. ....	23
<b>Figura 1. 10.</b> Reacciones de las GHs.....	24
<b>Figura 1. 12.</b> Esquema de las posibles reacciones catalizadas por las GHs con retención de la configuración en modo transglicosidación por control cinético mediante dadores glicosídicos activados. ....	25
<b>Figura 1. 13.</b> Estrategias glicosintasas de las GHs.....	26
<b>Figura 1. 14.</b> Mecanismo de las GHs con retención de la configuración. ....	27
<b>Figura 1. 15.</b> Nomenclatura en subsitios de las GHs. Figura extraída de Bissaro 2015 <sup>79</sup> . ....	28
<b>Figura 1. 16.</b> Diagrama energético de las GHs con mecanismo de doble desplazamiento para los estados de transición 1 y 2. ....	30
<b>Figura 1. 17</b> Reacción enzimática descrita en Murta 1999 <sup>86</sup> para la síntesis del compuesto LNT. ....	31
<b>Figura 1. 18.</b> Síntesis <i>in vivo</i> de LNT II y LNT propuesta por Baumgärtner <sup>92</sup> . ....	33
<b>Figura 1. 19.</b> Organización por dominios de las GH20. Figura extraída Val-Cid <i>et., al</i> 2015 <sup>100</sup> .....	36
<b>Figura 1. 20</b> Arquitectura ( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub> (TIM-barrel). ....	37
<b>Figura 1. 21.</b> Mecanismo catalítico asistido de LnbB.....	38
<b>Figura 2.1.</b> Síntesis del tetrasacárido LNT mediante la reacción TG de la enzima LnbB.....	47
<b>Figura 2. 2.</b> Organización estructural de las GH20 presentada en Val-Cid 2016 <sup>100,103</sup> . ....	51
<b>Figura 2.3.</b> Organización estructural propuesta para la enzima LnbB. Ésta presenta los dominios GH20b, GH20, $\alpha$ -hélix, lectin, CBM 32 y el dominio Ig like.....	51
<b>Figura 2.4.</b> Alineamiento de secuencia de las GH20, con topología estructural tipoA de los dominios GH20 y GH20b. ....	54
<b>Figura 2. 5.</b> Representación de la estructura cristalográfica de LnbB of <i>B. bifidum</i> en complejo con el inhibidor LNB-tiazolina (PDB: 4JAW).....	55
<b>Figura 2. 6.</b> Mapa de interacciones de los subsitios negativos de la enzima LnbB.....	56
<b>Figura 2.7.</b> Representación de las interacciones presentes entre la unidad de GlcNAc de LNB con los Trp373, Trp394 y Trp465 de LnbB. ....	58



<b>Figura 2.8.</b> Representación de las interacciones entre la unidad de GlcNAc de LNB con los aminoácidos Asp467, Tyr427 y Tyr427.....	59
<b>Figura 2. 9.</b> Representación de las interacciones presentes entre los aminoácidos localizados en el subsitio -2 con la Gal de LNB.....	61
<b>Figura 2. 10.</b> Dominio lectina de LnbB.....	62
<b>Figura 2. 11.</b> Mapa del constructo pEt24b(+) con el gen codificante para la proteína LnbB-FL-Cterm bajo el promotor T7.....	63
<b>Figura 2.12.</b> Gel SDS-PAGE 8% Acrilamida del mutante W394F.....	64
<b>Figura 2.13.</b> Reacción de hidrólisis catalizada por la enzima LnbB frente al sustrato LNB-pNP.....	66
<b>Figura 2.14.</b> Reacciones catalizadas por la enzima LnbB y sus variantes.....	66
<b>Figura 2. 15.</b> Actividad específica de hidrólisis de los mutantes de LnbB.....	69
<b>Figura 2. 16.</b> Evolución de los rendimientos de LNT obtenidos con los mutantes W394F, N259Q, H263R, H263A y Q190L.....	72
<b>Figura 2. 17.</b> Actividad específica de hidrólisis de los dobles mutantes de LnbB.....	77
<b>Figura 2. 18.</b> Evolución de la reacción TG para los mutantes dobles de LnbB.....	78
<b>Figura 2. 19.</b> Actividad específica de hidrólisis de los mutantes de la posición Trp394 de LnbB.....	81
<b>Figura 2. 20.</b> Evolución de la reacción TG de los mutantes del residuo Trp394 de LnbB.....	81
<b>Figura 2. 21.</b> Rendimientos de transglucosidación (%LNT) vs. actividad hidrolítica (H%) de los mutantes de LnbB.....	84
<b>Figura 2. 23.</b> Determinación de la actividad específica global de los mutantes de LnbB.....	89
<b>Figura 2. 24.</b> Reacciones de Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos de los mutantes de LnbB seleccionados.....	92
<b>Figura 2. 25.</b> Caracterización de la actividad TG para el W394F de LnbB.....	94
<b>Figura 2. 26.</b> Monitorización mediante HPLC-MS (EI-MS) de la reacción TG de la enzima LnbB W394F para el estudio de la regioselectividad del producto formado.....	96
<b>Figura 3. 1</b> Estrategia empleada para mejorar la actividad TG de las GH mediante la introducción de aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos en los subsitios aceptores. Figura adaptada de <sup>76</sup> .....	101
<b>Figura 3. 2.</b> Visualización de la proteína LnbB con el ligando LNB-tiazolina (PDB 4JAW).....	102
<b>Figura 3. 3.</b> Resumen de las tres etapas seguidas por el algoritmo BINDSCAN.....	103
<b>Figura 3. 4.</b> Visualización ejemplo de los resultados generados por BINDSCAN.....	104
<b>Figura 3. 5.</b> Conformación adquirida por el aceptor $\beta$ -lactosa tras realizar su análisis por Docking del centro activo de LnbB (POSBLAC-12).....	105
<b>Figura 3. 6.</b> Representación gráfica de los resultados obtenidos tras ejecutar BINDSCAN empleando como <i>input</i> POSBLAC-12. Concretamente se muestra la zona del gráfico donde aparecen los mutantes más destacados.....	106
<b>Figura 3. 7.</b> Residuos <i>hot spots</i> identificados por BINDSCAN (Asp467, Ile324, Val426, Gln416, Asp467 y Gly396).....	107

<b>Figura 3. 8.</b> Mapa estructural de la proteína LnbB y sus interacciones con los sustratos LNB-tiazolina (negro) y lactosa (rojo).....	107
<b>Figura 3.9.</b> Mutantes de LnbB Ile324Trp y Val426Trp en complejo con los sustratos LNB-tiazolina y lactosa.....	108
<b>Figura 3. 10.</b> Mapa estructural de la proteína LnbB y las nuevas interacciones creadas entre los Trp324 y Trp426 y la lactosa (rojo).....	109
<b>Figura 3. 11.</b> Mutante Ile324Trp_Val426Trp de LnbB en complejo con LNB-tiazolina (negro) y lactosa (naranja)..	110
<b>Figura 3. 12.</b> Visualización mediante PyMOL del complejo POSLNB-1 (gris) y la estructura PDB 4JAW original (negro).....	110
<b>Figura 3. 13.</b> Conformaciones adoptadas por la molécula $\beta$ -lactosa en la estructura POSBLAC-12 (naranja) y en POSBLAC1-12.2 (lila).....	111
<b>Figura 3.14.</b> Actividad específica de hidrólisis para los mutantes de los subsitios positivos ( $S_{AH}$ ).....	113
<b>Figura 3.15.</b> Evolución de los rendimientos de LNT obtenidos en las reacciones TG de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB.....	115
<b>Figura 3. 16.</b> Ventana TG de los mutantes de los subsitios positivos.....	117
<b>Figura 3. 17.</b> Determinación de la actividad específica global enzimática frente diferentes concentraciones de lactosa.....	119
<b>Figura 3. 18.</b> Reacciones de Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos de los mutantes de los dadores positivos de LnbB para su reacción de hidrólisis y TG.....	121
<b>Figura 3. 19</b> Esquema donde se ejemplifican 3 posibles modos de unión de la lactosa (representada con redonda amarilla y azul) en la cavidad aceptora.....	123
<b>Figura 3. 20.</b> Ejemplo de como las mutaciones introducidas en la cavidad aceptora pueden originar que la lactosa se una incorrectamente dificultando así la reacción TG.....	124
<b>Figura 4. 1.</b> Reacción en cascada de las enzimas BgaC E233G y LnbB D320E_W394F para la síntesis de LNT empleando como sustratos $\alpha$ -GalF, GlcN-oxazolina y lactosa.....	129
<b>Figura 4. 2.</b> Mapa del constructo pEt29a_BgaC con el gen codificante para la proteína BgaC-Cterm bajo el promotor T7.....	131
<b>Figura 4. 3.</b> Gel SDS-PAGE 12% Acrilamida (12% acrylamide Stain-Free™ precast gel) de la enzima BgaC WT.....	132
<b>Figura 4. 4.</b> Síntesis del compuesto fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosilo partiendo del reactivo 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranososa empleando HF/piridina (70:30) como agente de fluoración.....	134
<b>Figura 4. 5.</b> A) Espectro COSY del compuesto fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosilo. B) Espectro HSQC del compuesto fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosil.....	135
<b>Figura 4.6.</b> Mecanismo de acción propuesto para la reacción de desacetilación mediada por MeOH y $NH_3$ , adaptado de Meier y colaboradores <sup>128</sup> .....	135

<b>Figura 4. 7.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN obtenido para el producto α-GalF. ....	136
<b>Figura 4. 8.</b> Mecanismo de reacción para la formación de azúcares oxazolina descrito en <sup>129,130</sup> .....	137
<b>Figura 4. 9.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del producto GlcN-oxazolina. ....	138
<b>Figura 4.10.</b> A) Espectro COSY del compuesto GlcN-oxazolina. B) Espectro HSQC del compuesto fluoruro GlcN-oxazolina. ....	138
<b>Figura 4. 11.</b> Reacción de hidrólisis catalizada por la enzima BgaC, empleando como sustrato Galβ-pNP. ....	139
<b>Figura 4. 12.</b> Reacciones glicosintasa catalizadas por la enzima BgaC E233G exploradas en este trabajo. En éstas se testará la reacción glicosintasa empleando α-GalF como dador frente a los sustratos A) GlcNAcα-pNP, B) GlcNAcβ-pNP y C) GlcN-oxazolina (configuración α).....	140
<b>Figura 4. 14.</b> Determinación de la actividad específica de hidrólisis de las enzimas BgaC WT y BgaC E233G.....	141
<b>Figura 4. 15.</b> Evolución de las reacciones glicosintasa de la enzima BgaC E233G, empleando como dador α-GalF frente a los aceptores GlcNAcβ-pNP, GlcNAcα-pNP. ....	142
<b>Figura 4. 16.</b> Reacción glicosintasa de la enzima BgaC E233G, empleando como dador α-GalF frente a los aceptores GlcNAcβ-pNP, GlcNAcα-pNP y GlcN-oxazolina tras 29 horas de reacción. ....	143
<b>Figura 4. 17.</b> Zoom del espectro de <sup>1</sup> H-RMN solapado de las reacciones enzimáticas realizadas a una concentración de aceptor y dador de 5 mM. ....	144
<b>Figura 4. 18.</b> Estudio de GlcNAc como aceptor: espectro solapado de la reacción 5 mM α-GalF y 5 mM GlcNAc.....	145
<b>Figura 4. 19.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la reacción de autocondensación del sustrato de α-GalF.....	146
<b>Figura 4. 20.</b> Mecanismo de hidrólisis del grupo oxazolina en condiciones ácidas. ....	146
<b>Figura 4. 21.</b> A) Monitorización de la hidrólisis de GlcN-oxazolina (16 mM) a diferentes pD de reacción en ausencia de enzima. B) Representación de la velocidad de hidrólisis inicial (calculada durante las 3 primeras horas de reacción) vs los diferentes pD de estudio. ....	147
<b>Figura 4. 22.</b> Monitorización mediante H-RMN de la hidrólisis del sustrato GlcN-oxazolina a diferentes pD y en presencia y ausencia de BgaC E233G. ....	147
<b>Figura 4. 23.</b> Espectro de la reacción de glicosintasa a pDs 7.5 y 8.....	148
<b>Figura 5. 1.</b> Protocolo seguido en la purificación de proteínas empleando las columnas His SpinTrapTM (GE Helthcare).....	163

## Lista de Tablas

---



## Lista de Tablas

<b>Tabla 1. 1.</b> Estructuras centrales de los HMOs. ....	3
<b>Tabla 1. 2.</b> Lista de abreviaturas y estructuras de los HMOs más relevantes (Faijes <i>et al.</i> , 2019.).....	4
<b>Tabla 1. 3.</b> Concentraciones de HMOs ácidos en la leche humana.....	8
<b>Tabla 1. 4.</b> Concentraciones de HMOs neutros presentes en la leche humana (Faijes <i>et al.</i> , 2019). ....	8
<b>Tabla 1. 5.</b> Concentraciones de diferentes oligosacáridos en leches de mamíferos. ....	9
<b>Tabla 2.1.</b> Caracterización de la actividad hidrolítica y la actividad TG/glicosintasa de los mutantes de LnbB relajados en (Val-Cid 2016) <sup>103</sup> , empleando como dadores LNB-pNP (estrategia TG) y LNB-oxazolina (estrategia glicosintasa).....	49
<b>Tabla 2.2</b> Recopilación de las variantes propuestas para LnbB. En la tabla se indicia el residuo, su localización y las mutaciones propuestas. ....	62
<b>Tabla 2. 3</b> Actividad hidrolítica específica de los mutantes de LnbB frente a LNB-pNP. ....	69
<b>Tabla 2.4.</b> Rendimientos de LNT obtenidos en las reacciones de transglicosidación de los mutantes de LnbB. ....	72
<b>Tabla 2.5.</b> Presentación de los dobles mutantes de LnbB propuestos. En la tabla se indica el residuo y su localización.....	76
<b>Tabla 2.6.</b> Tabla resumen de la actividad hidrolítica sobre LNB-pNP y de la actividad TG en términos de rendimientos de síntesis de LNT%. ....	79
<b>Tabla 2.7.</b> Resumen de la actividad hidrolítica sobre LNB-pNP y de la actividad TG en términos de rendimientos de síntesis de LNT%. ....	82
<b>Tabla 2. 8.</b> Actividades específicas ( $SA_{T200}$ y $SA_H$ ) y determinación de la ratio aparente entre éstas de los mutantes seleccionados.....	90
<b>Tabla 2. 9.</b> Parámetros cinéticos de los mutantes de LnbB para las reacciones de hidrólisis y en modo TG.....	91
<b>Tabla 2.10.</b> Rendimientos de TG obtenidos con el mutante W394F de LnbB a diferentes pH de reacción. ....	94
<b>Tabla 3. 1.</b> Mutantes de LnbB con menores valores de $\Delta G$ calculados. Valores obtenidos con el algoritmo BINDSCAN (Vega 2019, comunicación personal).....	106
<b>Tabla 3. 2.</b> Actividad hidrolítica de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB frente a LNB-pNP. ....	114
<b>Tabla 3. 3.</b> Actividad TG de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB expresada en rendimientos de síntesis de LNT. También se indica la actividad hidrolítica residual de los mutantes respecto a la enzima nativa (%H) y el intervalo de tiempo donde se obtienen las mayores concentraciones de LNT. ....	116
<b>Tabla 3. 4.</b> Actividades específicas ( $SA_{T200}$ y $SA_H$ ) y determinación de la ratio aparente entre éstas de los mutantes seleccionados (Ap. T/H ratio). ....	119

<b>Tabla 3. 5.</b> Parámetros cinéticos de los mutunes de LnbB para las reacciones de hidrólisis y TG. ....	121
<b>Tabla 4. 1.</b> Actividad hidrolítica específica de BgaC WT y su mutante glicosintasa (E233G) frente al sustrato Galβ-pNP.....	141
<b>Tabla 5. 1.</b> Cebadores empleados para la obtención de la primera generación de mutantes de LnbB. En ésta se indica la mutación y la secuencia correspondiente al cebador sense y antisense.....	157
<b>Tabla 5. 2.</b> Programa de PCR empleado para mutagénesis dirigida mediante PCR (QC-PCR) para la obtención de los mutantes de LnbB. ....	159
<b>Tabla 5. 3.</b> Cebadores empleados para la obtención de la segunda generación de mutantes de LnbB. En ésta se indica la mutación, el ADN molde empleado y la secuencia correspondiente al cebador sense y antisense. ....	159
<b>Tabla 5. 4.</b> Cebadores empleados para la obtención de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB. En ésta se indica la secuencia correspondiente al cebador sense y antisense empleada para cada una de las mutaciones. ....	160
<b>Tabla 5. 5.</b> Cebadores empleados para la obtención de la glicosintasa BgaC Glu233Gly. En ésta se indica la mutación y la secuencia correspondiente al cebador sense y antisense. ....	161
<b>Tabla 5. 6.</b> Programa de PCR empleado para mutagénesis dirigida mediante PCR (QC-PCR) para la obtención del mutante Glu233Gly de BgaC.....	161
<b>Tabla 5. 7.</b> Cebadores empleados para la obtención de la glicosintasa LnbB Asp320Glu_Trp394Phe. En ésta se indica la mutación y la secuencia correspondiente al cebador sense y antisense. ....	162
<b>Tabla 5. 8.</b> Concentraciones de LNT, LNB-pNP y LNB de los distintos patrones analizados por HPLM-CS. ....	169
<b>Tabla 5. 9</b> Masas seguidas en cada uno de los canales empleados del HPLC-MS .....	171
<b>Tabla 5. 10.</b> Soluciones empleadas en el método de autoinducción de proteínas. En ella se indican las soluciones, los compuestos que la conforman, la concentración stock empleada y la concentración final en cultivo. ....	184
<b>Tabla 5. 11.</b> Soluciones para la preparación de un cultivo por autoinducción de 30mL. ....	185

## Abreviaturas

---





## Abreviaturas

2'FL	2-fucosilactosa
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
CAZy	Carbohydrate Active enZymes
CBM	Carbohydrate-Binding Module (Dominio de unión a carbohidratos)
ESI	Electro Spray Ionization (Ionización por electroesprai)
ET	Estado de transición
FL	Full length
Fuc	Fucosa
FUT	Fucosiltransferasa
Gal	Galactosa
GH	Glicosil Hidrolasas o Glicosidasas
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GNB	Galacto-N-biosa
GRAS	Generally Recognized As Safe
GT	Glicosiltransferasas
H	Hidrólisis
HMOs	Human milk oligosaccharides
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LA	$\alpha$ -lactalbumina
Lac	Lactosa
lacA	gen codificante para la enzima tiogalactósido transferasa
LacNac	N-acetillactosamina
lacY	gen codificante para la enzima galactósido permeasa
lacZ	gen codificante para la enzima $\beta$ -galactosidasa
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Le	Lewis
LNB	Lacto-N-biosa
LnB	Lacto-N-biosidasa
LNB-pNP	Lacto-N-biosa pNP

## Abreviaturas

---

LnbB	Lacto-N-biosidasa de <i>B. bifidum</i>
LNFP I	Lacto-N-fucopentaosa I
LNnT	Lacto-N-neotetraosa
LNT	Lacto-N-tetraosa
LS	complejo Lactosa sintetasa
MALDI-FTICR MS	matrix-assisted laser desorption ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
MS	Espectroscopia de masas
GlcN-oxazolina	GlcNAc-oxazolinas
Neu5Ac	Ácido siálico
Neu5Gg	Acido N-glicolilneuramínico
oNP	2-Nitrofenol
OPME	Reacciones Multi-enzimáticas one-pot
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulforil
pNP	4-nitrofenol
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Actividad Específica
SAH	Actividad Específica de Hidrólisis
SAT	Actividad Específica de Transglucosidación
SDM	mutagénesis dirigida
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato)
Se	Secretor
TG	Transglucosidación
TLR	Receptores tipo Toll
UDP	Uridina difosfato
vcol	Volumen de columna
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
Vo	Velocidad inicial
wt	Wild type (enzima salvaje)

## Organización de la tesis

---



## Organización de la tesis

En la introducción (**capítulo 1**) se presentan conceptos importantes para la realización y comprensión de esta tesis como los HMOs, GHs y GTs, familia GH20, etc. Parte de este capítulo se ve reflejado en la publicación:

Faijes, M.; Castejón-Vilatersana, M.; Val-Cid, C.; Planas, A. Enzymatic and Cell Factory Approaches to the Production of Human Milk Oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.014>.

En el **capítulo 2** se presenta la estrategia empleada para el rediseño de los subsitios negativos de la enzima LnbB basada en un rediseño racional. Tras realizar el estudio estructural de la proteína LnbB en complejo con el inhibidor LNB-tiazolina, se proponen y generan diversos mutantes y se caracteriza su actividad hidrolítica y transglicosídica. En este capítulo también se presentan los parámetros cinéticos de los mejores biocatalizadores, incluyendo también la caracterización detallada del biocatalizador más eficiente en la síntesis de LNT hallado en esta tesis. Los resultados presentados en este capítulo se recogen en el artículo publicado:

Castejón-Vilatersana, M.; Faijes, M.; Planas, A. Transglycosylation Activity of Engineered Bifidobacterium Lacto-n-Biosidase Mutants at Donor Subsites for Lacto-n-Tetraose Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22063230>.

En el **capítulo 3** se presenta el rediseño de los subsitios positivos de LnbB. En esta ocasión la selección de los mutantes de la enzima se ha realizado computacionalmente, gracias a la utilización del software BINDSCAN desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica de IQS. Elegidas las posiciones a mutar y combinadas con el mejor biocatalizador de los subsitios negativos, se obtienen 6 nuevos mutantes de los cuales se caracteriza sus actividades hidrolítica y transglicosídica. Asimismo, se determinan los parámetros cinéticos respecto el dador de la actividad transglicosidasa.

En el **capítulo 4** se presenta la exploración de la síntesis secuencial de LNT mediante la utilización de los biocatalizadores  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (BgaC) E233G y lacto-N-biosidasa de *B. bifidum* (LnbB) D320E\_W394F. Este capítulo se ha realizado en colaboración con el Dr. Fauré (Toulouse Biotechnology Institute (TBI)), generando así, la oportunidad de realizar una estancia de 2 meses en Toulouse bajo la supervisión del Dr Fauré.



## Capítulo 1 Introducción

---





## 1.1 La leche materna, un alimento esencial

La leche materna esta considerada un alimento esencial para el adecuado desarrollo y crecimiento de los infantes. Gracias a los numerosos beneficios que este alimento proporciona a los recién nacidos en sus primeros estadios de vida, se recomienda que éstos sean alimentados exclusivamente con leche materna durante sus primeros 6 meses de vida<sup>1</sup>.

La importancia de la leche materna viene dada por su compleja composición ya que, aparte de proporcionar todos los requerimientos nutricionales, contiene una alta diversidad de componentes bioactivos involucrados en la salud del infante. La composición de la leche humana es dinámica variando entre las diferentes etapas de la lactancia, madres, poblaciones e incluso a lo largo de un día<sup>2-5</sup>. Pero en términos generales, su composición se basa en macronutrientes (lactosa, ácidos grasos y proteínas;) y micronutrientes (nucleótidos, vitaminas y minerales). Todos estos compuestos serán absorbidos en el tracto gastrointestinal del infante proporcionando una completa nutrición postnatal. La leche humana contiene gran variedad de moléculas bioactivas (inmunoglobulinas, citoquinas, hormonas, factores de crecimiento y gran diversidad de glicanos) las cuáles no serán absorbidas en el tracto gastrointestinal del infante y por lo tanto no tendrán una función nutricional, sino que estarán involucradas en numerosos procesos biológicos<sup>2-4,6</sup>.

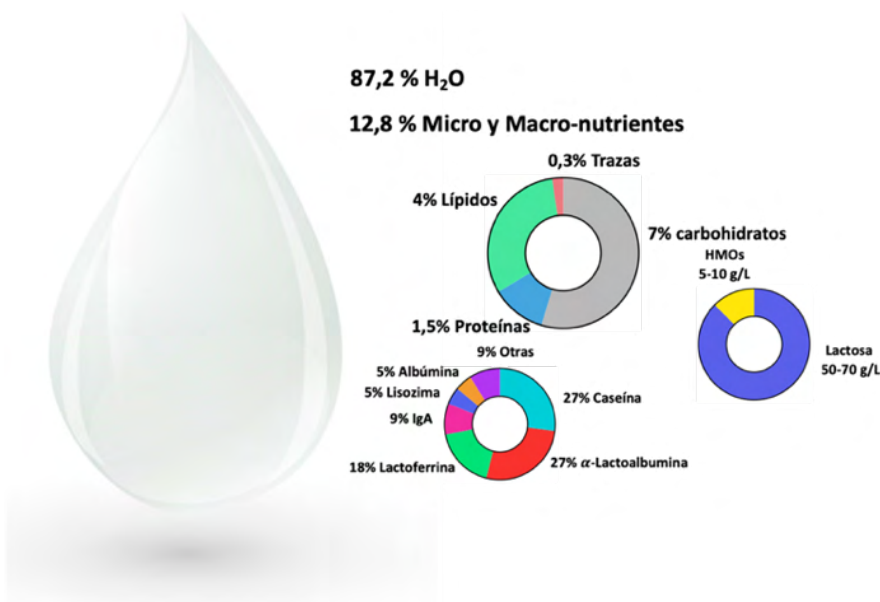


Figura 1. 1. Composición de la leche humana madura (Hennet *et al.*, 2014).

La leche humana alberga gran diversidad y cantidad de glicanos presentados oligosacáridos de la leche humana libres (human milk oligosaccharides, HMOs), o bien conjugados mediante enlaces O-glicosídicos con proteínas, lípidos o péptidos. Los HMOs constituyen aproximadamente el 1% del total de ésta, siendo el tercer producto sólido más abundante<sup>7,8</sup>. La cantidad y calidad de los HMOs en la leche será variable a lo largo de la lactancia ya que la función de este alimento también lo será. El calostro es la leche con mayor concentración de HMOs (20 g/L), conteniendo también altos niveles de moléculas inmunogénicas. Por otro lado esta leche contiene bajas concentraciones de lactosa, indicando que su función principal es inmunológica y trófica más que nutricional<sup>6</sup>. A diferencia de otros compuestos como los ácidos grasos la variabilidad de los HMOs no se debe a la dieta materna, sino que está regulada por mecanismos genéticos involucrados en los niveles de expresión de enzimas como las glicosiltransferasas<sup>9</sup>.

## 1.2 Los oligosacáridos de la leche humana

### 1.2.1 Estructura y composición

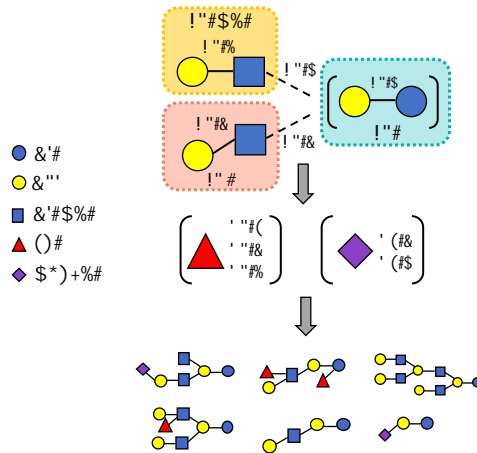
Los HMOs son una mezcla compleja de glicanos solubles, la composición de la cual presenta gran variabilidad entre individuos. Estos compuestos están formados por entre 3 y 22 monosacáridos, siendo sus estructuras base la glucosa (Glc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), fucosa (Fuc) y un ácido siálico (Neu5Ac) dando lugar a una gran inmensidad de estructuras posibles, de las cuales hoy en día, se han caracterizado 200<sup>10</sup>.

A pesar de existir una gran diversidad estructural, estos carbohidratos se caracterizan por presentar una unidad de lactosa en su extremo reductor. Ésta puede ser elongada por la adición del disacárido lacto-N-biosa (LNB, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc) generando el tetrasacárido lacto-N-tetraosa (LNT, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc), estructura central de los HMO tipo 1. Por otro lado, si la lactosa es elongada con el disacárido N-acetilactosamina (LacNAc, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) se obtendrá al tetrasacárido lacto-N-neotetraosa (LNnT, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc), unidad central de los HMO tipo 2. La adición de la molécula de LNB a la lactosa da como resultado la cadena final, por el contrario, si se une a LacNAc la cadena puede ser de nuevo elongada incorporando uno de los dos disacáridos mediante enlaces  $\beta$ 1,3 (para-) o  $\beta$ 1,6 (iso-) a. Aunque estos compuestos presentan gran variabilidad estructural, se clasifican en 13 grupos básicos en función de su cadena central (**Tabla 1. 1**).

**Tabla 1. 1.** Estructuras centrales de los HMOs.

Abreviatura	Nombre	Estructura
Lac No considerado HMO	Lactose	Galβ1,4Glc
LNT	Lacto-N-tetraose	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
LNnT	Lacto-N-neotetraose	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
LNH	Lacto-N-hexaose	Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,3GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4Glc
LNnH	Lacto-N-neohexaose	Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,4GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4Glc
pLNH	para-Lacto-N-hexaose	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
pLNnH	para-Lacto-N-neohexaose	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
LNO	Lacto-N-octaose	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,3GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4Glc
LNnO	Lacto-N-neooctaose	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,4GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4Glc
iLNO	iso-Lacto-N-octaose	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,3GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4Glc
pLNO	para-Lacto-N-octaose	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
pLNnO	para-Lacto-N-octaose	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
LND	Lacto-N-decaose	Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,3GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,3GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4Glc
LNnD	Lacto-N-neodecaose	Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,4GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4GlcNAcβ1,6 Galβ1,4GlcNAcβ1,3 } Galβ1,4Glc

Una vez constituida la cadena central ésta puede ser decorada mediante la adición de fucosa ( $\alpha$ 1,2,  $\alpha$  1,3 o  $\alpha$ 1,4) y/o Neu5Ac ( $\alpha$ 2,3 o  $\alpha$ 2,6)<sup>11-15</sup> (**Figura 1. 2**). En función de la presencia de Neu5Ac en la estructura de los HMOs, estos compuestos se dividen en ácidos (sialilados) y neutros (no sialilados). Ambos grupos podrán presentar unidades de Fuc en su estructura, obteniendo así 4 clases de HMOs distintos: neutros, neutros fucosilados, ácidos y ácidos fucosilados.



**Figura 1. 2.** Esquema general de formación de HMOs.

En la primera etapa se da la unión de la lactosa con uno de los dos disacáridos, posteriormente el producto formado puede ser fucosilado o sialilado generando gran diversidad de moléculas.

Dada la elevada complejidad y variedad estructural que existe dentro de los HMOs, y ya que en esta introducción se hablará de algunas de estas estructuras, en la **Tabla 1. 2** se muestra el nombre, la abreviatura y la estructura de los compuestos más relevantes.

Capítulo 1

**Tabla 1. 2.** Lista de abreviaturas y estructuras de los HMOs más relevantes (Fajies *et al.*, 2019.).

Nombre	Abreviatura	Estructura
Lacto- <i>N</i> -biose	LNB	Galβ1,3GlcNAc
Lacto- <i>N</i> -triose II	LNT II	GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
3'-Galactosyllactose	3'GalLac	Galβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -tetraose	LNT	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -neotetraose	LNnT	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -neohexaose	LNnH	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -hexaose	LNH	Galβ1,3GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -neooctaose	LNnO	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -neooctaose isomer	LNnO isomer	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
para-Lacto- <i>N</i> -neohexaose	p-LNnH	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -neodecaose isomer	LNnD isomer	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc
2'-fucosyllactose	2'FL	Fucaα1,2Galβ1,4Glc
2',3-Difucosyllactose	2'3FL or DFL	Fucaα1,2Galβ1,4(Fucaα1,3)Glc
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I	LNFP I	Fucaα1,2Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II	LNFP II	Galβ1,3(Fucaα1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -fuconeopentaose III	LNFP III	Galβ1,4(Fucaα1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -difucohexaose I	LNDFH I	Fucaα1,2Galβ1,3(Fucaα1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc

## Capítulo 1: Introducción

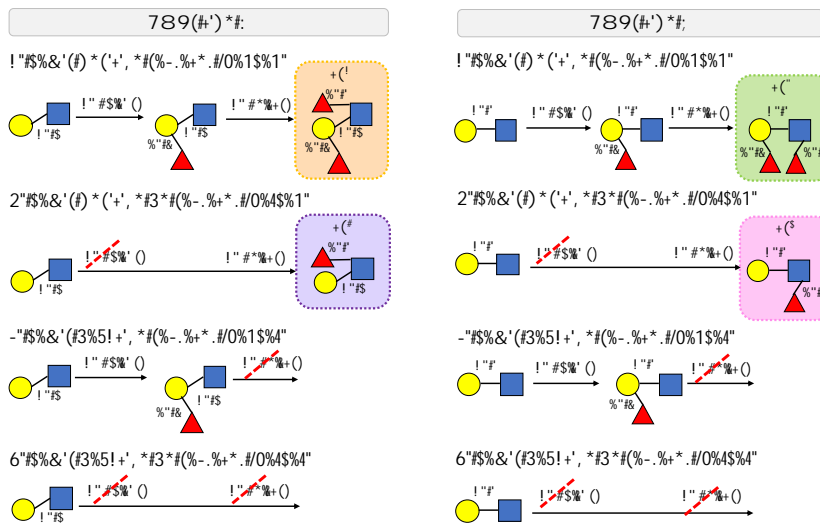
F-p-Lacto- <i>N</i> -neohexaose	F-p-LNnH or IFLNH III	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3 Galβ1,4Glc
F-Lacto- <i>N</i> -neohexaose I	F-LNnH I	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
F-Lacto- <i>N</i> -neohexaose II	F-LNnH II	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
DF-Lacto- <i>N</i> -neohexaose	DF-LNnH	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
α1,2-Fucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose I	1,2F-LNnH I	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
α1,2-Difucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose	1,2DF-LNnH	Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
α1,2-1,3Difucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose I	1,2-1,3DF-LNnH I	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
α1,2-1,3Difucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose II	1,2-1,3DF-LNnH II	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
α1,2-1,3Trifucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose I	1,2-1,3TriF-LNnH II	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
α1,2-1,3Trifucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose II	1,2-1,3TriF-LNnH II	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
α1,2-1,3Tetrafucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose	1,2-1,3TF-LNnH	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
3-Fucosyllactose	3'FL	Galβ1,4Fuca1,3Glc
Lacto- <i>N</i> -neofucopentaose I	LNnFP I	Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -neofucopentaose V	LNnFP V	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
Lacto- <i>N</i> -neofucopentaose II	LNnFP II	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
Lacto- <i>N</i> -neodifucohexaose II	LNnDFH II	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
Lacto- <i>N</i> -difucohexaose II	LNDFH II	Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
α1,3-fucosylated lacto- <i>N</i> -triose II	--	GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
Difucosylated hexasaccharide	--	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
α2,3-Sialyllactose	3'SL	Neu5Acα2,3Galβ1,4Glc
α2,3-Sialyl-lacto- <i>N</i> -biose	3'SLNB	Neu5Acα2,3Galβ1,3GlcNAc
α2,6-Sialyllactose	6'SL	Neu5Acα2,6Galβ1,4Glc
α2,6-Sialyllacto- <i>N</i> -tetraose	LST a	Neu5Acα2,6Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
α2,6-Sialyllacto- <i>N</i> -neotetraose	LST c	Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
α2,6-Sialyllacto- <i>N</i> -neohexaose	S-LNnH II	Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc

La genética es el factor más influyente en la composición de los HMO, la cual está estrechamente relacionada con el grupo sanguíneo de la madre (Secretor y Lewis) dictando la expresión o no de ciertas glicosiltransferasas. La variabilidad en su composición recae especialmente en los genes secretores (*Se*) y Lewis (*Le*). El gen *Se* codifica para la expresión de la enzima α1,2-fucosiltransferasa (FUT2), la cual cataliza la unión de una Fuc a la Gal terminal de la lactosa o de la estructura elongada mediante enlaces α1,2. Esta enzima se encuentra presente en el 77% de la población Caucásica, nombrándose a estos

individuos secretores<sup>16</sup>. Las madres secretoras presentarán leches ricas en 2'FL (2-fucosil-lactosa) y LNFP-I (Lacto-N-fucopentaosa I).

Otro gen esencial en la composición de estos oligosacáridos es el gen *Le*, éste codifica para la expresión de la enzima  $\alpha$ 1/3,4-fucosiltransferasa (FUT3) catalizando la adición de moléculas de fucosa a unidades de GlcNAc de los HMOs de tipo 1 mediante enlaces  $\alpha$ 1,3/4. En función de la expresión o no de estos genes existirán 4 tipos de leche Le+Se+, Le-Se+, Le+Se- y Le-Se-<sup>12,15,17</sup> (**Figura 1. 3**). Sin embargo, la clasificación de la leche en estos 4 grupos es una gran simplificación, ya que factores ambientales como la salud de la madre, la geografía, etc, también pueden modular la composición de estos productos<sup>18</sup>. Actualmente se conoce el papel que juegan las enzimas FUT2 y FUT3 en la síntesis de estos compuestos; no obstante, la presencia de HMOs fucosilados en leches Le-Se- evidencian que otras fucosiltransferasas (FUT1, 4, 5, 6, 7 o 9) tienen que estar involucradas en la biosíntesis de estos productos<sup>8</sup>.

Las variaciones interpersonales en la sialilación de los HMOs son más sutiles, ya que la expresión y regulación diferencial de las sialiltransferasas puede contribuir en la abundancia relativa de los HMOs sialilados en la leche<sup>17,19,20</sup>.



**Figura 1. 3.** Clasificación de los HMOs según grupos Lewis y secretores. Los genes *Le* y *Se* codifican para las fucosiltransferasas FUT2 y FUT3 respectivamente. En la imagen se muestran los epítopos obtenidos en función del genotipo *Se* y *Le* para los HMO tipo 1 y 2.

El interés por identificar y cuantificar estos oligosacáridos dio sus primeros frutos en los años 90. En 1990 Thurl y coworkers<sup>21</sup> reportaron por primera vez la cuantificación de algunos de los HMOs neutros y ácidos más representativos. La separación y cuantificación de estos productos se realizó mediante

cromatografía de intercambio iónico de alto pH, técnica ampliamente usada en esa época<sup>15,22</sup>. Otros métodos analíticos como HPLC por fase reversa o electroforesis capilar fueron empleados en años posteriores<sup>23,24</sup>. Gracias al avance tecnológico y al desarrollo de nuevos métodos analíticos más sensibles se han podido identificar y cuantificar gran variedad de estos productos. Actualmente los métodos más empleados son la electroforesis capilar acoplada con espectroscopia de resonancia magnética (RMN) o espectroscopia de masas (MS)<sup>25,26</sup>, o bien, el método MALDI-FTICR MS (matrix-assisted laser desorption ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry)<sup>25,27,28</sup>.

La leche humana en comparación con la de otras especies se considera única debido a la calidad y cantidad de sus HMOs, ya que contiene oligosacáridos en mayor cantidad, variedad, complejidad y longitud. Concretamente estos productos representan el 20% de los carbohidratos totales presentes en ésta, mientras que la leche bovina únicamente contiene trazas de estos compuestos<sup>29</sup>. En la leche humana la mayor parte de estas estructuras se encuentran decoradas, ya sea fucosiladas (50-80%) o bien sialiladas (10-30%)<sup>30</sup>. Si bien, el HMO más abundante es la lactosa en su forma monofucosilada, el oligosacárido complejo predominante en la leche humana es el tetrasacárido LNT. Este compuesto se encuentra principalmente en su forma neutra LNT (0,5-1,5 g/L) seguido en menor cantidad de sus derivados fucosilados (LNFP I, LNFH I), representando este conjunto el 50-70% de los oligosacáridos complejos presentes en la leche humana<sup>16</sup>. Además, este tetrasacárido también se ha aislado en su forma monosialilada dando lugar a tres isómeros (LSTa, LSTb, LSTc) y en su forma disialilada (DSLNT).

A modo de resumen, los HMOs más abundantes en la leche humana son 2'FL, LNFP I, LNFH I y LNT. Estas estructuras, a excepción del compuesto 2'FL, se caracterizan por presentar una unidad de LNB en su extremo no reductor, por lo que se puede afirmar que la leche humana está compuesta principalmente por HMOs de tipo 1. La predominancia de oligosacáridos de tipo 1 se ha identificado en poblaciones de distintas etnias independientemente del tipo de leche analizada (Le, Se). En la **Tabla 1.3** y la **Tabla 1.4** se recogen las concentraciones de los principales HMOs ácidos y neutros, reportados en diversos estudios.



**Tabla 1. 3.** Concentraciones de HMOs ácidos en la leche humana. (Asakuma *et al.*, 2007; Coppa *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2014; Kunz *et al.*, 1999; Smilowitz *et al.*, 2013; Thurl *et al.*, 1996) Fajjes *et al.*, 2019.

Compound	Concentration (g/L)					
	Maximum value	Thurl <i>et al.</i> 1996	Coppa <i>et al.</i> 1999	Kunz <i>et al.</i> 1999	Asakuma <i>et al.</i> 2007	Smilowitz <i>et al.</i> 2013
3'SL	< 0.30	0.15	0.09–0.13	0.27	0.30	0.09
6'SL	< 0.59	0.42	0.24–0.59	0.38	0.37	0.07
LST a	< 0.18	0.01	0.11–0.18	0.14	0.14	
LST b	< 0.25	0.04	0.17–0.25		0.06	
LST c	< 1.05	0.07	0.12–1.05	0.17	0.69	
DS-LNT	< 0.80	0.10	0.63–0.80	0.20	0.46	
FS-LNnH I	< 0.55		0.26–0.55			

**Tabla 1. 4.** Concentraciones de HMOs neutros presentes en la leche humana (Fajjes *et al.*, 2019).

Compound	Concentration (g/L)							
	Maximum value	Thurl <i>et al.</i> 1996	Kunz <i>et al.</i> 1999	Coppa <i>et al.</i> 1999	Chatuverdi <i>et al.</i> 2001 d 4-90	Asakuma <i>et al.</i> 2007 d 2	Smilowitz <i>et al.</i> 2013	Bao <i>et al.</i> 2013 d 3-29
2'FL	< 3.93	1.84	0.45	1.84–3.93	2.43	2.01	1.22	0.006-1.36
3FL	< 1.34	0.46	0.07	0.22–0.71	0.86	0.28	1.02	0.030-1.34
DFL (LDFT)	< 0.43	0.17			0.43	0.28	0.17	
LNT	< 1.54	0.86	1.09	0.71–1.56	0.55	1.44	0.36	0.160-1.18
LNnT	< 2.04	0.11	Traces	0.95–2.04	0.17	0.54	0.09	0.040-0.5
LNFP I	< 2.08	0.67	1.26	0.97–1.36	1.14	2.08	0.16	0.001-1.80
LNFP II	< 1.79	0.20		0.29–0.48			0.18	0.020-1.79
LNFP III	< 0.78	0.28					0.20	0.060-0.78
LNFP V	0.06							0.060
LNFP VI	0.01							0.010
LNDFH I	< 1.87	0.58		0.43–1.18	0.50	1.87		< 1.22
LNDFH II	< 0.25	0.25	0.16	0.19–0.22	0.09	0.02		< 0.22
LNH	< 0.17	0.13		0.05–0.17				
LNnH	< 0.28			0.09–0.28				
F-LNH I	< 2.62	0.20		1.74–2.62				
F-LNH II	< 1.06			0.18–1.06				
DF-LNH I	0.31	0.31						
DF-LNH II	< 1.02			0.12– 1.02				
TF-LNH	< 3.10			2.60 –3.10				

A pesar de encontrar gran variedad de estructuras de HMOs en la leche de los mamíferos, existen ciertas similitudes entre éstas. Estudios realizados con calostros y leches de diferentes mamíferos han revelado que la leche animal contiene mayoritaria-, o exclusivamente, HMOs de tipo 2, mientras que los HMOs de tipo 1 únicamente son predominantes en la leche humana<sup>29</sup> (Tabla 1. 5). La leche animal es menos rica y compleja que la leche humana presentando entre 100 y 1000 veces menos concentración de estos oligosacáridos, los cuales son de menor complejidad estructural. Entre especies animales también existen divergencias en la composición de las leches por ejemplo; los HMOs de animales domésticos se encuentran generalmente sialilados<sup>30,31</sup> mientras que las leches bovinas y de oveja raramente contienen compuestos fucosilados<sup>32</sup>. En la especie humana únicamente se encuentra una forma de ácido siálico (Neu5Ac), mientras que gran cantidad de animales de granja presentan Neu5Ac y Neu5Gg (ácido N-glicolilneuramínico) añadiendo así más diversidad estructural.

Si bien los primates en general presentan leches complejas y ricas en estos oligosacáridos, existe una gran diferencia de estructuras entre especies, determinando que la composición de oligosacáridos no sigue un patrón filogenético. Este hecho sugiere la existencia de otros factores los cuales estarán involucrados en la síntesis de estos compuestos. Presiones selectivas asociadas con la competencia entre bacterias comensales y bacterias patógenas podrían explicar la variación de estructuras, donde, la exposición a distintos patógenos podría estar involucrada en la síntesis de diferentes estructuras para así asegurar la supervivencia de la especie<sup>32</sup>.

**Tabla 1. 5.** Concentraciones de diferentes oligosacáridos en leches de mamíferos.

Producto	Cantidad g/L	
	Leche humana <sup>16,24,33</sup>	Leche de vaca <sup>16,34,35</sup>
Lactosa	55-70	40-50
LNT	0,5-1,5	Trazas
LNnT	0,16-0,69	n.r
LNFP I	1,2	n.d.
3'SL	0,1-0,3	0,03-0,06
6'SL	0,3-0,5	Trazas
DSLNT	0,2-0,6	Trazas
LST c	0,1-0,6	Trazas

n.r: no reportado. n.d: no detectado.

### 1.2.2 Biosíntesis de los HMOs

Hoy en día aún se desconoce gran parte del proceso de biosíntesis de HMOs debido a la elevada complejidad y especificidad del proceso. Como anteriormente se ha mencionado, estos compuestos se caracterizan por contener una molécula de lactosa en su extremo reductor. Dada esta particularidad varios estudios sugieren que este disacárido actúa como sustrato inicial para la biosíntesis de HMOs<sup>36,37</sup>. Así pues, el primer paso para la producción de estos compuestos es la biosíntesis de la lactosa la cual se da en las glándulas mamarias únicamente durante la lactogénesis<sup>38,39</sup>. Concretamente este proceso tiene lugar en el aparato de Golgi de las células, donde la Gal presente en forma de Gal-UDP es transferida al aceptor Glc gracias a la acción del complejo lactosa sintetasa (LS). Este complejo está formado por las enzimas Gal-T1 ( $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa) y  $\alpha$ -lactalbumina (LA) la cual únicamente se sintetiza en las glándulas mamarias durante la lactogénesis. La formación del complejo LS produce un cambio conformacional de la enzima Gal-T1 generando así una nueva cavidad de unión a aceptor. Esta alteración da como resultado un cambio en la especificidad por el aceptor, desplazando la afinidad por GlcNAc (aceptor natural) por Glc<sup>36,39</sup>. En la **Figura 1. 4** se esquematiza el complejo

proceso de biosíntesis de los HMOs, en el cual, tras numerosas reacciones enzimáticas, los azúcares activados por nucleótidos dan lugar a los HMOs.

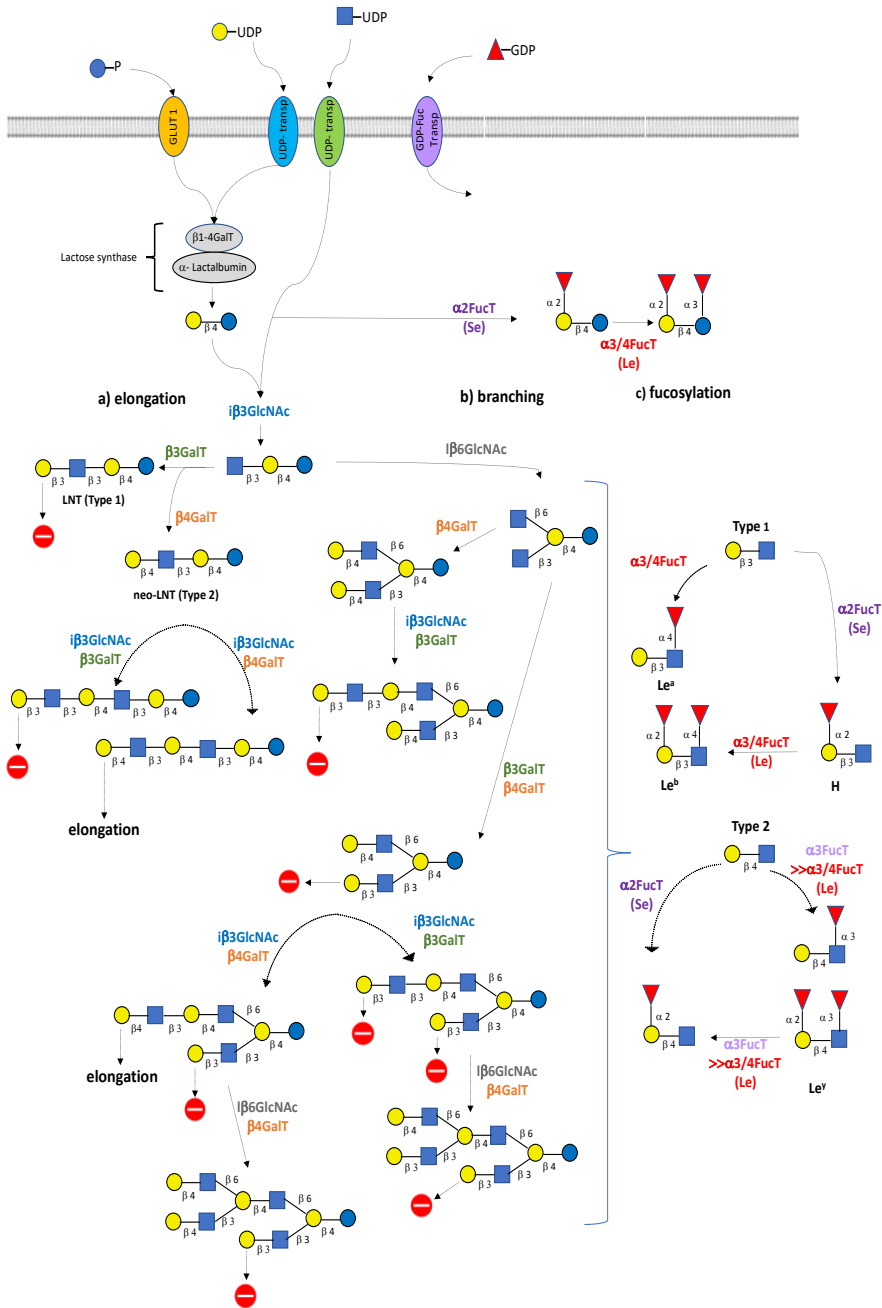


Figura 1. 4. Biosíntesis de HMOs neutros y fucosilados.

Actualmente se desconocen los mecanismos involucrados en la extensión de la lactosa para dar lugar a los HMOs. Kobata and coworkers<sup>40</sup> sugieren que la extensión puede darse mediante la adición secuencial de monosacáridos provenientes de azúcares de nucleótidos presentes en el citosol mediante la acción de distintas glicosiltransferasas. Concretamente las enzimas  $\beta$ -1-3-N-acetilglucosaminiltransferasa y  $\beta$ -1-3/4-galactosiltransferasa estarían involucradas en el proceso de extensión de la lactosa mientras que la proteína  $\beta$ -1-6-N-acetilglucosaminiltransferasa sería la responsable de la síntesis de HMOs ramificados. Como se ha visto en apartados anteriores, los oligosacáridos pueden estar fucosilados debido a la acción de distintas FUT cuya expresión dependerá de factores genéticos y ambientales.

Por lo que concierne a las reacciones y enzimas involucradas en sialilación de los HMOs, es decir la introducción de Neu5Ac en su cadena central, actualmente se desconocen sus mecanismos de actuación.

### 1.2.3 Metabolismo de los HMOs

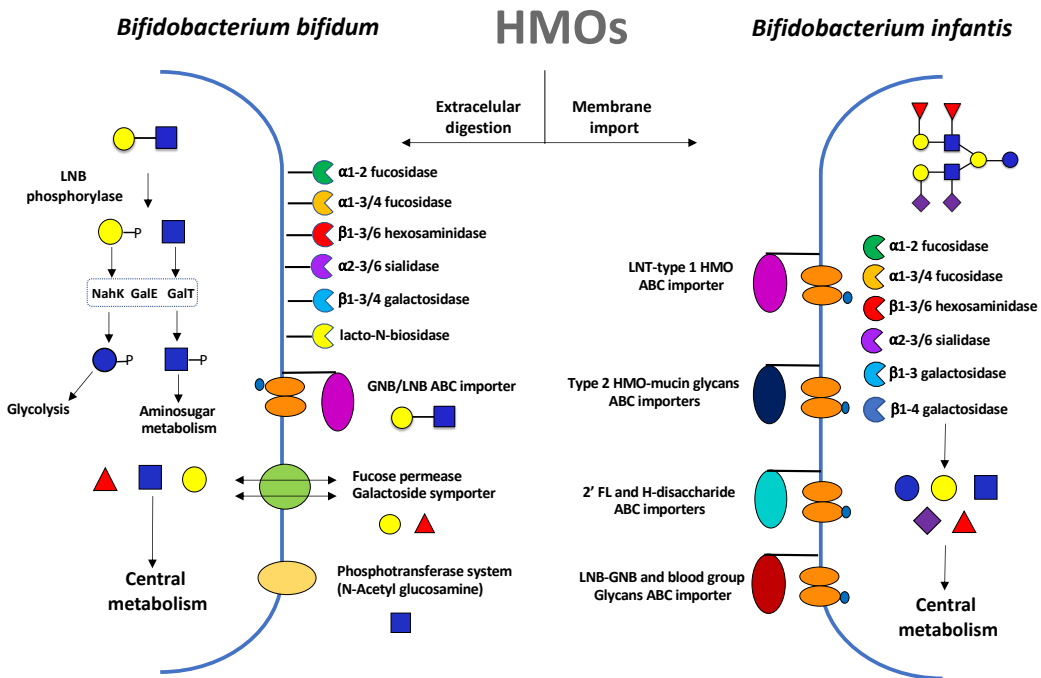
La importancia de estos compuestos no se debe a un papel nutricional, ya que estos no son digeridos por el sistema gastrointestinal del lactante. Por el contrario, la lactosa, carbohidrato principal de la leche materna, sí juega principalmente un poder nutricional ya que es metabolizada en las microvellosidades del intestino delgado donde será hidrolizada por la acción de la lactasa (EC 3.2.1.108) dando lugar a Gal y Glc.

Los HMOs son resistentes a los principales mecanismos de digestión del cuerpo humano ya que resisten el bajo pH del estómago y la acción de las enzimas salivares, pancreáticas e intestinales. Gracias a esta característica, estos compuestos llegarán hasta la parte final del intestino delgado y del colon prácticamente intactos. Concretamente entre el 40-50% de los HMOs ingeridos por el neonato son excretados por vía fecal, entre el 1-5% son absorbidos en el intestino estando la parte restante involucrada en el catabolismo microbiano<sup>41</sup>.

Actualmente se desconocen los receptores involucrados en la absorción de estos compuestos permitiendo su llegada al torrente sanguíneo donde serán distribuidos por todo el organismo desarrollando diferentes funciones sistémicas<sup>42</sup>. Posteriormente estos compuestos serán eliminados del organismo por vía urinaria, identificándose HMOs exclusivamente en la orina de los neonatos lactantes<sup>43</sup>.

Gran parte de los oligosacáridos ingeridos a través de la leche materna son empleados en el catabolismo microbiano, ya que estos carbohidratos son sustrato para diversas especies de

Bifidobacteria, género más abundante en la microbiota intestinal infantil. Concretamente dos especies de bifidobacteria pueden emplear estos oligosacáridos como fuente única de carbono, *B. bifidum* y *B. longum* subsp. *infantis*<sup>44</sup>. Gracias a la secuenciación del genoma de distintas especies de Bifidobacteria se ha identificado un grupo de genes común en este género involucrado en la degradación e incorporación de los HMOs, proporcionando así una explicación para este fenotipo<sup>45</sup>. A este grupo de genes se le nombró ruta LNB/GNB, codificando para la expresión de las proteínas involucradas en la ruta metabólica de LNB (estructura central de HMOs tipo 1) y GNB (galacto-N-biosa, estructura central de las mucinas). A parte de las enzimas de esta ruta Bifidobacteria presenta otras enzimas como  $\alpha$ -fucosidasas,  $\alpha$ -sialidasas,  $\beta$ -galactosidasas y  $\beta$ -hexosaminidasas responsables de la degradación parcial de los HMOs las cuales son expresadas intra- o extracelularmente dependiendo de la especie<sup>45</sup>.



**Figura 1. 5.** Ruta metabólica de los HMOs en *B. bifidum* (intracelular) y *B. infantis* (extracelular). Para *B. bifidum* se describe detalladamente tanto como la ruta de degradación parcial de HMOs como la ruta LNB/GNB.

Para esta tesis es de especial interés la enzima lacto-N-biosidasa de *B. bifidum*. En este microorganismo, una vez hayan actuado las enzimas de degradación parcial de HMOs ( $\alpha$ -fucosidasas,  $\alpha$ -sialidasas,  $\beta$ -galactosidasas y  $\beta$ -hexosaminidasas), la lacto-N-biosidasa será la responsable de hidrolizar extracelularmente el tetrasacárido LNT dando lugar a los disacáridos lactosa y LNB (Figura 1. 5). A continuación, el compuesto LNB activará la ruta LNB/GNB donde en primer lugar, el disacárido será internalizado mediante la acción de la proteína LNB/GNB ABC importer; seguidamente la enzima LNB

fosforilasa degradará el disacárido generando Gal-1P y GlcNAc. Mediante la acción de las enzimas NahK (N-acetilhexosamina 1-quinasa), GalE (UDP-galactosa epimerasa) y GalT (UDP-galactosa-1-fosfato uridiltransferasa) los monosacáridos serán transformados a Glc-1P y GlcNAc-1P siendo estos posteriormente incorporados a la glucólisis y al metabolismo de aminoazúcares respectivamente<sup>44-46</sup>.

Aunque *B. bifidum* es capaz de hidrolizar unidades de fucosa y/o Neu5Ac de los HMOs estos monosacáridos no son empleados como fuente de carbono por el microorganismo, ya que éste no posee las rutas metabólicas necesarias. Estos compuestos permanecerán en el medio siendo empleados por otras bacterias o patógenos presentes en el tracto gastrointestinal del neonato<sup>47</sup>.

## 1.3 Actividades biológicas de los HMOs

Desde que se inició la investigación sobre los HMOs, a estos oligosacáridos se les ha relacionado con un efecto “bifidogénico” también llamado efecto prebiótico. No obstante, en las dos últimas décadas las investigaciones sobre estos productos sugieren que éstos proporcionan un amplio espectro de beneficios para la salud y el desarrollo de los recién nacidos. En esta sección se resumen las principales funciones biológicas que los HMOs proporcionan a los neonatos.

### 1.3.1 Efecto prebiótico

A pesar de que los bebés están expuestos a la presencia de bacterias antes de su nacimiento, se considera que, en condiciones normales, el tracto gastrointestinal de éstos es estéril hasta el momento de su nacimiento. En las primeras etapas de vida la flora gastrointestinal de los infantes está modulada por factores extrínsecos como el tipo de parto, contaminaciones ambientales, condiciones sanitarias y la distribución geográfica de bacterias. Posteriormente este hecho cambiará, siendo el tipo de alimentación el principal factor que va a condicionar el ecosistema intestinal de los infantes, el cual estará habitado principalmente por Bifidobacterias y Lactobacillus, especies que proporcionan al neonato numerosos beneficios. Estos géneros representan el 90% de la flora intestinal de los lactantes, siendo del 40-60% en los alimentados con leches de fórmula, los cuales también presentarán enterobacterias y bacteroides<sup>6</sup>.

El interés de la comunidad científica hacia las propiedades de la leche materna empezó hace más de 100 años. En el año 1900 Moro determinó que la leche humana contenía factores que favorecían el crecimiento de ciertas especies de Bifidobacteria<sup>48</sup>. Más adelante, en 1926, Schöndfeld demostró por primera vez que el efecto bifidogénico de la leche no provenía de la fracción proteica<sup>49</sup>, hasta que en

1954 György determinó que dicho efecto era causado por una mezcla de oligosacáridos<sup>50</sup>; sabiendo hoy en día que los HMOs son los principales responsables del efecto bifidogénico de la leche<sup>6,16</sup>.

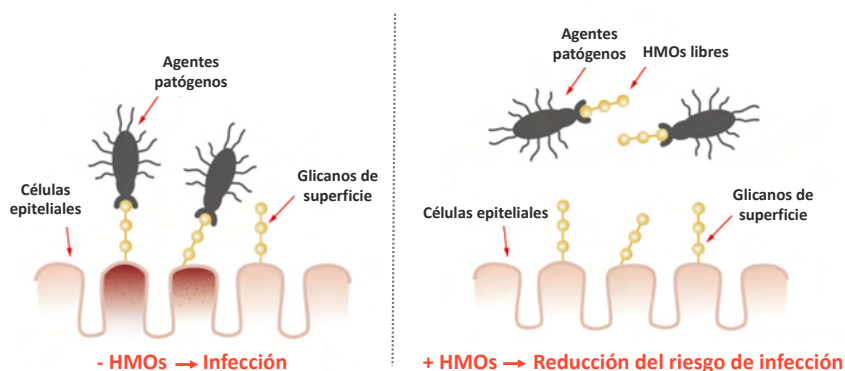
Los prebióticos son ingredientes no digeribles los cuales permiten cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota del tracto gastrointestinal, proporcionando beneficios sobre el bienestar y la salud del huésped. Para poder desarrollar dicha función estos compuestos tienen que llegar al intestino delgado, sin ser degradados ni absorbidos en el tracto gastrointestinal<sup>14</sup>. Todos estos requisitos son cumplidos por los HMOs, ya que únicamente una ínfima parte de éstos es absorbida en el intestino delgado.

Diversas investigaciones determinan que tanto la cantidad total de HMOs como la presencia individual de ciertas estructuras, como por ejemplo 2'FL, están relacionadas con un incremento en la cantidad de bifidobacterias en los intestinos de los infantes<sup>51</sup>. No todas las estructuras de HMOs proporcionan el mismo efecto prebiótico, siendo las estructuras fucosiladas las que más influyen. Así, la leche de las madres secretoras es la más beneficiosa para el crecimiento de las Bifidobacterias, permitiendo una más temprana y frecuente colonización del tracto gastrointestinal por parte de este género, influyendo positivamente en la cantidad de bifidobacterias en los niños hasta los 2-3 años<sup>52</sup>.

### 1.3.2 Inhibición de patógenos

Gran parte de los procesos infecciosos bacterianos, virales, parasitarios y protozoarios requieren una primera etapa de adhesión, donde el agente patogénico se adhiere a la superficie que pretende colonizar para así propagar la enfermedad<sup>16,37</sup>. Estas adhesiones están regidas por interacciones tipo glicano-lectina, por lo que las lectinas situadas en la superficie del patógeno reconocen de manera específica un glicano de la superficie produciéndose así la adhesión. Las células epiteliales de la mucosa intestinal son uno de los tejidos más glicosilados del cuerpo humano ya que están cubiertas por glicoproteínas, glicolípidos, mucinas, glicosaminoglucanos y otras clases de glicanos, siendo así un tejido susceptible a ser atacado<sup>7</sup>.

Los HMOs son oligosacáridos libres que presentan gran similitud estructural con los receptores (glicanos) localizados en las células epiteliales de la mucosa. Estos compuestos actúan como ligandos solubles para los patógenos, evitando su unión a los glicanos de la mucosa reduciendo así el riesgo de infección. Concretamente los HMOs actúan como análogos de los glicanos del tejido intestinal compitiendo con éstos por la unión del patógeno. De esta manera cuando el patógeno se une a un HMO éste pasará por el tracto gastrointestinal sin unirse al tejido, evitando así la infección<sup>10</sup> (**Figura 1. 6**). Estos oligosacáridos no reducen únicamente el riesgo de infecciones entéricas, sino que también confieren protección contra infecciones nasofaríngeas, respiratorias y urinarias<sup>37</sup>.



**Figura 1. 6.** Mecanismo de inhibición de patógenos gracias a la acción de los HMOs.

Se empezaron a tener evidencias del efecto anti-patogénico de estos compuestos ya sobre los años 80. En 1982 Parkkinen demostró como los HMOs sialilados era capaces de abolir la unión de ciertas cepas de *E. coli* causantes de meningitis y sepsis neonatal<sup>53</sup>. Más adelante en 1986 Andersson, demostró que la adhesión de *H. influenzae* a los glicanos de las células epiteliales faríngeas o bucales se veía inhibida por la acción de los compuestos LNT y LNnT<sup>54,55</sup>. Actualmente también se conoce el papel que juegan estos compuestos como antiadhesivos de *C. jejuni*. Este patógeno es el causante de la diarrea infantil bacteriana, siendo ésta la principal causa de mortalidad infantil. Experimentos realizados con 100 parejas madres-hijo determinaron que existe una correlación positiva entre las concentraciones de 2'FL y LNFP II presentes en la leche y la reducción de la incidencia y severidad de la enfermedad, ya que este patógeno presenta afinidad por los glicanos  $\alpha$ 1,2fucosilados<sup>56</sup>.

Otro caso que merece especial mención es la protección que los HMOs parecen conceder a los infantes amamantados de madres VIH positivas (Virus de la Inmunodeficiencia Humana). Una de las etapas importantes para la transmisión de la enfermedad entre madres y lactantes es la interacción entre la glicoproteína envoltorio del VIH gp120 y la proteína DC-SIGN, presente en la superficie de las células dendríticas. Durante el proceso infeccioso, la proteína DC-SIGN interactúa con los glicanos manosilados de la glicoproteína gp120, permitiendo la transmisión del virus de madres a hijos a través de las mucosas durante la lactancia. No obstante, la proteína DC-SIGN presenta mayor afinidad por los antígenos de Lewis que por los glicanos manosilados de la glicoproteína del virus. Ciertos HMOs presentan los antígenos de Lewis en sus estructuras; por este motivo estos compuestos son unos potenciales competidores para la proteína gp120, evitando así la interacción con DC-SIGN y por lo tanto la transmisión de la enfermedad. Estos resultados explicarían porque la transmisión del VIH entre madres y lactantes es bastante baja, ya que entre el 80-90% de los lactantes no contraerán la infección a pesar de la exposición continua a este<sup>14,57,58</sup>.



### 1.3.3 Moduladores de las células epiteliales

Entre el 1-5% de los HMOs ingeridos por los infantes son absorbidos en el tracto gastrointestinal, llegando así al sistema circulatorio donde serán distribuidos por el todo el organismo. Por estos motivos estos compuestos también actuarán a nivel sistémico proporcionando numerosos beneficios fisiológicos al infante. Estudios realizados en la última década han demostrado que estos oligosacáridos tienen la capacidad de interactuar con las células epiteliales intestinales, modulando sus patrones de glicosidación superficial, su ciclo celular (la apoptosis, la proliferación, la diferenciación) y la señalización celular<sup>10,59</sup>.

Angeloni y colaboradores determinaron que la expresión génica de diversas sialiltransferasas (ST3Gal1, ST3Gal2 y ST3Gal4) se ve reducida por la presencia del compuesto 3'SL, hecho que origina una disminución de glicanos sialilados ( $\alpha 2,3$   $\alpha 2,6$ ) en la superficie de las células epiteliales. Esta alteración disminuirá la adhesión del patógeno *E. coli* al tejido del huésped ya que para ello éste requiere glicanos sialilados, reduciendo así las infecciones asociadas al patógeno<sup>60</sup>.

### 1.3.4 Inmuno-moduladores

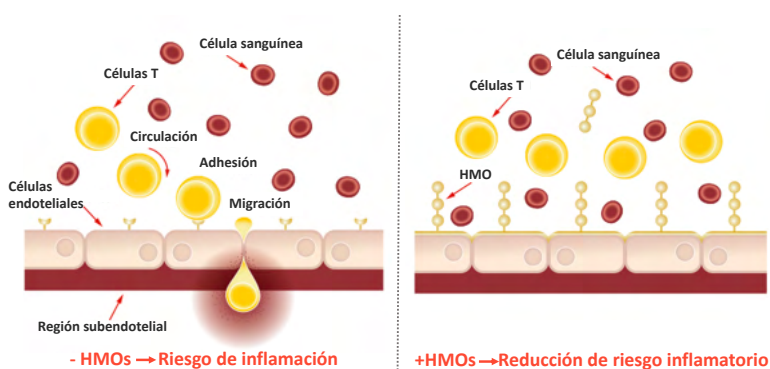
Una de las funciones sistémicas más relevantes de los HMOs es su papel como inmuno-moduladores ya que estos compuestos presentan la capacidad de inhibir el reclutamiento y adhesión de moléculas inmunitarias en el pulmón y en células epiteliales, reducir las reacciones alérgicas en la piel y estimular la producción de citoquinas en las células inmunitarias de la sangre<sup>59</sup>.

Durante la etapa de gestación y la etapa perinatal, el sistema inmunitario no se encuentra en un estadio de madurez. En esta etapa de inmadurez existe una tendencia hacia la generación de linfocitos cooperadores Th2 dominada por producción de citoquinas antiinflamatorias, rompiendo así el equilibrio fisiológico entre los linfocitos cooperadores Th1/Th2. Rápidamente después del nacimiento las proporciones de linfocitos cooperadores Th1 y linfocitos T reguladores incrementan para lograr equilibrio natural Th1-Th17/Th2. Esta homeostasis inmunitaria proporcionará dos grandes ventajas al bebé; permitirá la colonización de microorganismos comensales, y le conferirá protección contra patógenos y sustancias antigénicas extra- o intracelulares<sup>41</sup>.

Estudios con células mononucleares de sangre de cordón umbilical han determinado que los HMOs sialilados tienen una elevada importancia en la maduración de los linfocitos. Estos compuestos pueden interactuar con gran variedad de receptores de células inmunitarias como galectinas, selectinas,

receptores tipo Toll (TLR) entre otros, promoviendo la diferenciación de células-T inmaduras hacia fenotipos tipo Th1/Th2<sup>61</sup>.

Los HMOs también están involucrados en la regulación de la respuesta inflamatoria actuando como moduladores de la adhesión y el deslizamiento de los leucocitos. Para que tenga lugar la respuesta inflamatoria, los leucocitos presentes en el torrente sanguíneo deben migrar a través del endotelio hacia las regiones subendoteliales donde tiene lugar la inflamación. Inducidas por las citoquinas pro-inflamatorias, las células epiteliales expresarán las selectinas P y E, las cuales presentan gran afinidad por los epítomos sialilados (sialil Le<sup>x</sup> y Le<sup>y</sup>). Estos epítomos se encuentran presentes en los glicanos superficiales de los leucocitos, así pues, los leucocitos que circulan por el torrente sanguíneo interactuarán con las selectinas epiteliales. Esta interacción causará una desaceleración de los leucocitos, los cuales fluirán por la capa de células epiteliales hasta su extravasación e infiltración por las mucosas llegando así al tejido destino (**Figura 1. 7**). Existen gran cantidad de HMOs que contienen epítomos sialilados en su estructura, éstos podrán unirse a las selectinas presentes en el tejido epitelial evitando así la interacción selectina-leucocito impidiendo el proceso inflamatorio<sup>16,37</sup>.



**Figura 1. 7.** Influencia de los HMOs en el proceso inflamatorio

### 1.3.5 Nutrientes para el desarrollo neuronal

Los glicanos juegan papeles esenciales en el crecimiento y desarrollo de diferentes órganos, incluido el cerebro. En la última etapa de gestación, y hasta los 8 meses de edad, la concentración de glicoconjugados que presenta el cerebro humano es superior, ya que este periodo se caracteriza por una elevada plasticidad sináptica y un rápido desarrollo de las redes neuronales. Existen evidencias que relacionan la lactancia con un mejor desarrollo cognitivo y cerebral del infante, pese a que actualmente solo existen un número limitado de ensayos clínicos que puedan demostrar estas evidencias.

El ácido siálico (Neu5Ac o poli-SiA) es un compuesto fundamental para la formación de galactocerosídidos, gangliósidos, glicoproteínas y glicanos, moléculas imprescindibles en las etapas

de mielinización y en la formación y desarrollo de diversas funciones cerebrales<sup>16</sup>. La leche materna es un alimento rico en ácido siálico, siendo su principal fuente los HMOs<sup>62</sup>. Estudios post mortem han revelado que las concentraciones de gangliósidos y proteínas sialiladas es mayor en los cerebros de los lactantes<sup>63</sup>, sugiriendo que la aportación de este compuesto mediante la leche humana sí que tiene un papel activo en la fisiología cerebral. Wang demostró la importancia de la ingesta de ácido siálico exógeno para el desarrollo cerebral y cognitivo del infante. Este compuesto es sintetizado de manera endógena por la enzima UDP-N-acetilglucosaminil-2-epimerasa la cual presenta una baja actividad en la etapa neonatal. En este período de desarrollo cerebral el requerimiento de ácido siálico es elevado, por lo que una ingesta externa permitirá que su concentración no sea limitante durante esta etapa. Estudios realizados con animales de granja demostraron como la aportación exógena de ácido siálico mejora los niveles de memoria y aprendizaje de los cachorros<sup>64</sup>.

El compuesto 2'FL es uno de los más abundantes en la leche humana, estando éste relacionado con un mejor desarrollo cerebral y cognitivo. Estudios realizados por Vázquez y colaboradores han determinado que el este compuesto incrementa los niveles de expresión de ciertos marcadores funcionales cerebrales en ratas, las cuales presentan una mejor consolidación de la memoria y aprendizaje espacial y asociativo. En este mismo estudio, los autores identificaron por primera vez 2'FL en el plasma de los roedores, demostrando así, que este compuesto es absorbido y transportado por el torrente sanguíneo llegando al cerebro, aunque actualmente aún se desconoce el mecanismo mediante el cual este compuesto atraviesa la barrera hematoencefalica<sup>64</sup>.

### 1.4 Producción de HMOs

Debido a las funciones biológicas que estos compuestos proporcionan a los neonatos, existe un gran interés en su producción e incorporación a las leches de fórmula. El objetivo actual de este alimento sintético es mimetizar lo máximo posible la leche materna, por lo que existe la necesidad de encontrar vías sintéticas eficientes de producción a gran escala de HMOs. Recientemente algunas leches de fórmula han empezado a incorporar oligosacáridos de estructuras simples como 2'FL y LNnT en su composición, ya que su producción es más sencilla. Como se ha ido relatando a lo largo de esta introducción la leche materna es rica en oligosacáridos de tipo 1, es decir derivados del compuesto LNT, existiendo un gran interés en encontrar una vía de producción a gran escala de esta molécula.

La leche bovina presenta oligosacáridos de menor complejidad y calidad que los de la leche humana, hecho que imposibilita el uso de este alimento como fuente natural de obtención de HMOs. En la última década ha aflorado el interés de explorar nuevas vías sintéticas para la producción de estos compuestos, cobrando especial interés la síntesis enzimática y la ingeniería metabólica.

Debido a la abundancia del tetrasacárido LNT y sus derivados en la leche humana, el objetivo de esta tesis se centra en la obtención de este compuesto. En esta sección se describirán distintas estrategias de síntesis descritas para este compuesto.

### 1.4.1 Síntesis química

La síntesis química de estos oligosacáridos sigue siendo un reto, requiriendo de numerosos pasos de protección y desprotección de los hidroxilos del carbohidrato para poder controlar la estero- y regio-selectividad del nuevo enlace glicosídico formado<sup>66</sup>. Ya que esta vía sintética requiere numerosos pasos de síntesis y purificación la eficiencia del proceso estará limitada.

Para solventar ciertas problemáticas de la síntesis química tradicional, en las últimas décadas han surgido alternativas como las estrategias one-pot<sup>67,68</sup> o los métodos quimioenzimáticos dando resultados prometedores a escala preparativa<sup>69,70</sup>.

### 1.4.2 Síntesis enzimática

Los carbohidratos son los componentes orgánicos más abundantes en la tierra encontrándose en todos los tipos de organismos. Estos compuestos no únicamente juegan papeles estructurales o energéticos, sino que están involucrados en procesos esenciales en la vida de los organismos como en el reconocimiento e interacción molecular, regulación, protección y muchos otros. Estos compuestos son sintetizados en la naturaleza por dos clases de enzimas distintas, las glicosiltransferasas (GT) y las glicosilhidrolasas (GH). Aunque la actividad natural de las GH es hidrolizar enlaces glicosídicos, ciertas GHs son capaces de formar nuevos enlaces glicosídicos ya sea por inversión de la reacción de hidrólisis o bien mediante la reacción de transglicosidación<sup>71,72</sup>.

La utilización de enzimas como biocatalizadores permite solventar los principales problemas que presenta la síntesis química de carbohidratos complejos ya que no requieren etapas de protección y desprotección, pues estos catalizadores proporcionan un control perfecto de la estereo- y regio-selectividad del enlace O-glicosídico formado, dando lugar a procesos altamente eficientes<sup>66</sup>.

#### 1.4.2.1 Glicosiltransferasas (GTs)

Las GTs son las principales responsables de la formación de nuevos enlaces O-glicosídicos en la naturaleza, catalizando la transferencia de un monómero procedente de un azúcar activado (mediante fosfato, nucleótido, fosfolípido, etc) a un aceptor. En función del dador activado empleado éstas se

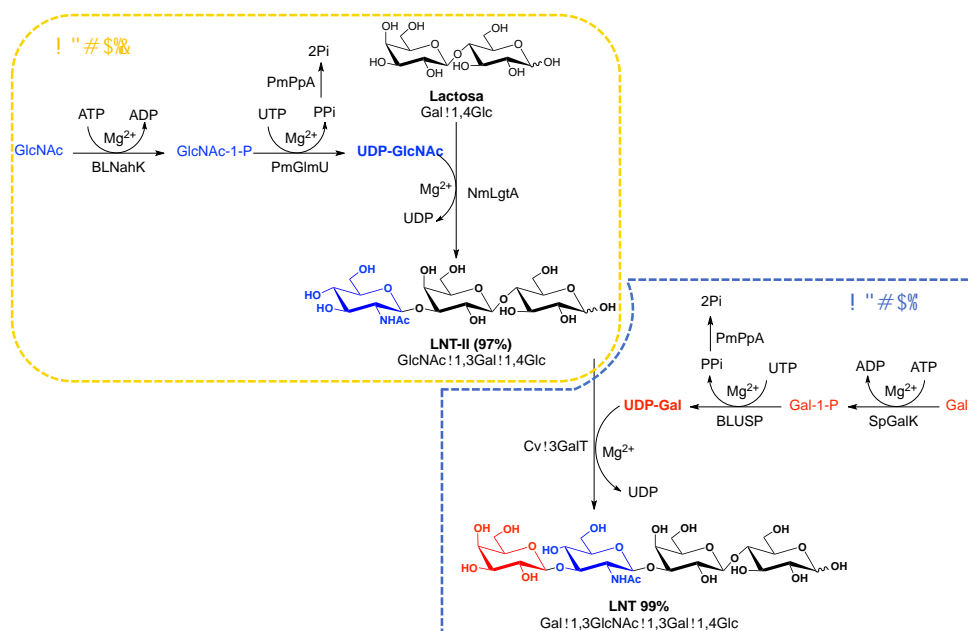
dividen en Leloir GT (dador activado por nucleótido) y non-Leloir GTs (azúcares no nucleotídicos). Generalmente estas enzimas se encuentran asociadas a las membranas celulares dificultando su obtención y purificación, dando como resultado enzimas poco estables. Debido a su difícil manipulación y a los elevados precios de los dadores activados en el mercado el uso de estas enzimas en proceso *in vitro* a gran escala es limitado. Actualmente, estos problemas se están solventando gracias a las nuevas estrategias de reacciones secuenciales multi-enzimáticas *one-pot* (OPME), o a la ingeniería metabólica y que ciertos microorganismos presentan en su metabolismos las rutas para la síntesis de estos azúcares activados<sup>72,73</sup>.

En los últimos años han tomado especial popularidad las reacciones OPME, las cuales se basan en la acción secuencial de distintas enzimas. Estas reacciones permiten la síntesis de carbohidratos complejos empleando como sustratos monosacáridos simples, ya que los dadores activados requeridos por las GT serán sintetizados *in situ* en la reacción<sup>33</sup> y regenerados gracias a la incorporación de enzimas exógenas.

#### 1.4.2.2 GTs para la síntesis de LNT

Recientemente Chen y colaboradores han propuesto una elegante síntesis a escala preparativa del compuesto LNT y sus derivados fucosilados basada en la estrategia OPME, empleando para ello dos procesos multienzimáticos secuenciales **Figura 1. 8**. Para esta estrategia fue esencial la identificación de una  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa eficiente para la síntesis de LNT. Con este fin los autores realizaron estudios de homología basados en la enzima  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa de *E.coli* (EcWbgO) ya que ésta es capaz de catalizar la síntesis de LNT pero con ciertas limitaciones en su velocidad de reacción. Tras realizar los alineamientos con la secuencia EcWbgO, los autores identificaron 4 potenciales candidatos, encontrándose entre éstos la enzima  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa de *Chromobacterium violaceum* (Cv $\beta$ 3GalT). Esta enzima fue clave para este trabajo permitiendo la síntesis de LNT, ya que las rutas sintéticas de GlcNAc-UDP y Gal-UDP ya habían sido descritas previamente<sup>74</sup>.

En la primera etapa de reacción fueron empleados como productos de partida lactosa, GlcNAc, ATP y UTP, creando así un sistema de activación enzimático de GlcNAc para generar el aceptor GlcNAc-UDP. Una vez obtenido el monosacárido activado, la enzima  $\beta$ 1,3-N-acetilglucosamintransferasa de *Neisseria meningitidis* (NmLgtA) cataliza la transferencia de GlcNAc hacia la lactosa obteniendo así el trisacárido LNT II con un rendimiento del 97% (OPME 1). A continuación, sin necesidad de purificar el compuesto LNT II, se adiciona Gal y las enzimas necesarias para iniciar el segundo proceso OPME-2. De nuevo gracias a la activación enzimática de Gal (UDP-Gal) y al descubrimiento de la proteína  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa de *Chromobacterium violaceum* (Cv $\beta$ 3GalT), la cual cataliza la transferencia de la galactosa hacia el compuesto LNT II, se obtuvo el compuesto LNT con un rendimiento del 99%<sup>74</sup>.



**Figura 1. 8.** Síntesis preparativa de LNT propuesto en Chen *et al.* 2019.

Enzimas involucradas en OPME 1: BLNahK: N-acetilhexosamin-1-quinasa de *Bifidobacterium longum* strain ATCC55813, PmGlmU: N-acetilglucosamin uridiltransferasa de *Pasteurella multocida*, NmLgtA:  $\beta$ 1-3-acetilglucosaminiltransferasa de *Neisseria meningitidis*, PmPpA: fosforilasa inorgánica de *Pasteurella multocida*. Enzimas de OPME 2: SpGalK: galactoquinasa TIGR4 de *Streptococcus pneumoniae*, BLUSP: UDP-fosforilasa de *Bifidobacterium longum*, PmPpA: fosforilasa inorgánica de *Pasteurella multocida* y Cvb3GalT:  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa de *Chromobacterium violaceum*.

## Glicosilhidrolasas (GHs) y transglicosidasas

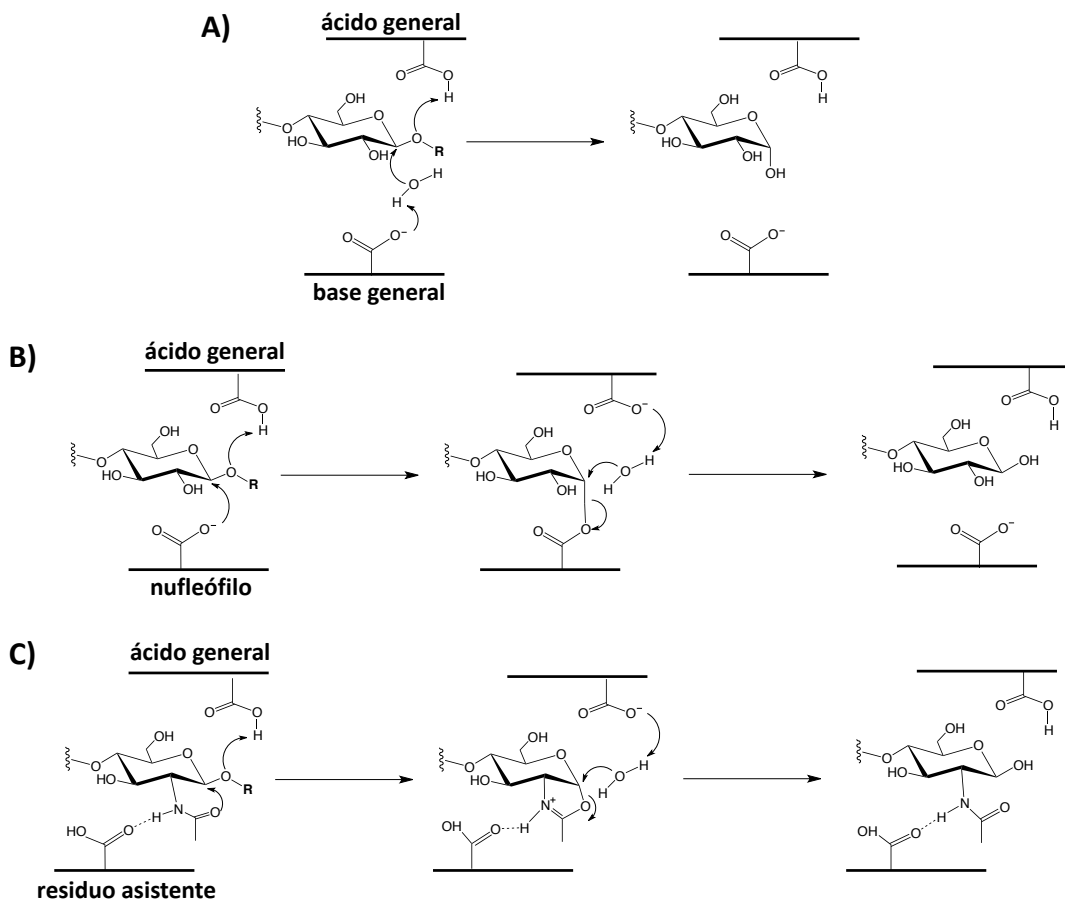
Las GHs son las enzimas responsables de la hidrólisis de los enlaces O-glicosídicos en la naturaleza. Dentro de las GH encontramos enzimas activas en gran diversidad de carbohidratos, las cuales se engloban debido a su similitud de secuencia en 128 familias en la base de datos CAZy<sup>75</sup>. La utilización de GHs como biocatalizadores para la síntesis de carbohidratos presenta ciertas ventajas sobre el uso de GTs ya que éstas son fáciles de obtener, generalmente presentan una gran estabilidad y permiten usar sustratos simples<sup>71,76</sup>.

Dada la gran diversidad de enzimas existentes en esta familia, éstas se agrupan en función de la localización del enlace glicosídico hidrolizado y en función de su mecanismo de acción. En función de la localización del enlace glicosídico hidrolizado, las GHs se dividen en exo- y endo-glicosilhidrolasa. Las exo-glicosilhidrolasas hidrolizan los enlaces terminales de los oligosacáridos, ya sea del extremo reductor, o lo más común del extremo no-reductor de la cadena. Por otro lado, las endo-

glicosilhidrolasas actúan hidrolizando uno de los enlaces glicosídicos del interior del oligosacárido. Estas enzimas también son clasificadas en función de su mecanismo de actuación, agrupándose en GHs con retención de la configuración y GHs con inversión de la configuración.

La mayoría de las GH actúan mediante una catálisis ácido-base requiriendo la presencia de dos residuos esenciales. Las enzimas con catálisis ácido-base actúan empleando dos mecanismos de acción distintos, los cuales dependerán del resultado estereoquímico del enlace hidrolizado. Las GH con inversión de la configuración hidrolizan el enlace O-glicosídico causando la inversión de la configuración del carbono anomérico, presentando los residuos catalíticos ácido y base general. Por el contrario, las GH con retención de la configuración no modifican la configuración de éste, presentando en esta ocasión como residuos catalíticos el residuo nucleófilo y el residuo ácido/base general. El mecanismo de reacción presentado por las GH con inversión de la configuración está mediado por una sola etapa. En ésta el oxígeno glicosídico una vez protonado por el ácido general actuará como grupo saliente, a su vez una molécula de H<sub>2</sub>O será activada por la base general atacando el centro anomérico. Esto causará un desplazamiento en su configuración dando como resultado un producto de reacción con una estereoquímica inversa a la del sustrato inicial (**Figura 1. 9 A**). Por otro lado, las GH con retención de la configuración actúan mediante una reacción de doble desplazamiento, donde en primer lugar se formará el intermedio de reacción glicosil-enzima el cual será posteriormente hidrolizado (**Figura 1. 9 B**). En la primera etapa (glicosidación) el ácido general cederá un protón al oxígeno glicosídico causando la liberación del grupo saliente. Simultáneamente el residuo nucleófilo, el cual se encuentra desprotonado, atacará el carbono anomérico dando lugar al intermedio covalente glicosil-enzima. En la etapa de deglicosidación, la molécula de H<sub>2</sub>O (o molécula aceptora) activada por la base conjugada del ácido general atacará el centro anomérico dando lugar al producto final el cual presentará una retención neta de la configuración, volviendo la enzima a su estado de protonación inicial<sup>71,76-78</sup>.

Ciertas GHs con retención de la configuración catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídico en azúcares con N-acetilglucosamina (GH18 quitinasas, GH20 hexosaminidasas, GH52 hialuronidasa y GH85 endo-β-hexosaminidasas). Estas enzimas no actúan mediante el mecanismo clásico (retención de la configuración) ya que no contienen el residuo nucleófilo en su estructura, sino que presentan una catálisis asistida por el sustrato (**Figura 1. 9 C**). En esta ocasión el grupo N-acetilo del sustrato (GlcNAc) actuará como nucleófilo interno formando en este caso el intermedio de reacción oxazolona/oxazolinio. Éste será atacado por la molécula de H<sub>2</sub>O activada generando el producto final con una retención neta de la configuración. Como ya se ha mencionado estas enzimas no tienen residuo nucleófilo, presentando en su lugar un residuo auxiliar; éste establecerá puentes de hidrógeno con el -NH del grupo acetamido, permitiendo la formación del intermedio oxazolinio<sup>71</sup>.



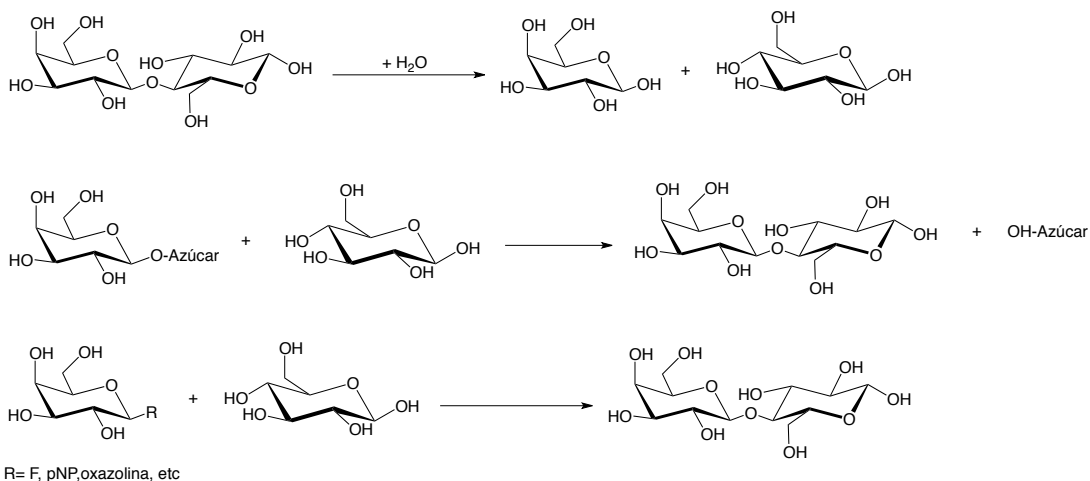
**Figura 1. 9.** Mecanismos de acción de las GH.

A) GH con inversión de la configuración, B) GH con retención de la configuración en enzimas con residuo nucleófilo, C) GH con retención de la configuración mediante catálisis asistida por sustrato.

Todo y encontrar gran cantidad de GHs en la base de datos CAZy, solo unas pocas han sido descritas como transglucosidasas naturales (TGs), las cuales principal o exclusivamente catalizan la reacción de transglucosidación (**Figura 1. 10, B**). Curiosamente las TGs guardan mayor parentesco con las GHs de su familia que entre las distintas TGs, remarcando la estrecha relación evolutiva entre estas enzimas. Este hecho sugiere que la actividad TG en las GHs viene dada por sutiles modificaciones moleculares en vez de a grades cambios estructurales en la enzima. Dentro de la comunidad científica existe un gran interés por determinar que factores moleculares determinan el carácter transglucosídico de las GHs, siendo hoy en día una incógnita. Diversas familias de GHs presentan enzimas transglucosídicas como por ejemplo: GH2 ( $\beta$ -galactosidasa), GH13 (ciclodextrina glucosiltransferasa), GH16 (Xiloglucano endotransglucosilasa), GH31 ( $\alpha$ -transglucosidasas), GH70 (glucansucrasas), etc<sup>79</sup>.



Las GH con retención de la configuración han sido comúnmente empleadas como biocatalizadores para la síntesis de oligosacáridos y glico-conjugados. Los enfoques clásicos, donde se utiliza la enzima salvaje, proponen la reversión de la actividad hidrolítica de la enzima ya sea por control termodinámico, o bien, mediante la reacción de transglicosidación por control cinético con dadores glicosídicos activados (**Figura 1. 10, C**). La síntesis por control termodinámico propone la reversión de la reacción de hidrólisis, hacia la formación del nuevo enlace O-glicosídico (reacción de condensación) mediante la alteración de las condiciones de reacción (co-solventes orgánicos, elevadas concentraciones de sustrato, altas temperaturas, etc). Por otro lado, la reacción de transglicosidación por control cinético con dadores glicosídicos activados, tiene como objetivo promover que el intermedio glicosil-enzima sea más reactivo frente a una molécula aceptora que frente a una molécula de H<sub>2</sub>O. Para esta estrategia se emplean dadores glicosídicos activados (fluoruros, arilos, etc) ya que generalmente estos compuestos son mejores sustratos que el producto de transglicosidación formado, permitiendo reducir la hidrólisis del producto de transglicosidación sintetizado. Cabe destacar que el aglicón liberado no actuará como aceptor, por lo que no competirá con la molécula aceptora deseada. En el caso de GHs con retención de la configuración con mecanismo asistido por el sustrato preferiblemente se emplean dadores activados oxazolina, ya que formarán directamente el intermedio de reacción.

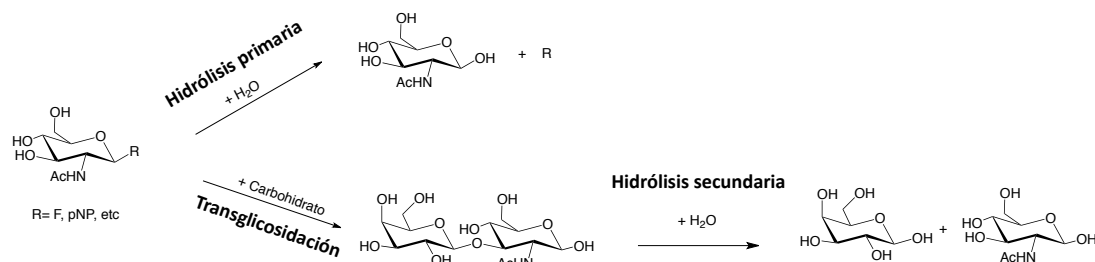


**Figura 1. 10.** Reacciones de las GHs.

A) reacción de hidrólisis catalizada por GHs, B) Reacción de transglicosidación catalizada por transglicosidasas naturales y C) reacción de transglicosidación catalizada por GHs en modo TG mediante transglicosidación por control cinético con dadores glicosídicos activados.

En la reacción transglicosidación con dadores activados en condiciones apropiadas una molécula aceptora, que no sea H<sub>2</sub>O, podrá interactuar con el intermedio de reacción formando así un nuevo enlace glicosídico, originando el producto de transglicosidación. Éste presentará la misma configuración anomérica que el dador glicosídico empleado, ya que se trata de GHs con retención de la configuración. Aunque la reacción de transglicosidación puede verse favorecida cinéticamente, la

reacción de hidrólisis siempre estará favorecida termodinámicamente ya que el producto de transglucosidación será sustrato (hidrólisis secundaria) para la enzima, desplazando así, el equilibrio hacia la reacción de hidrólisis (**Figura 1. 11**). Debido a la hidrólisis secundaria del producto formado los rendimientos de la reacción de transglucosidación serán limitados, los cuales, gracias a la utilización de dadores activados (control cinético) llegarán a alcanzar rendimientos de hasta un 40-50%<sup>71,72,80</sup>.

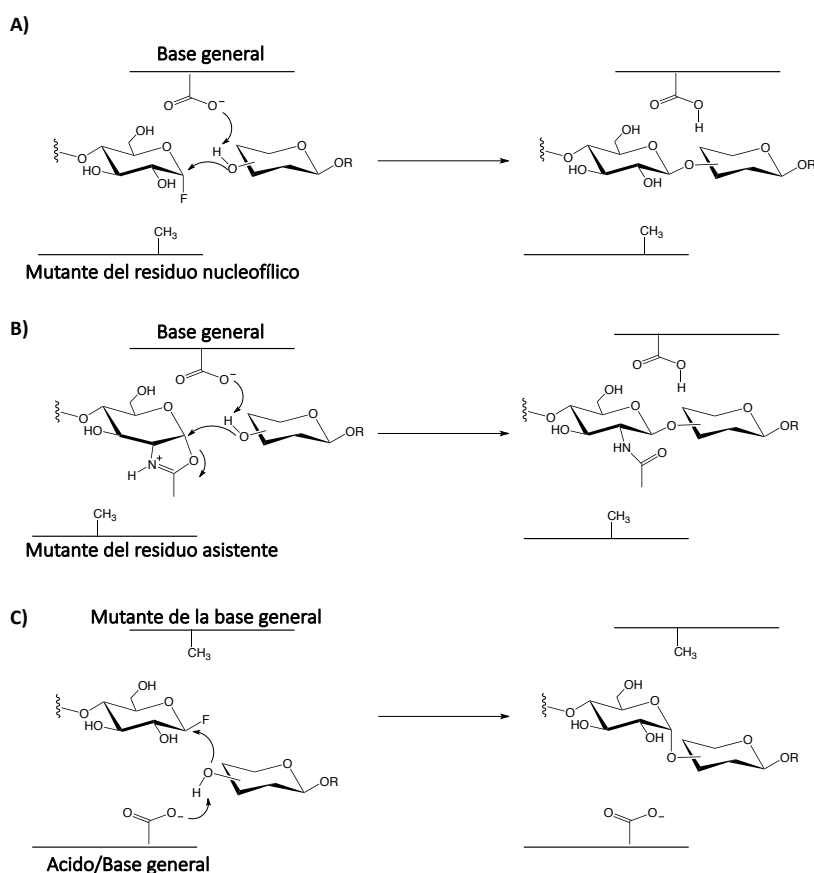


**Figura 1. 11.** Esquema de las posibles reacciones catalizadas por las GHs con retención de la configuración en modo transglucosidación por control cinético mediante dadores glicosídicos activados.

Una de las principales limitaciones de la reacción de transglucosidación catalizada por las GHs es la hidrólisis del producto formado (hidrólisis secundaria) debido a la actividad hidrolítica intrínseca de estas enzimas. Con la finalidad de solventar esta problemática en 1998 surgió un nuevo concepto de glicosidasas llamado glicosintasa, el cual fue aplicado por primera vez a exo- y endo-glicosidasas<sup>81,82</sup> con retención de la configuración. Esta estrategia se basa en la sustitución del residuo nucleófilo (típicamente Asp o Glu) de las GHs con retención de la configuración por otro residuo de carácter no nucleofílico (Ala, Ser, Gly). Debido a esta mutación la enzima será incapaz de catalizar la reacción de hidrólisis ya que no podrá formar el intermedio de reacción glicosil-enzima. Gracias a la utilización de dadores glicosídicos activados (generalmente fluoruro de glicosilo) con conformaciones que mimetizan la del sustrato durante el intermedio glicosil-enzima, la proteína podrá interactuar con un aceptor, sintetizando así nuevos oligosacáridos (**Figura 1. 12, A**). Esta estrategia permitirá obtener unos elevados rendimientos de síntesis ya que la reacción de síntesis estará más favorecida cinéticamente que la reacción de hidrólisis y debido a que el producto sintetizado no será hidrolizado por la enzima ya que ésta no presenta dicha actividad<sup>71</sup>.

Dado que las GHs con mecanismo asistido por el sustrato no presentan residuo nucleofílico para su uso como glicosintasas no se podrá aplicar la estrategia convencional. La metodología empleada para esta clase de enzimas se basa en la mutación de su residuo asistente, ya que éste juega un papel esencial en la orientación del grupo 2-acetamido del sustrato promoviendo el ataque nucleofílico. Debido a esta mutación no formará el intermedio de reacción, por lo que en esta estrategia se emplearán dadores glicosídicos activados oxazolina, los cuales mimetizan el intermedio de reacción y podrán reaccionar con una molécula aceptora (**Figura 1. 12, B**)<sup>71</sup>.

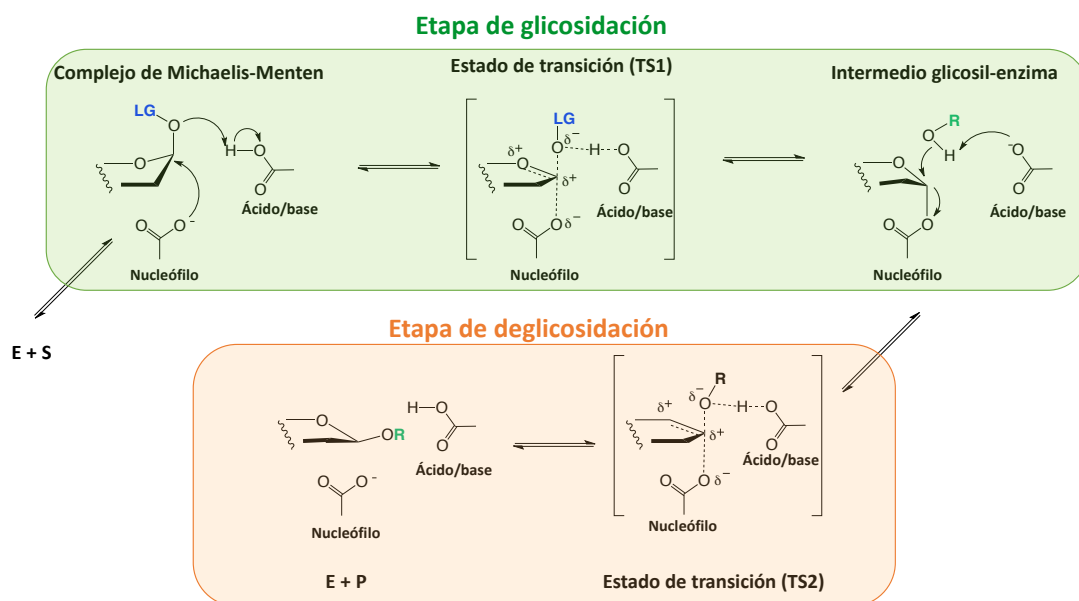
La estrategia glicosintasa ha estado ideada principalmente para GHs con retención de la configuración basándose en la sustitución del residuo asistente o el residuo nucleófilo. Para la creación de glicosintasas de GHs con inversión de la configuración la aproximación empleada es ciertamente distinta. En este caso gracias a la mutación de la base catalítica general y a la utilización de dadores glicosídicos activados (fluoruro de glicosilo), con la conformación anomérica inversa a la del producto deseado, la enzima podrá catalizar la formación de nuevos enlaces glicosídicos (**Figura 1. 12, C**). A pesar de que con esta estrategia se reducirá notablemente la actividad hidrolítica de la enzima ésta continuará siendo significativa, obteniendo unos rendimientos de síntesis limitados. Otro enfoque empleado para esta clase de enzimas es la mutación de los residuos cercanos a la base catalítica general, con el objetivo de impedir que el H<sub>2</sub>O nucleofílica pueda interactuar con la base general evitando así la reacción de hidrólisis<sup>71</sup>



**Figura 1. 12.** Estrategias glicosintasas de las GHs.

- A) Glicosintasas con retención de la configuración mediante mutación del residuo nucleofílico y empleando como dador fluoruro de glicosilo. B) Glicosintasas con catálisis asistida por el sustrato, mediante mutación del residuo asistente y empleando como dador un derivado oxazolina. C) Glicosintasas con inversión de la configuración mediante la mutación de la base general y empleado como dador fluoruro de glicosilo.

Otra de las estrategias más comunes para la síntesis de oligosacáridos complejos es la utilización de GHs con retención de la configuración mediante la reacción de transglucosidación por control cinético con dadores glucosídicos activados. Como anteriormente se ha mencionado estas enzimas actúan mediante una catálisis de doble desplazamiento regida por dos etapas principales, la glucosidación y la deglucosidación **Figura 1. 13**. La etapa de glucosidación empieza con la formación del complejo de Michaelis-Menten (E-S) seguido de la formación del intermedio covalente glicosil-enzima, o en el caso de las GHs con catálisis asistida por el sustrato el intermedio ion oxazolona, momento donde se producirá la liberación del grupo saliente. En la etapa de deglucosidación la molécula aceptora atacará el nuevo intermedio glicosil-enzima, generando el segundo estado de transición (TS2) el cual presentará la misma conformación que TS1. En función de la naturaleza de la molécula aceptora sucederá la reacción de hidrólisis, si ésta es una molécula de agua, o bien la reacción de transglucosidación si esta es un azúcar.



**Figura 1. 13.** Mecanismo de las GHs con retención de la configuración.

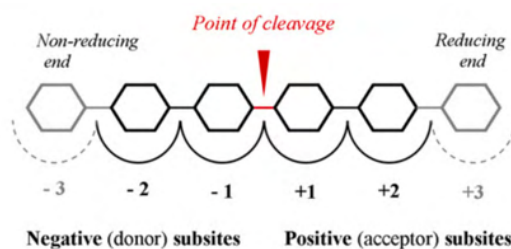
LG: grupo saliente (ej: grupo activado, azúcar, etc). R= H (reacción de hidrólisis), R= azúcar, (reacción de transglucosidación. Figura adaptada de Bissaro 2015<sup>79</sup>.

La ingeniería de proteínas es una estrategia ampliamente usada para modificar la actividad hidrolítica de las GHs, con la finalidad de incremento su actividad TG al mismo tiempo que se reduce su actividad hidrolítica. Existen diversas aproximaciones para este objetivo, basadas generalmente en la modificación del centro activo de la enzima. El rediseño de enzimas se puede llevar a cabo de dos maneras, mediante un diseño racional o bien aleatorio. En el diseño racional la modificación de la

proteína se realiza en base a estudios de secuencia y/o estructurales. Por otro lado el rediseño aleatorio mediante evolución dirigida requiere de complejos sistemas de análisis y cribaje<sup>76,80</sup>.

Dentro de la ingeniería de proteínas se han empleado exitosamente varias estrategias para reducir la actividad hidrolítica de las enzimas. Las moléculas de H<sub>2</sub>O compiten directamente con la molécula aceptora en la reacción TG, siendo el control de la accesibilidad de H<sub>2</sub>O al centro activo de la enzima una estrategia comúnmente empleada para potenciar la actividad sintética de las GHs. En esta clase de enzimas la hidrofobicidad del centro activo es esencial para la actividad TG ya que centros activos hidrofílicos favorecerán la acomodación y la accesibilidad de las moléculas de H<sub>2</sub>O a esta región promoviendo la reacción de hidrólisis. La introducción de aminoácidos hidrofóbicos en los subsitios positivos de las GHs podría disminuir la difusión de moléculas de H<sub>2</sub>O hacia el centro activo de la enzima; mutaciones que a la vez podrían incrementar la afinidad enzima-aceptor pudiendo causar un efecto positivo en la reacción TG<sup>76</sup>. Otra aproximación empleada para repeler las moléculas de agua del centro activo de la enzima es mediante la identificación y modificación (aumento de la hidrofobicidad) de los canales de agua<sup>76</sup>.

En el año 1995, surgió la nomenclatura de subsitios para las GHs, los subsitios son regiones donde se acomodan los monosacáridos que conforman los oligosacáridos dentro del centro activo de la enzima, nombrando los subsitios desde -n (extremo no reductor) a +n (extremo reductor) siendo n un numero entero. La reacción de hidrólisis tiene lugar entre los subsitio -1 y +1, siguiendo la numeración a partir de este punto para los subsitios negativos y positivos. En el caso concreto de la reacción TG, la molécula aceptora se acomodará en los subsitios positivos y la dadora en los negativos, dándose la formación del enlace entre los subsitio -1 y +1<sup>83,84</sup> (Ej. **Figura 1. 14**).

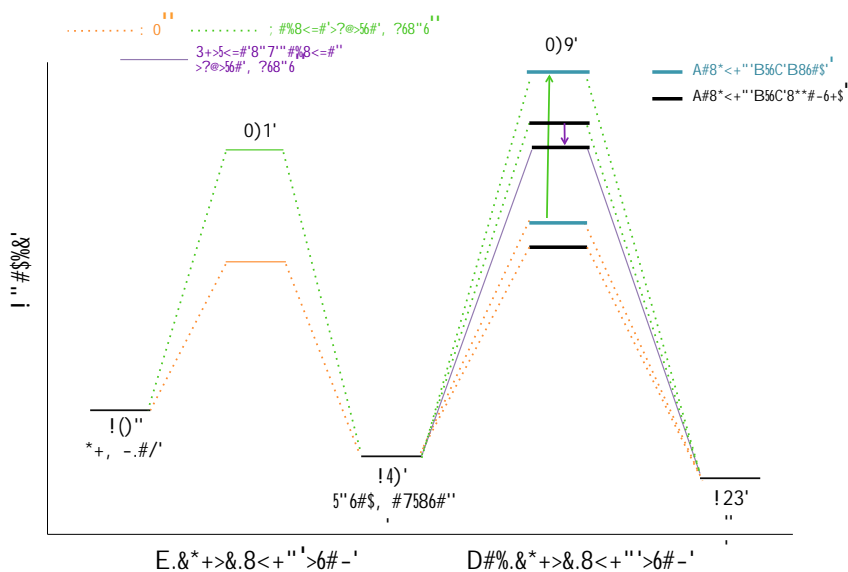


**Figura 1. 14.** Nomenclatura en subsitios de las GHs. Figura extraída de Bissaro 2015<sup>79</sup>.

Otra estrategia para potenciar la actividad TG de las GHs es mejorar la unión de la molécula aceptora. Actualmente se tienen evidencias que los residuos localizados en los subsitios positivos de la enzima contribuyen a una mayor energía libre de unión del aceptor entrante. La utilización de esta estrategia requiere un gran conocimiento de la relación estructura-función de la enzima, ya que se manipulará la estructura o las propiedades de los aminoácidos del centro activo. Para mejorar la afinidad enzima-

aceptor se incorporan aminoácidos hidrofóbicos en los subsitios positivos, ya que estos residuos interactúan fuertemente con los azúcares. Gracias a la incorporación de residuos aromáticos se formarán nuevas interacciones de apilamiento entre la enzima y el aceptor incrementando la afinidad entre éstas, influyendo positivamente en la reacción TG. En resumen, la incorporación de ciertas mutaciones en los subsitios positivos de la enzima pueden mejorar la ratio TG/H, no obstante el incremento de la actividad TG será limitado debido a que la actividad hidrolítica de la enzima persistirá <sup>76,79</sup>.

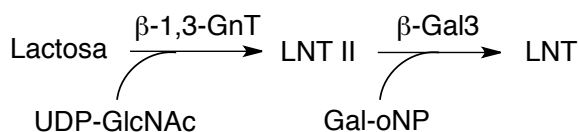
La modificación de los subsitios negativos también ha sido explorada para mejorar la ratio TG/H de las GHs, proponiendo la modificación de los residuos conservados de la enzima. Para lograr este objetivo una estrategia es la modificación de los residuos involucrados en la estabilización del estado de transición con la finalidad de desestabilizar esta etapa, lo que podría causar una disminución de la actividad hidrolítica de la enzima influyendo positivamente en la actividad TG. La modificación del residuo asistente/nucleófilo es una estrategia muy común ya que puede causar efectos drásticos en la formación del intermedio glicosil-enzima y por lo tanto en la actividad de la enzima. La incorporación de ciertas mutaciones en los subsitios negativos puede incrementar la barrera de energía del estado de transición en la etapa de glicosidación y deglicosidación, hecho que causaría que la deglicosidación mediada por H<sub>2</sub>O sea menos competitiva, favoreciendo así la reacción con la molécula aceptora. Esto se debería a una diferenciación de las barreras de energía de los estados de transición de la molécula H<sub>2</sub>O y la molécula aceptora en la etapa de deglicosidación siendo más favorable la reacción con el carbohidrato **Figura 1. 15**.



**Figura 1. 15.** Diagrama energético de las GHs con mecanismo de doble desplazamiento para los estados de transición 1 y 2. En naranja se muestra la energía de la enzima nativa, en verde la de la enzima con mutaciones en los subsitios negativos y en lila la energía resultante de la introducción de mutaciones en los subsitios negativos y positivos.

### 1.4.2.3 GHs para la síntesis de LNT

La carrera para la obtención del compuesto LNT empezó en los años 90 cuando en 1999 Murata describió por primera vez su síntesis enzimática empleando una GH en una de las etapas de síntesis. La estrategia seguida por los autores consiste en la elongación secuencial de lactosa con GlcNAc y Gal obteniendo así el tetrasacárido deseado. En primer lugar, la enzima  $\beta$ 1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa ( $\beta$ -1,3-GnT) será la responsable de transferir una unidad de GlcNAc procedente del sustrato UDP-GlcNAc a la lactosa, obteniendo así el trisacárido LNT II. A continuación, gracias al carácter transglicosídico de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* ATCC31382 ( $\beta$ -Gal 3) el compuesto LNT II será elongado con el monómero Gal procedente del dador activado Gal $\beta$ -oNP formando el compuesto LNT y su regio-isómero  $\beta$ 1,6 en un rendimiento total del 19.6% (**Figura 1. 16**). Esta síntesis secuencial de LNT fue optimizada posteriormente por Miyazaki<sup>85</sup>, empleando la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E.coli* ( $\beta$ -Gal) la cual presenta una elevada especificidad para hidrolizar enlaces  $\beta$ 1,6. Así pues, una vez obtenidos los compuestos LNT y su regio-isómero  $\beta$ 1,6 y gracias a la acción de la enzima  $\beta$ -Gal obtuvieron el compuesto LNT con un rendimiento del 22%.



**Figura 1. 16** Reacción enzimática descrita en Murta 1999<sup>86</sup> para la síntesis del compuesto LNT. Abreviaciones  $\beta$ 1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa ( $\beta$ -1,3-GnT),  $\beta$ -galactosidasa de *B. circulans* ATCC31382 ( $\beta$ -Gal3).

En el mismo trabajo Murata<sup>86</sup> y colaboradores exploraron la vía convergente 2+2 para la producción de LNT. Esta estrategia retrosintética se basa en la unión del dador LNB con el aceptor lactosa empleando los sustratos adecuados (protegidos y/o activados) en función de la enzima seleccionada. Mediante esta reacción se obtendrá la estructura central del HMO (lineal o ramificada) la cuál podrá ser decorada o derivatizada como se desee<sup>20</sup>. Para esta síntesis los autores seleccionaron la enzima lacto-N-biosidasa de *Aureobacterium sp.* strain L-101 parcialmente purificada, testando su actividad TG frente a los sustratos LNB-pNP y lactosa, obteniendo un rendimiento de LNT del 3.7 %<sup>86</sup>. Dada la capacidad de la enzima lacto-N-biosidasa para sintetizar LNT, Wada<sup>87</sup> estudió el carácter transglicosídico de esta proteína procedente del organismo *B. bifidum*, concluyendo que ésta también sintetizaba el tetrasacárido deseado. Recientemente Nidetzky<sup>88</sup> y colaboradores transformaron la GH lacto-N-biosidasa de *B. bifidum* en una glicosintasa mediante la mutación del residuo asistente D320E, obteniendo unos rendimientos de síntesis de LNT del 30 %.

### 1.4.3 Síntesis mediante ingeniería metabólica

En la última década la ingeniería metabólica se ha postulado como una prometedora vía alternativa para la síntesis de HMOs. Esta estrategia se basa en la utilización de células recombinantes las cuales sobre-expresaran los genes exógenos de GT y proteínas involucradas en la biosíntesis de los azúcares activados por nucleótidos necesarios. Con esta aproximación se pretende solventar ciertos problemas presentados por la síntesis enzimática como la expresión de GT, la disponibilidad de sustratos, así como solventar los efectos de inhibición que pueda originar a liberación de UDP.

Hasta la fecha se han logrado sintetizar 42 estructuras de HMO mediante la ingeniería metabólica<sup>20,89,90</sup>. Actualmente estos compuestos se producen en cultivos unicelulares siendo *E. coli* el principal microorganismo empleado, logrando producir HMOs comprendidos entre 3 y 10 monosacáridos. Dado que la lactosa es el aceptor por excelencia en la síntesis de HMOs, para asegurar que ésta no sea limitante durante el proceso se emplean las siguientes estrategias: i) suplementación del medio de cultivo con lactosa, ii) sobreexpresión del gen *lacY* el cual codifica para la permeasa responsable de la internalización de la lactosa, ii) delección de los genes *lacZ* y *lacA*, los cuales codifican para la  $\beta$ -galactosidasa y la tiogalactósido transacetilasa respectivamente, y finalmente iii) la utilización



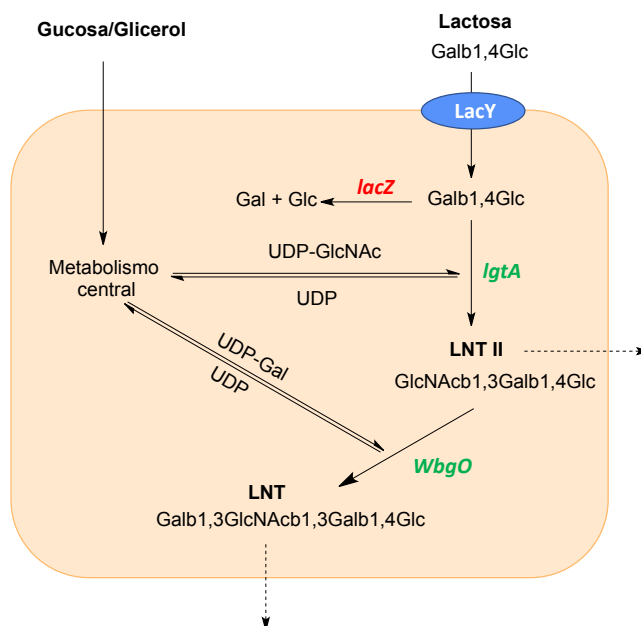
de fuentes de carbono alternativas para así asegurar que la lactosa no sea consumida y pueda ser transportada al citoplasma y empleada en la biosíntesis de HMOs.

En ingeniería metabólica se emplean generalmente GT que actúan dentro de la propia célula. Algunos de los sustratos activados requeridos por estas enzimas no se encuentran de manera natural en el citoplasma de *E. coli*, o bien son usados como precursores para la biosíntesis del peptidoglicano, lipopolisacáridos, etc. Por este motivo es necesario modular su disponibilidad mediante la sobreexpresión de las proteínas encargadas de sintetizar estos productos.

Por lo general con esta vía sintética se producen mezclas de HMOs, siendo éste un reto a solventar en el futuro. Otro aspecto en el cual se está poniendo gran esfuerzo, es en la utilización de microorganismos libres de plásmidos, para así evitar su pérdida y el uso de antibióticos y de esta manera producir estos compuestos mediante organismos GRAS<sup>91</sup>.

### 1.4.3.1 Ingeniería metabólica para la síntesis de LNT

La primera síntesis de LNT descrita mediante ingeniería metabólica fue propuesta por Baumgärtner<sup>92</sup> en 2014, logrando la obtención a gran escala de este compuesto con organismos libres de plásmidos **Figura 1. 17**. La estrategia seguida en este bioproceso consta de dos etapas, en primer lugar, la producción del compuesto LNT II el cuál será empleado como precursor para la síntesis de LNT. Para este proceso es esencial modificar el metabolismo de la lactosa presentado por la cepa *E. coli* K12 LJ110, eliminando el loci *lacZYA* (knock out) responsable de su metabolismo y acetilación. Con la finalidad de proporcionar de nuevo la capacidad de internalizar lactosa al microorganismo el gen *lacY* fue integrado mediante recombinación cromosómica. Para la creación de los nuevos enlaces O-glicosídicos deseados, los autores introdujeron mediante integración cromosómica los genes *lgtA* y *wbgO* codificantes para las GT *NmLgtA* (*lgtA*) y la *WbgO* ( $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa de *E. coli*).



**Figura 1. 17.** Síntesis *in vivo* de LNT II y LNT propuesta por Baumgärtner<sup>92</sup>.

En esta síntesis se emplean células de *E. coli* recombinantes, a las cuales se les han introducido cromosómicamente ciertas GT (IgtA, WbgO). Por otro lado, ha sido esencial la modificación del metabolismo de la lactosa, realizando la delación del gen *lacZA*. Las flechas discontinuas indican que mayoritariamente LNT y LNT II han sido identificados en el medio de cultivo.

En este proceso los sustratos requeridos por las GT (UDP-GlcNAc y UDP-Gal) van a ser producidos de manera endógena, permitiendo emplear fuentes de carbono económicas. Tras evaluar diversos sustratos, los mejores resultados de síntesis fueron obtenidos con Glc, sintetizando  $1.89 \pm 0.07$  g/L de LNT II y  $219 \pm 3$  mg/L de LNT. Mediante este proceso no se consiguió una conversión total de la lactosa a LNT siendo su precursor el compuesto mayoritario, sugiriendo que la reacción catalizada por WbgO podría ser la etapa limitante. Concretamente los autores propusieron que el precursor UDP-Gal podría ser el compuesto limitante en la reacción de WbgO. Para incrementar la concentración intracelular de este precursor testaron diferentes fuentes de carbono, concluyendo que con Gal obtenían mayor concentración de UDP-Gal y a su vez de LNT. Mediante un cultivo por fed-batch y empleando Gal como fuente de carbono lograron una total conversión de la lactosa, obteniendo una mezcla de LNT II ( $13.7 \pm 0.1$  g/L) y LNT ( $12.7 \pm 0.2$  g/L). Los análisis del medio de cultivo revelaron que el compuesto LNT II se encuentra principalmente en el medio extracelular hecho que limitaría la obtención de LNT, desconociéndose aún si existe un mecanismo de internalización de este compuesto<sup>93</sup>.

Debido al interés por producir estos compuestos en medios libres de antibióticos, Papadakis y colaboradores propusieron la síntesis de LNT mediante la inactivación cromosómica del gen *nadC* (gen involucrado en la ruta de biosíntesis de NAD desde L-aspartato) en diferentes cepas de *E. coli*.

Posteriormente el gen *nadC* fue clonado en un plásmido, con el que se transformaron las células con el metabolismo modificado. Esto permitió que las células crecieran en un medio carente de precursores nicotínicos, creando así un método de selección libre de antibióticos. Para la síntesis de LNT y LNT II los autores transformaron las cepas con la GT  $\beta$ 1,3-galactosiltransferasa (origen sin especificar)<sup>94</sup>.

## 1.5 Lacto-N-biosidasa

En el año 2005 fue descubierta en bifidobacteria una nueva ruta metabólica específica para GNB/LNB, proporcionando nuevos conocimientos sobre la degradación de HMOs. Esta ruta está constituida por 5 enzimas involucradas en la degradación y la captación de LNB y GNB, de las cuales cabe destacar la enzima lacto-N-biosidasa (Lnb). Esta enzima fue clasificada como una exo-GH, catalizando específicamente la hidrólisis de unidades de LNB de los extremos no reductores de los oligosacáridos. La enzima lacto-N-biosidasa (Lnb, EC 3.2.1.140) fue hallada por primera vez en suelos ricos en actinomicetos, concretamente en *Streptomyces* sp. 142<sup>95</sup>, desconociendo a día de hoy el papel que juega ésta en el metabolismo del microorganismo. Años más tarde, Wada descubrió el segundo gen de lacto-N-biosidasa (*lnb*) hallándolo en el organismo *Bifidobacterium bifidum* JCM1254<sup>96,97</sup> y en otras bifidobacterias.

La lacto-N-biosidasa de *Bifidobacterium bifidum* (LnbB) es una proteína extracelular asociada a membrada, sugiriendo que ésta puede jugar un papel esencial en la escisión del disacárido LNB presente en los HMOs. El gen codificante para esta proteína fue aislado y clonado permitiendo así la caracterización de la proteína recombinante, la cual fue cristalizada por primera vez en 2013 por el grupo de Fushinobu<sup>98</sup>. Ésta está constituida por 1112 aminoácidos, presentando el péptido señal en su extremo N-terminal y la secuencia de anclaje a membrana en el extremo C-terminal. Esta enzima está clasificada según la base de datos CAZy<sup>75</sup> en la familia GH20, ya que presenta su dominio característico en su secuencia génica. A parte de este dominio, también presenta el módulo de unión a carbohidratos de la familia 32, el dominio bacteriano Ig-like y una región transmembrana. El dominio catalítico junto con el dominio N-terminal se encuentran altamente conservados dentro de la familia GH20, aunque la función del dominio N-terminal es desconocida. A pesar de que el dominio C-terminal no se encuentra conservado en la familia GH20, éste es necesario para la estabilidad y la actividad de la enzima LnbB<sup>96,98,99</sup>.

### 1.5.1 La familia GH20

La familia GH20 está formada principalmente por N-acetil- $\beta$ -hexosaminidasas las cuales catalizan la hidrólisis de unidades de GlcNAc de los extremos no-reductores de oligosacáridos, glicoproteínas, glicolípidos, etc. A parte de estas enzimas, la familia GH20 también acoge la proteína lacto-N-biosidasa la cual cataliza la escisión del disacárido LNB de los extremos no reductores de los oligosacáridos. Dada la actividad de la enzima lacto-N-biosidasa, ésta requiere la existencia de dos subsitios negativos, siendo esto un particularidad dentro de las GH20 ya que las N-acetil- $\beta$ -hexosaminidasas únicamente presentan uno<sup>98</sup>.

Actualmente se han resuelto 26 estructuras proteicas de la familia GH20 las cuales presentan una organización de dominios muy diversa. La actividad catalítica de estas enzimas está relacionada con el dominio GH20, el cual puede estar acompañado de otros dominios de funcionalidades distintas: i) el dominio no catalítico GH20b, el cual se encuentra conservado en gran parte de las GH20 siendo su funcionalidad desconocida, ii) dominios lectina, iii) dominios de unión a carbohidratos y iv) otros dominios de función desconocida. Dada la gran diversidad estructural presentada por las GH20, el laboratorio de Bioquímica de IQS propuso su clasificación en base a su organización de dominios, clasificando estas enzimas en tipo A o tipo B. En el tipo A se engloban aquellas GHs que presentan como mínimo los dominios GH20-GH20b, presentando una arquitectura típica GH20-GH20b- $\alpha$ . Por otro lado, las GHs de tipo B únicamente presentan el domino catalítico GH20. Considerando esta organización la mayor parte de GH20 de estructura conocida se clasifican en el tipo A, grupo donde se encuentra la enzima lacto-N-biosidasa (**Figura 1. 18**)<sup>100</sup>.



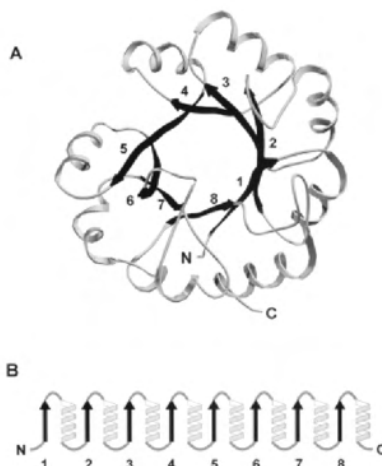
Model A						
Enzyme	Organism	Length (aa)	PDB	Domains <sup>1</sup>	GH20b-GH20- $\alpha$ location (aa)	
<b>Monomeric</b>						
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (SpHex)	<i>Streptomyces plicatus</i>	506	1HP5[A]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u>	19-494	
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (ScHex)	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	535	4C7G[A]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u>	11-511	
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (Hex1T)	<i>Paenibacillus</i> sp.	978	3GH5[A]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u> -Lectin-CBD	15-493	
Chitinase (SmCHB)	<i>Serratia marcescens</i>	885	1QBB[A]	<u>CHB HEX-GH20b-GH20-<math>\alpha</math>-CHB HEX C</u>	215-814	
Lacto-N-biosidase (LnbB)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1112	4JAW[A,B]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u> -Lectin-CBM32-Iglike	34-515	
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (NahA) *	<i>Arthrobacter aurescens</i>	540	3RCN[A]	<u>GH20b-GH20-</u>	5-506	
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase $\beta$ F3009) *	<i>Bacteroides fragilis</i>	518	4PYS[A,B]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u>	21-498	
<b>Heterodimeric</b>						
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (HexA)	<i>Homo sapiens</i>	529/556	2GK1 [A,B,C,D,E,F,G]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u>	$\alpha$ :23-510 $\beta$ :56-540	
<b>Homodimeric</b>						
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (HexB)	<i>Homo sapiens</i>	556/556	1NPO[A,B]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u>	56-540	
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (OfHex1)	<i>Ostrinia furnacalis</i>	593/593	3OZO[A]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math></u>	65-574	
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (GcnA)	<i>Streptococcus gordonii</i>	627/627	2EPN[A,B]	<u>GH20b-GH20-<math>\alpha</math>-Domain III</u>	2-414	
Model B						
Enzyme	Organism	Length (aa)	PDB	Domains <sup>1</sup>	GH20 domain location	
<b>Monomeric</b>						
$\beta$ -1,6-N-acetylglucosaminidase (DspB)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	361	1YHT[A]	<u>GH20</u>	20-342	
$\beta$ -N-acetylhexosaminidase (StrH)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	1312	3RPM[A,B]	<u>GH20-GH20-G5-G5</u>	190-538 635-972	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	1312	2YL8[A]	<u>GH20-GH20-G5-G5</u>	190-538 635-972	
			2YL9[A,B,C, D]	<u>GH20-GH20-G5-G5</u>	635-972	

Figura 1. 18. Organización por dominios de las GH20. Figura extraída Val-Cid *et. al* 2015<sup>100</sup>

El plegamiento del dominio catalítico GH20 está altamente conservado en esta familia el cual presenta una arquitectura típica ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (TIM-barrel) (Figura 1. 19). Este dominio estructural presenta 8 laminas  $\beta$  paralelas en su región más interior formando una estructura de barril, las cuáles están rodeadas por 8 hélices  $\alpha$ . Los residuos del centro activo de enzimas con esta arquitectura se encuentran ubicados en el extremo C-terminal de las laminas  $\beta$  y en los loops que conectan las laminas  $\beta$  con la hélice- $\alpha$  posterior<sup>101</sup>.



**Figura 1. 19** Arquitectura  $(\beta/\alpha)_8$  (TIM-barrel).

A) Plegamiento global seguido por la tipología  $\beta/\alpha)_8$  (TIM-barrel), donde se aprecia como las 8 láminas  $\beta$  se encuentran en el interior de la estructura confiriendo una forma de barril, rodeadas por las 8 hélices  $\alpha$ . B) Diagrama topológico de los 8 módulos  $(\beta\alpha)$ .<sup>101</sup>

La familia GH20 presenta un mecanismo catalítico asistido por sustrato, por lo que las enzimas de esta familia se caracterizarán por no tener el residuo nucleófilo catalítico.

### 1.5.2 Mecanismo catalítico de las GH20

A diferencia de las demás GH20 con actividad hexosaminidasa, LnbB presenta dos subsitios negativos necesarios para la unión de LNB. Este disacárido está constituido por los monómeros Gal y GlcNAc los cuales se unirán a los subsitios -1 y -2 respectivamente. Esta unión está propiciada gracias a la interacción de los aminoácidos circundantes con los grupos hidroxilos presentes en el sustrato.

Esta familia de enzimas actúa mediante un mecanismo asistido por el sustrato (**Figura 1. 9, C**) por lo que no presenta en su estructura el residuo nucleófilo catalítico. En este caso el ataque nucleofílico causante de la formación del intermedio de reacción será llevado a cabo por el grupo 2-acetamido presente en el sustrato (GlcNAc) (**Figura 1. 20**). En el caso de LnbB el grupo 2-acetamido será polarizado y orientado correctamente gracias a la acción del residuo Asp320 (residuo asistente). Este residuo situado en el subsitio -1 se encuentra conservado en todas las GH20, ocupando la posición contigua al residuo ácido/base general Glu321. Una vez el grupo 2-acetamido adopte su correcta posición, el átomo de oxígeno del grupo carbonilo realizará el ataque nucleófilo sobre el carbono anomérico, al mismo tiempo el residuo ácido general cederá un protón al oxígeno glicosídico produciéndose así la escisión del grupo hidroxilo, formando el intermedio de reacción oxazolona-ion oxazolinio. En la segunda etapa se producirá la hidrólisis del intermedio de reacción. La molécula de  $H_2O$  catalítica será

activada mediante la base general la cual será capaz de llevar a cabo el ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico manteniendo la configuración neta del sustrato.

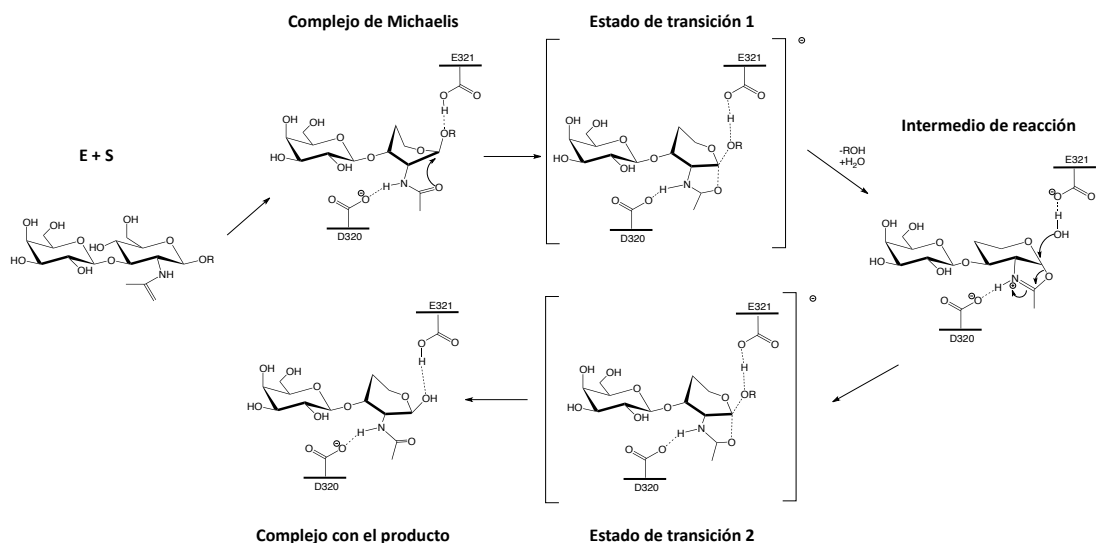


Figura 1. 20. Mecanismo catalítico asistido de LnbB.

## 1.6 Marco del proyecto

Actualmente se tienen claras evidencias de los beneficios que los HMOs proporcionan a los infantes a corto y largo plazo debido a sus propiedades bioactivas. Esta familia de compuestos está constituida por una gran diversidad de estructuras, siendo la leche humana rica en HMOs de tipo 1 debido a la abundancia del tetrasacárido LNT y sus derivados. Dada la complejidad estructural de estos compuestos no se ha hallado una vía sintética eficiente para su producción a gran escala, motivo por el cual las leches de fórmula únicamente contienen HMOs de estructuras simples como el 2'FL.

La síntesis enzimática es una atractiva estrategia sintética para la producción de oligosacáridos complejos ya que permite solventar ciertas problemáticas presentadas por la síntesis química, debido a la estéreo- y regio-selectividad de las enzimas. En particular en las últimas décadas se han reportado diversos ejemplos de cómo las GHs en modo transglucosidación son unos biocatalizadores eficientes para la síntesis de oligosacáridos.

La enzima lacto-N-biosidasa de *B. bifidum* está involucrada en la degradación de HMOs, siendo su actividad natural la hidrólisis del compuesto lacto-N-tetraosa dando lugar a los disacáridos lactosa y LNB mediante un mecanismo asistido por el sustrato. Debido a su actividad, el objetivo general de este

proyecto es el rediseño de esta GH, aplicando diversas estrategias de ingeniería de proteínas, para obtener un nuevo biocatalizador eficiente para la síntesis del tetrasacárido LNT.





## Objetivos

---



## Objetivos

Dados los importantes beneficios biológicos que los HMOs proporcionan a los infantes, existe un gran interés comercial en la obtención de estos compuestos. Dentro de este grupo de moléculas toma especial relevancia el tetrasacárido lacto-N-tetraosa (LNT), siendo éste y sus derivados fucosilados/sialilados los HMOs más abundantes en la leche humana. Ya que actualmente no existe una vía de producción eficiente a gran escala de este compuesto, en esta tesis se propone el rediseño de la enzima lacto-N-biosidasa de *B. bifidum* (LnbB).

Para lograr el objetivo general de esta tesis, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Rediseño de los subsitios negativos de la enzima LnbB con la finalidad de potenciar la actividad sintética de la enzima. El rediseño racional se realiza en base a la estructura cristalográfica de la proteína en presencia del inhibidor LNB-tiazolina. Seleccionados y creados los nuevos mutantes se caracterizarán sus actividades de hidrólisis y transglucosidación, también se determinarán los parámetros cinéticos de los mejores biocatalizadores.
2. Rediseño de los subsitios positivos de la enzima LnbB empleando la herramienta computacional BINDSCAN. Se seleccionarán y caracterizan las nuevas variantes de LnbB individualmente y en combinación con el mejor biocatalizador del subsitio negativo.
3. Exploración de la reacción secuencial one-pot para la obtención del compuesto LNT empleando las enzimas  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* BgaC y LnbB como catalizadores de la reacción glicosintasa. Concretamente se estudiará la reacción glicosintasa de la enzima BgaC para la síntesis del dador LNB-oxazolina.



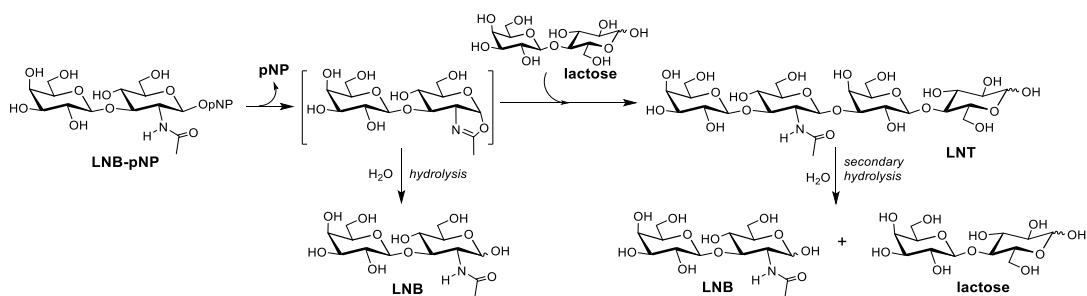
## Capítulo 2 Rediseño de los subsitios negativos de LnbB para la síntesis de LNT

---



La microbiota del tracto gastrointestinal de los lactantes alimentados con leche materna está formado principalmente por bifidobacterias, siendo una de las más abundantes *B. Bifidum*. Este microorganismo presenta la enzima lacto-N-biosidasa (LnbB), esencial en el metabolismo de los HMOs ya que cataliza la hidrólisis del tetrasacárido LNT. La enzima lacto-N-biosidasa esta clasificada según la base de datos CAZy (Carbohydrate Active enzymes) dentro de la familia GH20 presentando un mecanismo catalítico asistido por el sustrato, donde el grupo 2-acetamido de GlcNAc actúa como nucleófilo intermolecular, formando así, el intermedio de reacción oxazolina/ion oxazolonio. Una vez formado el intermedio de reacción dos clases de aceptores nucleofílicos podrán reaccionar con éste, compitiendo directamente uno con el otro. En el caso que éste sea atacado por una molécula de agua catalítica se producirá la reacción de hidrólisis, dando lugar al producto final de hidrólisis con una configuración de retención neta del centro anomérico<sup>87,98,102</sup> (**Figura 1. 11**). Por otro lado, si el intermedio reacciona con otro carbohidrato tendrá lugar la reacción TG (transglucosidación).

La enzima lacto-N-biosidasa no presenta la capacidad natural de sintetizar nuevos enlaces glicosídicos siendo su actividad principal la hidrólisis del compuesto LNT, generando los disacáridos LNB y lactosa. Dada la abundancia de la molécula LNT en la leche materna, ésta será la molécula objetivo de este trabajo. Para la síntesis del compuesto LNT, en este capítulo se propone su síntesis mediante la reacción de transglucosidación por control cinético empleando dadores glicosídicos activados. Concretamente el dador activado empleado en este proyecto es el disacárido LNB-pNP el cual podrá reaccionar con una molécula de H<sub>2</sub>O (reacción de hidrólisis), o bien con una molécula de lactosa, generando así el nuevo producto de transglucosidación. Cuando el intermedio de reacción reaccione con una molécula de agua, se producirá la escisión del grupo saliente (pNP) hidrolizando así el dador empleado. Por otro lado, si el intermedio reacciona con la lactosa se formará un nuevo enlace glicosídico dando lugar al producto de transglucosidación LNT. Una de las principales problemáticas de la reacción TG es la hidrólisis secundaria del producto sintetizado, ya que el compuesto LNT podrá ser a la vez hidrolizado por la enzima LnbB dando lugar a los disacáridos LNB y lactosa (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1.** Síntesis del tetrasacárido LNT mediante la reacción TG de la enzima LnbB.

Se presentan todas las posibles reacciones que puede realizar la enzima, hidrólisis del dador LNB-pNP (hidrólisis primaria), reacción TG (síntesis de LNT), hidrólisis del producto de TG (hidrólisis secundaria).



Anteriormente en el grupo de Bioquímica de IQS (Val-Cid 2016)<sup>103</sup> se estudió la capacidad transglicosídica de la enzima LnbB salvaje frente a los sustratos LNB-pNP y lactosa. Con el objetivo de potenciar la ratio TG/H se emplearon varias estrategias concluyendo que la enzima LnbB sintetiza el compuesto LNT con unos rendimientos muy bajos, siendo su concentración inferior al límite de detección analítico, resultados consistentes con los reportados en Wada *et al.*, 2008<sup>87</sup>.

Como se ha comentado anteriormente la actividad principal de la enzima LnbB es la hidrólisis, por lo que para sintetizar el compuesto LNT será necesario desfavorecer dicha actividad a la vez que se potencia la actividad TG de la enzima. La ingeniería de proteínas propone diversas estrategias para desbalancear la relación TG/H de las GH hacia la reacción TG, siendo las más populares i) la desestabilización del estado de transición mediante la incorporación de mutaciones en los subsitios negativos (dadores) de la enzima, ii) incrementar la afinidad enzima-aceptor introduciendo mutaciones en los subsitios positivos (aceptores) y iii) modificar el equilibrio hidrofílico/hidrofóbico del centro activo de la enzima para reducir la accesibilidad y/o reactividad del agua nucleofílica<sup>76,79,104</sup>. Con este fin, en este capítulo se propone el rediseño de los subsitios negativos de la enzima empleando una aproximación semi-racional. Para desbalancear la ratio TG/H hacia la reacción sintética, será necesario incrementar la barrera energética del primer estado de transición (hidrólisis, glicosidación), a la vez que disminuimos la barrera energética del segundo estado de transición (reacción TG, deglicosidación) (**Figura 1. 13** y **Figura 1. 15**). Concretamente mediante la introducción de mutaciones en los subsitios negativos se pretende desestabilizar el estado de transición de la enzima, reduciendo así su actividad hidrolítica nativa<sup>105</sup>.

En este capítulo se realizará el rediseño de los subsitios negativos de la enzima LnbB focalizando la atención en aquellos aminoácidos capaces de interactuar con la molécula LNB-pNP (dador), ya que su sustitución podría causar la desestabilización del estado de transición pudiendo influir positivamente en la reacción TG. Empleando diferentes técnicas de ingeniería de proteínas se generarán diversos mutantes de la enzima LnbB de los cuales se caracterizará su actividad hidrolítica y TG con la finalidad de identificar un biocatalizador prometedor para la síntesis de LNT.

## 2.1 Antecedentes

Anteriormente en el grupo de Bioquímica se estudió el uso de la enzima LnbB como potencial biocatalizador para la síntesis de LNT. Esta enzima se engloba en la ruta metabólica LNB/GNB siendo responsable de la hidrólisis del compuesto lacto-N-tetraosa, dando lugar a los disacáridos lactosa y LNB. La enzima LnbB presenta una elevada especificidad de sustrato ya que no hidroliza las formas fucosiladas o sialiladas del LNT, ni el tetrasacárido LNnT, hidrolizando exclusivamente el compuesto

LNB del extremo no reductor de los oligosacáridos no decorados de tipo 1. Dadas las relevantes características de LnbB, ésta fue seleccionada para ser explorada como potencial biocatalizador para la síntesis de HMOs.

Debido a la ineficiente capacidad de síntesis de la enzima nativa, se pensaron diferentes estrategias para potenciar su actividad sintética (control cinético, termodinámico y glicosintasa). En el laboratorio de Bioquímica, ya en la tesis de Val-Cid 2016<sup>103</sup> se exploraron dos estrategias basadas en el diseño racional de la enzima LnbB: i) incrementar la reacción de transglicosidación de la enzima mediante la generación de nuevas mutaciones las cuales pudiesen favorecer la unión de la lactosa y/o desfavorecer la reacción de hidrólisis, ii) y la exploración de la estrategia glicosintasa, en la cual se modificó el residuo asistente de la enzima LnbB. En esta tesis, se exploró de forma extensiva la estrategia de transglicosidación ya que se considera que el sustrato utilizado (p-nitrofenil lacto-N-bióido, LNB-pNP) es estable, permitiendo así la escalabilidad de la reacción.

Para evaluar el efecto de las mutaciones introducidas sobre las actividades de la enzima LnbB, se caracterizó la actividad específica de hidrólisis ( $SA_H$ ) y la actividad sintética ya sea vía TG o glicosintasa de las diferentes variantes generadas; los resultados de las cuales se muestran en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1.** Caracterización de la actividad hidrolítica y la actividad TG/glicosintasa de los mutantes de LnbB relazados en (Val-Cid 2016)<sup>103</sup>, empleando como dadores LNB-pNP (estrategia TG) y LNB-oxazolina (estrategia glicosintasa).

Mutación	Estrategia	$SA_H$ ( $s^{-1}$ ) <sup>1</sup>	Rendimiento máx. LNT (%)
WT	TG	31	n.d
D320A*	Glicosintasa	0.01	--
D320E	TG	0.24	3.3
E321A**	--	0.8	--
Y419F	TG	0.23	1.8

\*Residuo asistente, \*\*Residuo ácido/base general. <sup>1</sup> $SA_H$ : actividad hidrolítica específica. Condiciones hidrólisis: 250 $\mu$ M LNB-pNP, tampón 50 mM citrato/ 50 mM fosfato pH 4.5, 30°C. Condiciones TG: 2.5 mM LNB-pNP, 250 mM lactosa, 500 nM LnbB, 50 mM citrato/ 50 mM fosfato con 15% (v/v) DMSO pH 4.5, 30°C. Condiciones Glicosintasa: 1 mM LNB-oxazolina, 2 mM Lactosa-pNP, 1  $\mu$ M LnbB, 50 mM citrato/ 50 mM fosfato pH 4.5, 30°C. n.d: no detectado.

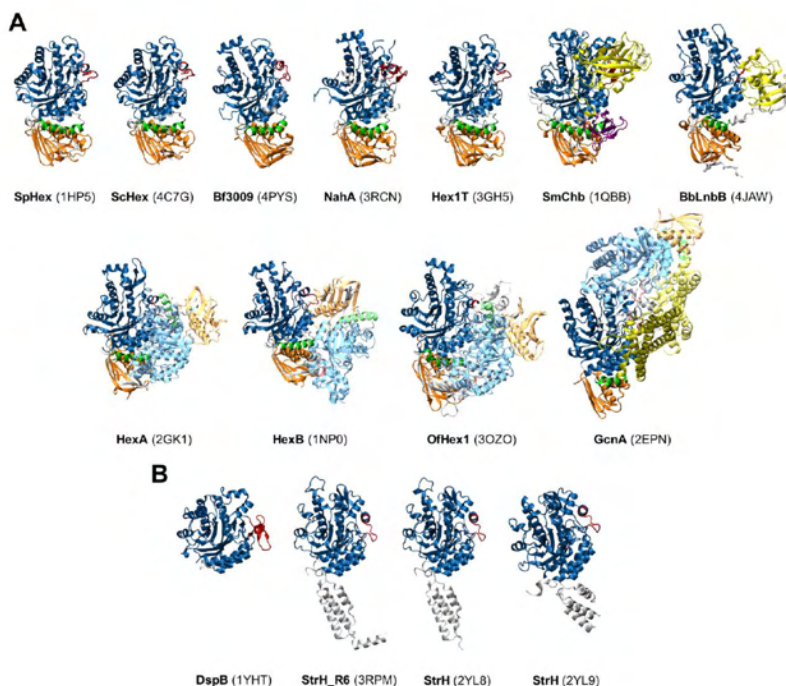
En esta tesis se propone la síntesis del compuesto LNT mediante la reacción de transglicosidación, estrategia anteriormente empleada en Val-Cid 2016<sup>103</sup> con los mutantes D320E y Y419F, ya que mediante esta estrategia se han obtenido los mejores resultados de síntesis de LNT.

La Tyr419 se encuentra localizada en el límite del subsitio -1 colindante a los subsitios positivos de la enzima. Mediante la mutación Y419F se está incrementando la hidrofobicidad de la región, efecto que

podría mejorar la unión enzima-aceptor (lactosa), potenciando así, los rendimientos de LNT. Dada su localización, y los rendimientos de LNT presentados se ha considerado interesante ampliar el estudio de esta variante, como se podrá observar a lo largo de este capítulo.

## 2.2 Selección de los nuevo mutantes de LnbB

La familia GH20 esta formada por  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas de origen eucariota y procariota, mostrando diferentes especificidades de sustrato, organizaciones estructurales, etc. La actividad catalítica de esta familia de enzimas está estrechamente relacionada con su dominio GH20, el cual presenta el plegamiento típico  $(\beta/\alpha)_8$  (TIM-barrel). En su gran mayoría, estas enzimas están acompañadas de diversos dominios con diferentes funcionalidades: i) el dominio GH20b, no catalítico, se encuentra conservado en gran parte de las enzimas de la familia GH20, siendo su funcionalidad actualmente desconocida, ii) dominios lectina, ii) de unión a carbohidratos, además de otros dominios de los cuales se desconoce su función. Debido a la gran diversidad estructural de las proteínas englobadas en la familia GH20, el grupo de Bioquímica de IQS<sup>100</sup> desarrolló una nueva subclasificación en función de los dominios dividiendo las GH20 en tipo A y tipo B (**Figura 1. 18** y **Figura 2. 2**). Las GH tipo A se caracterizan por presentar en su estructura el dominio GH20 acompañado como mínimo del dominio GH20b en su extremo N-terminal, presentando la arquitectura GH20b-GH20- $\alpha$ -hélix; mientras que las GH20 tipo B únicamente presentan el dominio catalítico GH20. Como se muestra en la **Figura 2.3** la enzima LnbB presenta una arquitectura compleja formada por dominios con diferentes funciones, clasificando dicha proteína en la familia A de las GH20.



**Figura 2. 2.** Organización estructural de las GH20 presentada en Val-Cid 2016<sup>100,103</sup>.

A) Estructura de las GHs 20 tipo A, B) Estructuras de las GH20 tipo B. El dominio GH20b se muestra coloreado en color naranja, el dominio GH20 en color azul, la  $\alpha$ -hélix en verde, el loop 2 en rojo y el resto de los dominios en amarillo y lila. Las proteínas dinméricas siguen el mismo esquema de colores mostrando uno de los dímeros en menor intensidad.

La proteína LnbB está formada por 1112 aminoácidos, dadas sus dimensiones y complejidad estructural varios grupos de investigación focalizaron su atención en la identificación de su estructura mínima, determinando que LnbB necesita como mínimo la organización GH20b-GH20- $\alpha$ -lectina para conservar su capacidad catalítica<sup>98,100</sup>. En Val-Cid 2016<sup>103</sup> se identificó la importancia del dominio lectina ya que esta región alberga el llamado “*remote element*” (Figura 2. 10). Este elemento constituido por 9 aminoácidos [Gly570-Thr578] presenta una conformación beta-turn siendo éste importante para la actividad catalítica de la enzima, ya que interaccionará con el dominio GH20, complementado y definiendo la cavidad de unión del sustrato. Dada la relevancia de este dominio su modificación podría causar efectos en la actividad enzimática, llegando incluso a causar la inactivación de la enzima<sup>100</sup>.

**N-terminal**

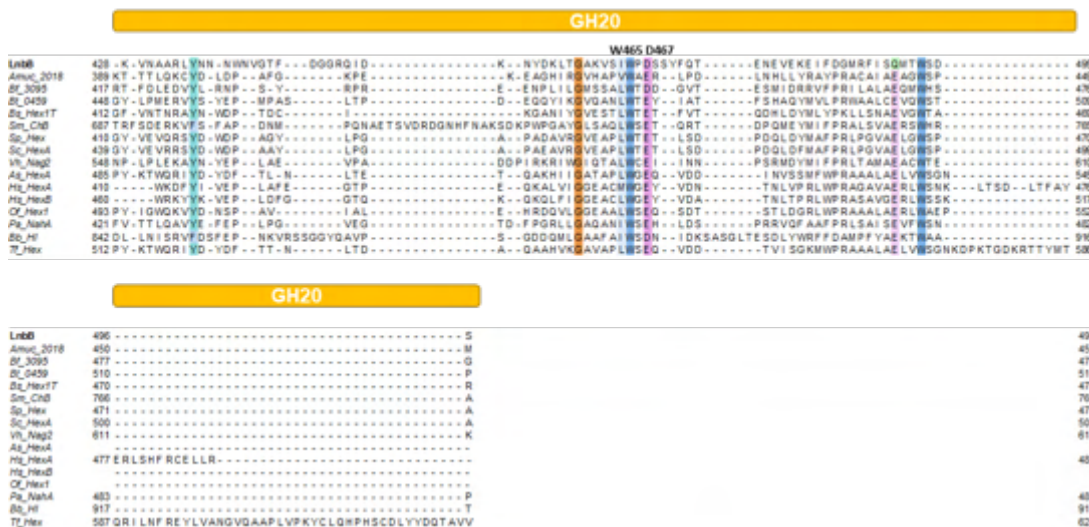
**C-terminal**



**Figura 2.3.** Organización estructural propuesta para la enzima LnbB. Ésta presenta los dominios GH20b, GH20,  $\alpha$ -hélix, lectin, CBM 32 y el dominio Ig like.

Actualmente existen más de 10000 entradas para las GH20 en la base de datos CAZy. Debido a la gran cantidad de proteínas presentes en esta familia, para el estudio estructural de la enzima LnbB únicamente se consideraron aquellas enzimas con su misma organización estructural, es decir GH20 tipo A y con estructura cristalográfica resuelta obteniendo un total de 16 secuencias proteicas. Con la finalidad de realizar el estudio de conservación del centro activo de la enzima LnbB se realizaron alineamientos de secuencia con las 16 proteínas seleccionadas (**Figura 2.4**), delimitando la región de estudio a los dominios GH20 y GH20b.



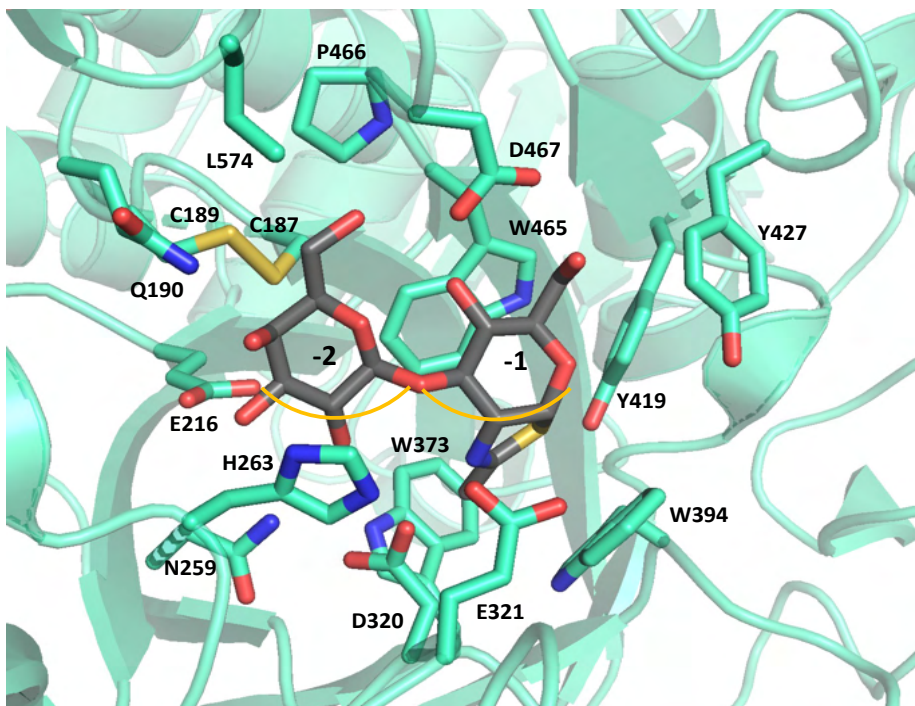


**Figura 2.4.** Alineamiento de secuencia de las GH20, con topología estructural tipoA de los dominios GH20 y GH20b. Secuencias escogidas: Amuc2019 (β-N-acetilhexosaminidasa de *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835, B2UP57), As\_HexA (β-N-N-acetilhexosaminidasa de *Aspergillus oryzae* CCF 1066, Q8J2T0), Bb\_HI (β-N-acetilhexosaminidasa de *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254, D4QAP4), Bf\_3095 (β-N-acetilhexosaminidasa de *Bacteroides fragilis*, Q5LAT3), Bs\_Hex1T (β-hexosaminidasa de *Penicillium* Sp. TS12, D2KW09), Bt\_0459 (β-N-acetilhexosaminidasa de *Bacteroides thetaiotamicron* VPI-5482, Q8AAK5), Hs\_HexA (β-hexosaminidasa A de *Homo Sapiens*, P06865), Hs\_HexB (β-hexosaminidasa B de *Homo Sapiens*, P07686), LnbB (lacto-N-biosidasa de *Bifidobacterium bifidum* JCM 1254, B3TLD6), Of\_Hex1 (β-N-acetilhexosaminidasa de *Ostrinia furnacalis*, Q06GJ0), Pa\_NahA (β-N-acetilhexosaminidasa de *Paenarthrobacter aurescensc* TC1, A1RBZ5), Sc\_HexA (β-N-acetilhexosaminidasa de *Streptomyces coelicolor* A3(2), Q9L068), Sm\_ChB (quitobiosa de *Serratia marcescens* 2170, Q54468), Sp\_Hex (β-N-acetilglucosaminidasa de *Streptomyces plicatus*, O85361), Tf\_Hex (β-N-N-acetilhexosaminidasa de *Talaromyces flavus*, AEQ33603.1), Vh\_Nag2 (β-N-acetilglucosaminidasa e de *Vibrio harveyi* 650, D9ISE0). El alineamiento fue realizado mediante el método TcoffeeWS. Las posiciones conservadas se colorean de acuerdo con los parámetros de Clustal.

Tras realizar el alineamiento de secuencia se identificaron 17 residuos totalmente conservados dentro de la familia: Gly149, Pro177, Arg182, Asn211, Glu257, Pro261, His263, Glu305, Gly318, Asp320, Glu321, Trp373, Trp394, Tyr419, Gly459, Trp465, Trp493; encontrando entre ellos el residuo asistente Asp320, el residuo ácido/base Glu321, y la plataforma hidrofóbica formada por los Trp373, Trp394 y Trp465.

Con la finalidad de desestabilizar el intermedio de reacción y la unión enzima-dador será necesario determinar qué residuos interactúan directamente con dicha molécula, realizando los estudios estructurales con la estructura cristalográfica de LnbB (PDB: 4JAW) en complejo con LNB-tiazolina (inhibidor de la enzima)<sup>98</sup>. Para identificar los aminoácidos que pudiesen presentar interacciones con dicho ligando, se centró la atención en aquellos residuos situados en una región cercana al sustrato, limitando esta región a aquellos átomos situados hasta 4 Å de LNB-tiazolina **Figura 2. 5**.



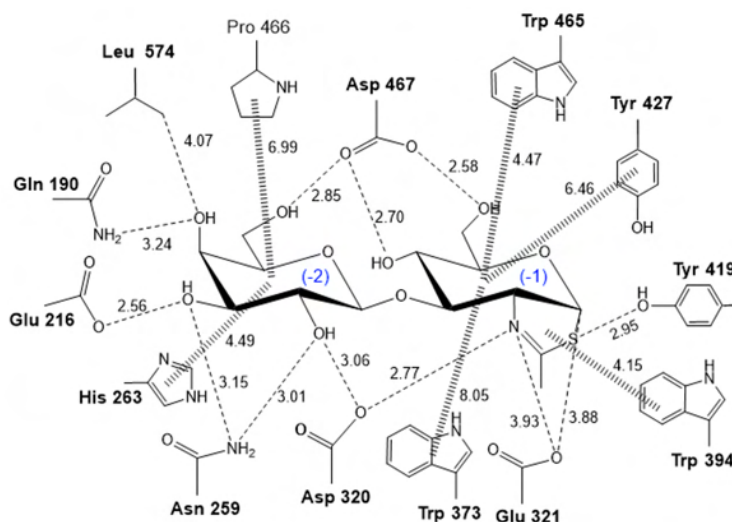


**Figura 2. 5.** Representación de la estructura cristalográfica de LnbB of *B. bifidum* en complejo con el inhibidor LNB-tiazolina (PDB: 4JAW). En ésta se muestran los residuos localizados en la *first shell* de los subsitios negativos situados hasta 4 Å del ligando.

Mediante el análisis estructural se identificaron 16 residuos situados en la zona delimitada (Cys187, Cys189, Gln190, Glu216, Asn259, His263, Asp320, Glu321, Trp373, Trp394, Tyr419, Tyr427, Trp465, Pro466, Asp467 y Leu574) de los cuales únicamente 6 se encuentran conservados en el alineamiento de secuencia realizado (His263, Asp320, Glu321, Trp373, Trp394, Tyr419, Trp465).

Identificados los residuos con átomos localizados a una distancia de hasta 4 Å del ligando se estudiaron las posibles interacciones que éstos pudiesen establecer con el sustrato. Estos residuos serán reemplazados por aminoácidos los cuales permitan eliminar ciertas interacciones establecidas entre la enzima y el dador con la finalidad de reducir dicha afinidad y desestabilizar el intermedio de reacción, lo cuál podría causar un desbalanceo de la ratio TG/H hacia la reacción TG. Para este estudio se consideraron los posibles puentes de hidrógeno establecidos entre los diferentes hidroxilos del carbohidrato y los aminoácidos colindantes a éste, así como las interacciones hidrofóbicas presentes entre el ligando y los residuos aromáticos, distancias determinadas entre los centros de masas de los anillos del aminoácido y del azúcar **Figura 2. 6.**





**Figura 2. 6.** Mapa de interacciones de los subsitios negativos de la enzima LnbB. Se muestran los aminoácidos con átomos localizados hasta 4 Å del ligando y las posibles interacciones entre ellos. La determinación de las distancias de enlace se realiza en base a la estructura cristalográfica 4JAW.

## 2.2.1 Residuos catalíticos

Como ya se ha mencionado anteriormente la familia GH20 presenta una catálisis asistida por sustrato presentando como residuos catalíticos los aminoácidos Asp (Asp321 para LnbB, residuo asistente) y Glu (Glu320 para LnbB, residuo ácido-base) ambos localizados en el subsitio -1. El residuo asistente (Asp) es el encargado de propiciar el correcto posicionamiento del grupo 2-acetamido para que éste pueda realizar el ataque nucleofílico, gracias al puente de hidrógeno formado entre el hidroxilo del residuo y el N del grupo N-actilo del sustrato (**Figura 2. 6**). Otra función relevante del residuo asistente es la polarización del grupo N-acetilo de GlcNAc mediante la creación de una red dinámica de puentes de hidrógeno asistentes durante la catálisis.

El residuo ácido/base también desempeña importantes funciones durante la catálisis, ya que a parte de activar la molécula aceptora promoviendo así el ataque nucleofílico, interactuará con el O1 de GlcNAc en la primera etapa del mecanismo de reacción. Dicha interacción no se muestra en la **Figura 2. 6** ya que en ella se presenta el mapa de interacciones con el inhibidor LNB-tiazolina.

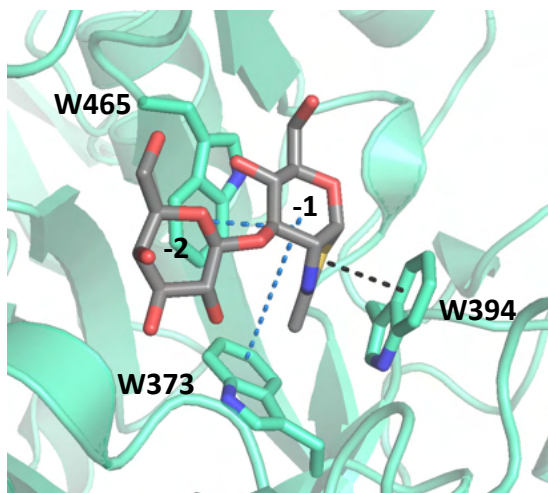
Dada la relevancia del residuo asistente y el residuo ácido/base en la catálisis enzimática, estos fueron mutados en trabajos previos (Val-Cid 2016)<sup>33</sup> para su potencial uso como biocatalizadores para la síntesis de LNT. Dada la gran experiencia que tiene el grupo de Bioquímica de IQS en la estrategia glicosintasa, se testó la mutación D320A obteniendo una significativa disminución de la actividad hidrolítica respecto la enzima salvaje, sin embargo no fue posible el estudio de la reacción glicosintasa.

Para potenciar la actividad TG de la enzima LnbB en Val-Cid 2016<sup>103</sup> se exploró la mutación D320E, ya que, mediante la introducción de una cadena igualmente electronegativa, pero de mayor longitud se podría favorecer la interacción entre el residuo asistente y el anillo oxazolina. Como se observa en **Tabla 2.1** esta mutación dio lugar a una disminución del carácter hidrolítico de la enzima LnbB, permitiendo sintetizar el tetrasacárido LNT en un rendimiento del 3.3%, siendo este el mejor biocatalizador de LNT identificado en Val-Cid 2016<sup>103</sup>.

## 2.2.2 Plataforma hidrofóbica (Trp373, Trp394 y Trp465 de LnbB)

Las enzimas de la familia GH20 presentan una plataforma hidrofóbica altamente conservada localizada en el subsitio -1 del centro activo de la enzima (Trp373, Trp394 y Trp465 para LnbB). Tal como se ve en la **Figura 2.7**, los Trp373 y Trp465 de LnbB interactúan con el anillo de GlcNAc mediante interacciones hidrofóbicas, participando en la unión y posicionamiento del sustrato. Por otro lado, el Trp394 debido a su posicionamiento perpendicular al anillo de GlcNAc interactúa con el anillo oxazolina mediante interacción catión- $\pi$ . Este residuo se encuentra cercano a C1 y C2 participando en la estabilización del intermedio de reacción oxazolina/oxazolonio.

Con el fin de desestabilizar las interacciones entre la enzima y el dador y dada la relevancia de los Trp373, Trp394 y Trp465 en la unión del sustrato y estabilización del intermedio de reacción, estos aminoácidos fueron seleccionados para ser mutados. Para reducir la hidrofobicidad de la plataforma hidrofóbica, y así perturbar sutilmente la unión enzima-sustrato, se propone la mutación de los Trp373 y 465 a fenilalanina. Por otro lado, para desestabilizar el intermedio de reacción se propone la mutación del Trp394 a fenilalanina ya que con esta modificación se reducirá la hidrofobicidad del aminoácido y su tamaño, eliminando así la interacción catión- $\pi$ .



**Figura 2.7.** Representación de las interacciones presentes entre la unidad de GlcNAc de LNB con los Trp373, Trp394 y Trp465 de LnbB. En azul se representan las interacciones de apilamiento y en negro las interacciones catión- $\pi$ .

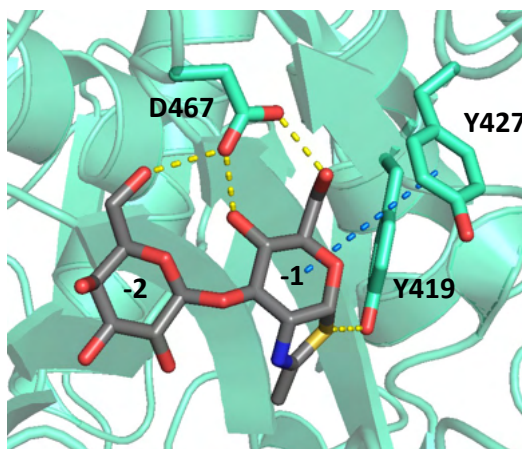
### 2.2.3 Tyr419 de LnbB

La Tyr419 de LnbB se encuentra conservada dentro de la familia GH20, al igual que en otras GH con catálisis asistida por el sustrato (GH18, GH85). Este residuo localizado en el subsitio -1 participa en la estabilización del intermedio oxazolina, ya que el grupo hidroxilo presente en la cadena lateral del aminoácido interacciona mediante puente de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo del grupo 2-acetamido de GlcNAc (**Figura 2.8**).

Dado su interesante posicionamiento, este aminoácido captó la atención de Ito y colaboradores, los cuales propusieron la mutación Y419F de LnbB<sup>98</sup>. Tras estudiar la actividad hidrolítica de dicha variante frente al sustrato LNB-pNP los autores reportaron una disminución de los valores de  $k_{cat}$  y  $K_M$  respecto a los determinados para la enzima salvaje, corroborando así la importancia de este aminoácido en la catálisis. Gracias a los interesantes resultados reportados para esta mutación, en Val-Cid 2016<sup>103</sup> se testó el biocatalizador LnbB Y419F para la síntesis de LNT, estudiando así la actividad TG de la nueva variante. Mediante dicha mutación se está incorporando un aminoácido de mayor hidrofobicidad, sustitución que podría favorecer la unión del aceptor, hecho que podría repercutir favorablemente en la reacción TG. Como se aprecia en la **Tabla 2.1** aunque esta nueva variante presenta una baja actividad hidrolítica, únicamente sintetiza LNT en unos rendimientos inferiores al 2%.

### 2.2.4 Tyr427 de LnbB

Todo y no estar conservada dentro de la familia GH20, la posición Tyr427 fue seleccionada como posición de interés debido a su cercanía a la molécula dadora. Como se observa en la **Figura 2.6** y la **Figura 2.8** este residuo se localiza en el subsitio -1 de la enzima interaccionando hidrofóbicamente con el anillo de GlcNAc. Con la finalidad de dificultar el modo de unión de la molécula dadora, se propone la mutación de este residuo por uno de menor volumen, pero igualmente hidrofóbico (Phe).



**Figura 2.8.** Representación de las interacciones entre la unidad de GlcNAc de LNB con los aminoácidos Asp467, Tyr427 y Tyr419. En azul se representan las interacciones de apilamiento y en amarillo las interacciones por puente de hidrógeno.

### 2.2.5 Asp467 de LnbB

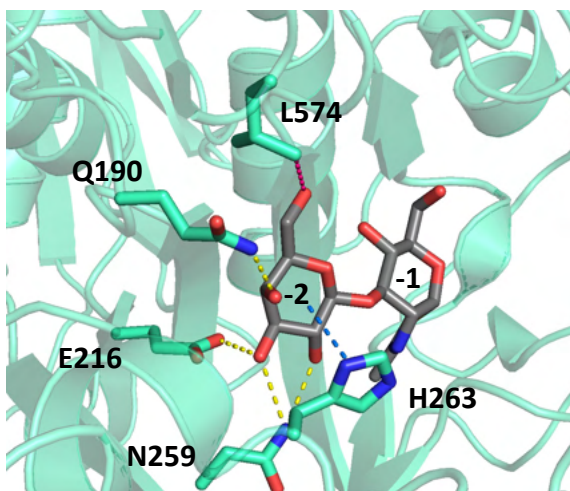
Este residuo conservado se encuentra situado entre los subsitios -1 y -2 de LnbB, formando puente de hidrógeno bidentado con los O5 y O6 de los hidroxilos de GlcNAc. Debido a su posicionamiento este residuo también está involucrado en la unión de Gal, interaccionando mediante puente de hidrógeno con el O6 del hidroxilo del monosacárido (**Figura 2.8**).

Dadas las interacciones que el residuo Asp467 de LnbB establece con los diferentes monosacáridos del dador, esta posición podría jugar un papel importante en el posicionamiento y la unión de LNB. Por este motivo ha sido seleccionado como una de las posiciones a estudiar, proponiendo las mutaciones D467A y D467E (numeración de LnbB). Con la modificación de este residuo a alanina se pretende eliminar cualquier interacción entre este residuo y el sustrato, con el fin de desestabilizar la unión enzima-LNB. Por otro lado, con la sustitución a Glu, se incorpora en la región una cadena lateral de mayor longitud hecho que podría desfavorecer el modo de unión del dador.

### 2.2.6 Residuos del sub sitio -2

La enzima LnbB a diferencia de los otros miembros de las GH20, presenta la particularidad de albergar dos subsitios negativos en su centro catalítico. Los residuos identificados en la región cercana al sustrato del sub sitio -2 no se encuentran conservados en la familia, como es de esperar, a excepción de la His263. Este hecho podría explicarse debido a la localización de este aminoácido, ya que la His263 se encuentra posicionada entre los subsitios -1 y -2 de la enzima como puede observarse en la estructura cristalográfica (**Figura 2. 5**). Debido a la interacción de apilamiento con el anillo de Gal, y a su posible influencia en el posicionamiento del residuo asistente catalítico, se han propuesto las mutaciones H263R y H263A. Con la mutación de este residuo a alanina se pretende eliminar cualquier efecto que la His263 pueda ocasionar. Por el contrario, con la mutación a arginina se incorporará una cadena con carga positiva en el centro activo de la enzima, pudiendo perturbar el modo de unión de la galactosa a la vez que se elimina la interacción hidrofóbica con ésta.

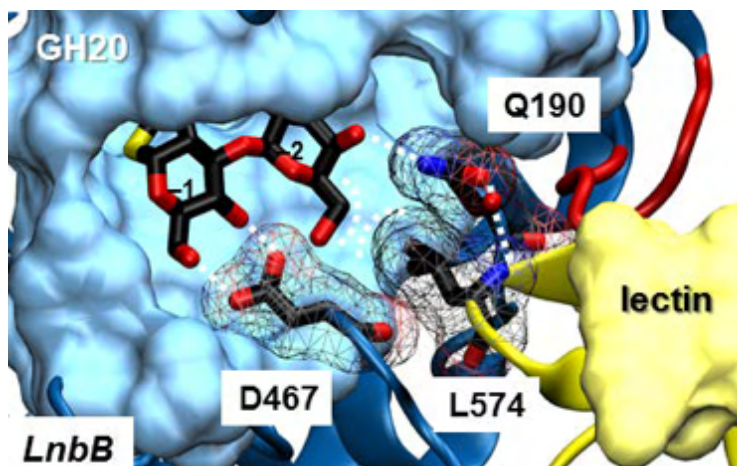
En esta región de la enzima LnbB también se encuentra la Pro466, dado el papel de las prolinas en la estructura y plegamiento de las proteínas esta posición no será modificada. Esta región, además, alberga 4 residuos no conservados (Gln190, Glu216, Asn259 y Leu574 numeración para LnbB) los cuales merecerán especial atención. Estos residuos podrían tener un papel importante en el acomodamiento de la galactosa mediante la creación de una red de puentes de hidrógeno con el carbohidrato. La cadena lateral de Gln190 interacciona mediante puente de hidrógeno con el O4 del hidroxilo de Gal. Con el fin de estudiar el papel de este residuo, se han propuesto las mutaciones Q190L y Q190H. Con la introducción de un aminoácido apolar (Leu) se eliminará el puente de hidrógeno establecido entre Gln190 y el sustrato, desfavoreciendo la unión enzima-dador. Por otro lado, mediante la mutación Q190H se incorporará un aminoácido con carga positiva en la región, efecto que podría repercutir en las interacciones enzima-sustrato.



**Figura 2. 9.** Representación de las interacciones presentes entre los aminoácidos localizados en el subsitio -2 con la Gal de LNB. En azul se representan las interacciones de apilamiento, en amarillo las interacciones por puente de hidrógeno y en rojo las interacciones hidrofóbicas.

Los residuos Glu216 y Asn259 de LnbB están directamente involucrados en la unión de la galactosa mediante la formación puentes de hidrógeno entre los aminoácidos y el carbohidrato (**Figura 2. 9**). Para eliminar estas interacciones se han propuesto las mutaciones E216A, E216D, N259A y N259Q. Con los mutantes a alanina se pretende eliminar cualquier posible interacción entre el residuo y el azúcar disminuyendo la unión entre la enzima y el sustrato. Con la modificación E216D, no se está alterando la naturaleza del aminoácido, sino que se está reduciendo la longitud de la cadena, dificultando así, la creación del puente de hidrógeno. Por otro lado, con la mutación N259Q se incorporará un aminoácido con una cadena lateral más larga, hecho que podría perturbar la unión del monosacárido.

El residuo Leu574 merece un trato especial, pues se encuentra localizado en el dominio lectina, concretamente en el elemento “*remote element*” (**Figura 2. 10**). Esta región formada por los residuos 570-578 presenta una estructura de hoja beta, la cual complementa la cavidad de unión del sustrato. La cadena lateral de la Leu574 podría interactuar hidrofóticamente con la galactosa del sustrato, estando así involucrado en la unión del dador LNB como se muestra en el **Figura 2. 6**. Debido a su localización este residuo podría interactuar con los residuos Gln190 y Asp467 siendo éstas relevantes para la interacción y complementación del elemento y el centro activo de la enzima<sup>100</sup>. Para desestabilizar la posible interacción entre el residuo y el sustrato se propone la mutación L574V, aunque con esta sustitución no se está alterando la naturaleza apolar del aminoácido original, la incorporación de un aminoácido de menor longitud disminuirá el carácter hidrofóbico de esta posición, pudiendo reducir así la capacidad de interactuar con el carbohidrato.



**Figura 2. 10.** Dominio lectina de LnbB.

En amarillo se muestra el dominio lectina (elemento complementario a la cavidad de unión). En la imagen también se muestran los residuos involucrados en la unión del dominio lectina y el centro activo de LnbB. Figura extraída de Val-Cid 2015<sup>100</sup>.

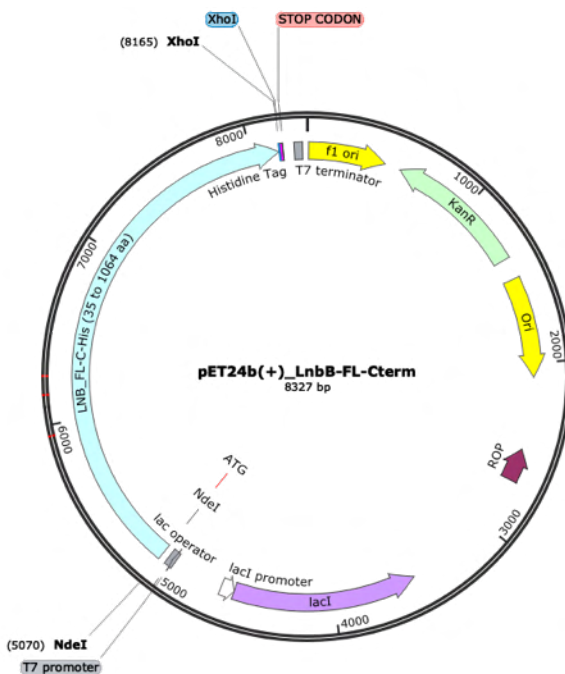
Realizado el estudio de los subsitios negativos, se proponen 16 variantes para LnbB. A modo de resumen en la **Tabla 2.2** se recopilan las posiciones seleccionadas, su localización y las mutaciones propuestas.

**Tabla 2.2** Recopilación de las variantes propuestas para LnbB. En la tabla se indicia el residuo, su localización y las mutaciones propuestas.

Residuo	Subsitio	Mutación
Trp373	-1	Phe
Trp394	-1	Phe
Tyr419	-1	Phe
Tyr427	-1	Phe
Trp465	-1	Phe
Gln190	-2	Leu, His
Glu216	-2	Ala, Glu
Asn259	-2	Ala, Gln
His263	-2	Ala, Arg
Asp467	-1,-2	Ala, Glu
Leu574	-2	Val
Asp320	-1	Ala, Glu
Glu321	-1	Ala
Tyr419	-1	Phe

## 2.3 Clonaje, expresión y purificación de los mutantes seleccionados

Para la realización de los mutantes se empleó el ADN molde pET24b(+)-LnbB-FL-Cterm en el cual se encuentra clonada la proteína LnbB con una cola de histidinas en su extremo C-terminal. Los mutantes se han obtenido mediante el método de mutagénesis dirigida (SDM) Quik Change PCR (QC-PCR), diseñando para cada mutación una pareja de cebadores directo (Fw) y reverso (Rv). Concretamente cada pareja de cebadores contiene una región no solapante localizada en su extremo 3' y una región complementaria (cebador-cebador) en su extremo 5', incorporando en su centro los nucleótidos correspondientes a la mutación (5.1.1 de la sección Materiales y métodos). La confirmación de las mutaciones se realizó mediante secuenciación de ADN por el método de Sanger, transformando las células de *E. coli* BL21(DE3)star con los diferentes plásmidos para la expresión y purificación de los mutantes recombinantes.



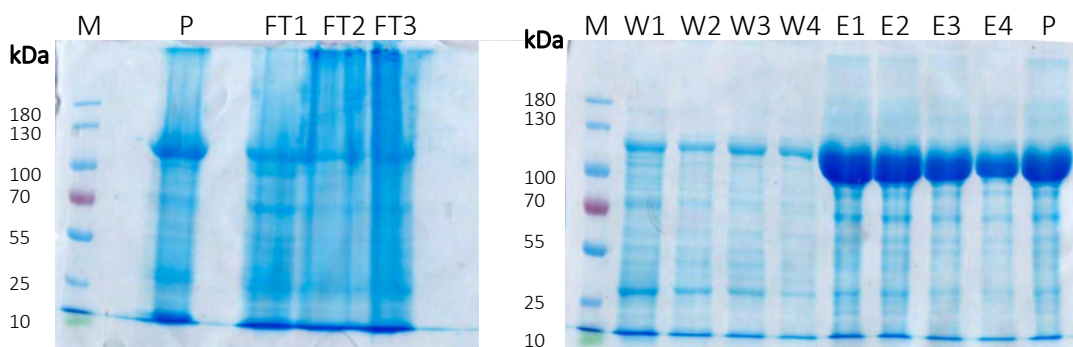
**Figura 2. 11.** Mapa del constructo pET24b(+) con el gen codificante para la proteína LnbB-FL-Cterm bajo el promotor T7.

El vector pET24b(+) es un plásmido de expresión de proteínas cuya regulación se basa en el promotor del bacteriófago T7. La cepa de *E. coli* BL21(DE3)star contiene una copia cromosómica de la polimerasa T7 bajo el control del operador lac; en presencia de inductor se producirá la polimerasa la cual reconocerá el promotor T7 presente en el vector expresando el gen de la proteína clonada. El inductor más empleado para este sistema de expresión es el compuesto IPTG, molécula análoga a la lactosa. Sin embargo, existen alternativas a este método, como los medios de autoinducción los cuales permiten



el crecimiento bacteriano, así como la expresión proteica<sup>106</sup>. La expresión de la enzima LnbB mediante el método de autoinducción ya había sido empleado exitosamente en trabajos previos en el laboratorio (Val-Cid 2016<sup>103</sup>). Para la realización del medio de autoinducción se utiliza una base de medio LB suplementado con sales y azúcares (glucosa, glicerol y lactosa). En las primeras etapas del crecimiento celular la glucosa será empleada como principal fuente de carbono permitiendo que la expresión de la proteína esté inhibida, y así todo el metabolismo celular esté focalizado en la multiplicación. Cuando la glucosa haya sido agotada las células emplearán los otros azúcares presentes en el medio como fuentes de carbono produciéndose la expresión proteica, ya que la lactosa es un inductor del sistema pET. La utilización de este método de inducción proporciona grandes ventajas, ya que permite la expresión de la proteína sin modificar el medio de cultivo generando unos buenos rendimientos de expresión.

Para la expresión de los mutantes de LnbB se inicia un cultivo de volumen determinado, el cual se incuba a 30°C y 200 rpm durante 24 horas. Tras realizar la lisis celular se purifica la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad por metal (IMAC) con columnas His SpinTrap (GE healthcare). Las fracciones obtenidas se analizan mediante un gel SDS-Page al 8% de acrilamida aislando y combinando aquellas en las que se identifica la presencia de la proteína de interés. Se realiza un cambio de tampón para eliminar el imidazol utilizado en la elución, empleado una unidad de ultrafiltración con membrana de 30kDa (Centricón Merck-Millipore). Tras la purificación se determinan unos rendimientos de purificación comprendidos entre 30-60 mg de proteína por litro de cultivo. En las purificaciones de los diferentes mutantes de LnbB siempre se ha obtenido el mismo perfil de purificación, por lo que se mostrará únicamente el mutante W394F a modo de ejemplo (**Figura 2.12**).



**Figura 2.12.** Gel SDS-PAGE 8% Acrilamida del mutante W394F.

En los geles se analizan las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación mediante las columnas His Spin-Trap (GE Healthcare). M: PageRuler Prestained, P: pellet obtenido tras realizar la disrupción celular, FT 1-3: flow through, W1-4: lavados, E 1-4: eluciones, P: proteína final una vez juntadas las fracciones y realizado el cambio de tampón.

En los geles mostrados se puede apreciar una banda predominante (E1-E4) situada a unos 120 kDa, peso molecular correspondiente a LnbB. En la muestra de *pellet* se observa presencia de la proteína de interés, indicando que la recuperación de la enzima en forma soluble no ha sido total. Esto puede deberse a un tiempo de lisis insuficiente o bien a la formación de cuerpos de inclusión. En los *flow through* y en los lavados también se aprecia presencia de LnbB, indicando que se ha sobrepasado la capacidad de unión de la columna. La cantidad de enzima obtenida tras la purificación de los distintos mutantes es suficiente para su posterior caracterización enzimática.

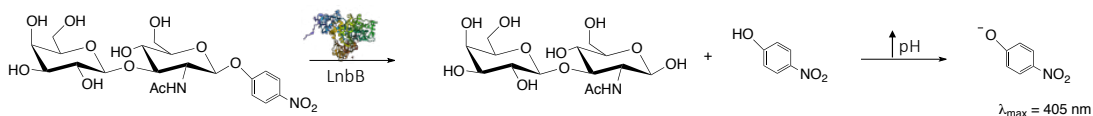
## 2.4 Caracterización de los mutantes

Dado que el objetivo general de esta tesis es la producción del compuesto LNT, será importante obtener mutantes los cuales permitan reducir la actividad nativa (hidrólisis) de la enzima LnbB a la vez que potencien la actividad sintética de ésta (transglicosidación). Por estos motivos, una vez obtenidas las nuevas variantes de la enzima LnbB, se caracterizará su actividad hidrolítica y TG.

- **Actividad hidrolítica**

La actividad hidrolítica de la enzima nativa y de los nuevos mutantes fue testada frente al sustrato LNB-pNP (4-nitrofenil 2-acetamido-2deoxi-3-O-(β-D-galactopiranosil)-β-D-glucopiranosido). Con la finalidad de poder evaluar la eficiencia catalítica de las nuevas variantes, todos los experimentos de hidrólisis han sido realizados a una concentración de sustrato no saturante (inferior a  $K_M$ ) ya que en estas condiciones la actividad específica de hidrólisis reflejará la relación  $k_{cat}/K_M$ . Si bien diversos estudios bibliográficos sitúan la  $K_M$  de la enzima LnbB frente al sustrato LNB-pNP entre 68-162  $\mu\text{M}$ <sup>87,98,100</sup>, como se podrá ver más adelante, la  $K_M$  determinada en este trabajo es de 500  $\mu\text{M}$ <sup>12</sup>. Así pues, para el estudio de la actividad hidrolítica se fijaron las siguientes condiciones de reacción 250  $\mu\text{M}$  LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C, siendo la concentración de enzima variable en función de la variante estudiada.

Concretamente LnbB hidrolizará el enlace glicosídico presente entre el disacárido y el glicósido pNP, generando la liberación del cromóforo. Éste, gracias a la alcalinización del medio por adición de tampón de glicina a pH 11 (método discontinuo) podrá ser cuantificado mediante métodos espectrofotométricos (Abs 405nm) **Figura 2.13**.



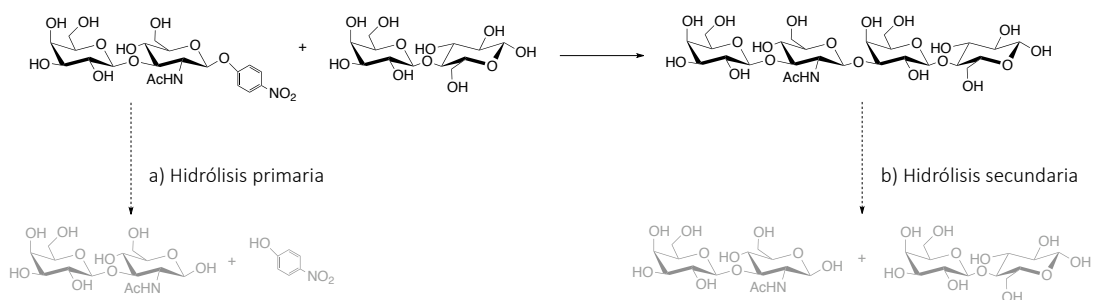
**Figura 2.13.** Reacción de hidrólisis catalizada por la enzima LnbB frente al sustrato LNB-pNP.

Las condiciones de reacción empleadas para el análisis de la actividad hidrolítica son: LnbB variable, 250  $\mu$ M LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C. Método discontinuo para la determinación de la actividad hidrolítica: a diferentes valores de tiempo, se extraen alícuotas, se incrementa su pH a 11 y se determina la absorbancia del p-nitrofenolato a 405 nm.

### • Actividad de transglucosidación

Para el estudio de la actividad TG se ha empleado como dador activado LNB-pNP y lactosa como molécula aceptora. Para desplazar la ratio TG/H hacia la reacción TG, se han realizado las reacciones empleando un gran exceso de aceptor frente al dador (80x), fijando las condiciones de reacción en 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

En estudios preliminares, se analizó la actividad TG empleando 2 concentraciones de enzima distintas, 1  $\mu$ M y 2  $\mu$ M. Tras realizar reacciones con diferentes mutantes a estas dos concentraciones, se obtuvieron siempre los mejores rendimientos de LNT con la concentración menor de enzima. En base a estos resultados, y con la finalidad de poder comparar los rendimientos sintéticos de las diferentes variantes de LnbB, se decidió fijar la concentración enzimática del ensayo en 1  $\mu$ M.



**Figura 2.14.** Reacciones catalizadas por la enzima LnbB y sus variantes.

Con flechas discontinuas se indican las reacciones de hidrólisis en competencia con la reacción de transglucosidación, a) hidrólisis primaria del sustrato LNB-pNP, b) hidrólisis secundaria del producto de transglucosidación LNT. Condiciones de reacción TG: 1  $\mu$ M de LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

El objetivo de este ensayo es cuantificar el tetrasacárido LNT resultante de la condensación de LNB-pNP y la lactosa. Como el producto de transglucosidación formado no contendrá ningún cromóforo o fluoróforo en su estructura, éste será cuantificado mediante cromatografía por HPLC-MS. Gracias a la utilización del detector de masas se monitorizarán, mediante sus diferentes canales, los compuestos

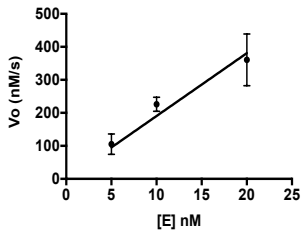
LNB, LNB-pNP y LNT, en la sección 5.3.2.3 del capítulo materiales y métodos se detallan las masas iónicas de los aductos analizados. La monitorización de la lactosa no se ha considerado necesaria, ya que al encontrarse en gran exceso su cuantificación no proporciona ninguna información relevante, hecho que ha permitido incrementar la sensibilidad de los canales de detección de LNB, LNB-pNP y LNT del detector MS.

## 2.4.1 Caracterización de los mutantes simples

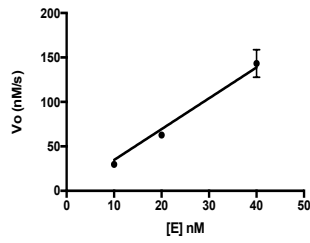
### 2.4.1.1 Análisis de la actividad hidrolítica

Para cada mutante generado se realizan reacciones a tres concentraciones de proteína distintas y se determina la velocidad inicial ( $V_0$ ) de cada una de las reacciones. Este parámetro se representa frente a la concentración de enzima empleada en la reacción para la determinación de la actividad hidrolítica específica de la enzima ( $SA_H$ ). En la **Figura 2. 15** se presentan los resultados de  $SA_H$  obtenidos con la enzima salvaje y los mutantes de LnbB realizados. El seguimiento de la evolución de las reacciones de hidrólisis se muestra en la sección de Anexos.

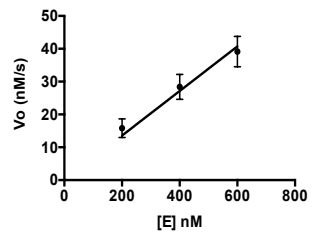
**a) LnbB wt**



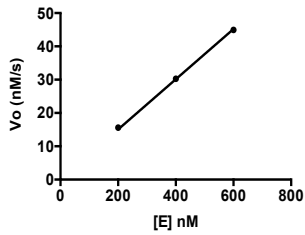
**b) LnbB W373F**



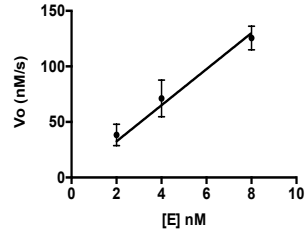
**c) LnbB W394F**



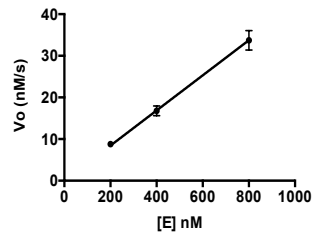
**d) LnbB Y419F**



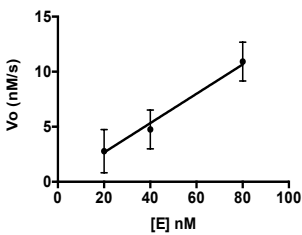
**e) LnbB Y427F**



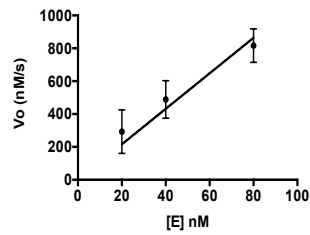
**f) LnbB W465F**



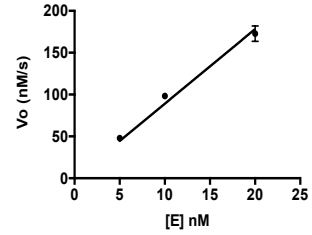
**g) LnbB Q190L**



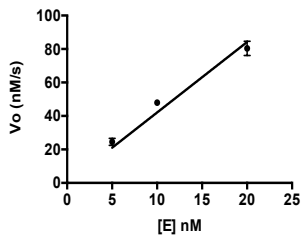
**h) LnbB Q190H**



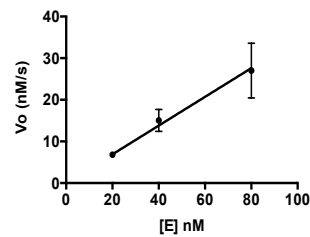
**i) LnbB E216A**



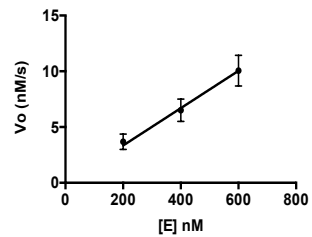
**j) LnbB E216D**

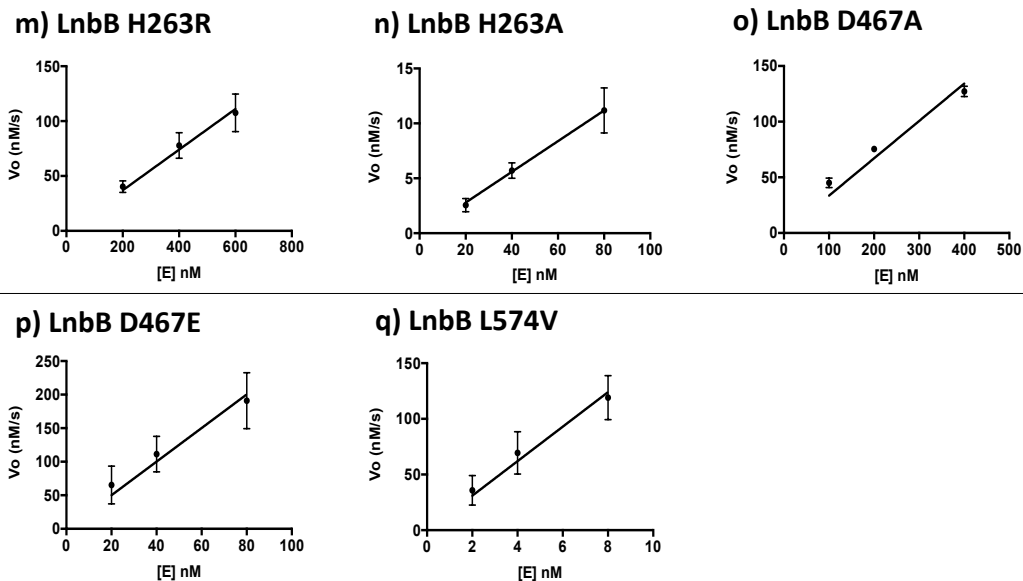


**k) LnbB N259A**



**l) LnbB N259Q**





**Figura 2. 15.** Actividad específica de hidrólisis de los mutantes de LnbB.  
 Condiciones de reacción: 250  $\mu$ M LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

En la **Tabla 2. 3** se muestran los valores de actividad hidrolítica específica ( $SA_H$ ,  $s^{-1}$ ) obtenidos para cada uno de los mutantes estudiados, así como la comparación de su actividad respecto a la enzima wt (%H).

**Tabla 2. 3** Actividad hidrolítica específica de los mutantes de LnbB frente a LNB-pNP.

Residuo (subsitio)	Mutante	$SA_H$ ( $s^{-1}$ )	%H (mut/wt)
WT	WT	$24 \pm 1.8$	100
Trp373 (-1)	W373F	$3.7 \pm 0.2$	15.4
Trp394 (-1)	W394F	$0.07 \pm 0.01$	0.28
Tyr419 (-1)	Y419F	$0.13 \pm 0.09$	0.6
Tyr427 (-1)	Y427F	$15.4 \pm 0.8$	64
Trp465 (-1)	W465F	$0.06 \pm 0.03$	0.3
Glu321*(-1)	E321A	$0.80 \pm 0.08$	3
Asp320** (-1/-2)	D320A	<0.01	<0.04
	D320E	$0.24 \pm 0.02$	1.0
Gln190 (-2)	Q190L	$0.14 \pm 0.02$	0.6
	Q190H	$10 \pm 1$	43.3
Glu216 (-2)	E216A	$4.3 \pm 0.2$	18.0
	E216D	$8.7 \pm 0.5$	36
Asn259 (-2)	N259A	$0.4 \pm 0.1$	1.6
	N259Q	$0.017 \pm 0.002$	0.07
His263 (-2)	H263R	$0.20 \pm 0.01$	0.8
	H263A	$0.14 \pm 0.03$	0.6

Asp467 (-1/-2)	D467A	0.34 ± 0.03	1.4
	D467E	2.5 ± 0.6	10.4
Leu574 (-2)	L574V	15 ± 3	65

\*Acido-base general, \*\*Residuo asistente, SA<sub>H</sub>: actividad específica de hidrólisis. Condiciones de reacción: 250 μM LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

Se puede apreciar como todas las mutaciones han originado una disminución de la actividad hidrolítica de la enzima, presentando actividades hidrolíticas residuales relativas a la enzima wt de entre el 65% y el 0.04%. El biocatalizador más inactivo obtenido hasta el momento es el mutante D320A, reteniendo un 0.04% de la actividad hidrolítica presentada por la enzima salvaje (10<sup>4</sup> veces menor). El residuo asistente juega papeles esenciales en la catálisis posicionando adecuadamente el residuo 2-acetamido para que se dé el ataque nucleófilo, así como en la estabilización del intermedio de reacción. Al ser reemplazado por alanina se está eliminando cualquier tipo de interacción aminoácido-sustrato, efecto que se refleja en una disminución drástica de la actividad enzimática.

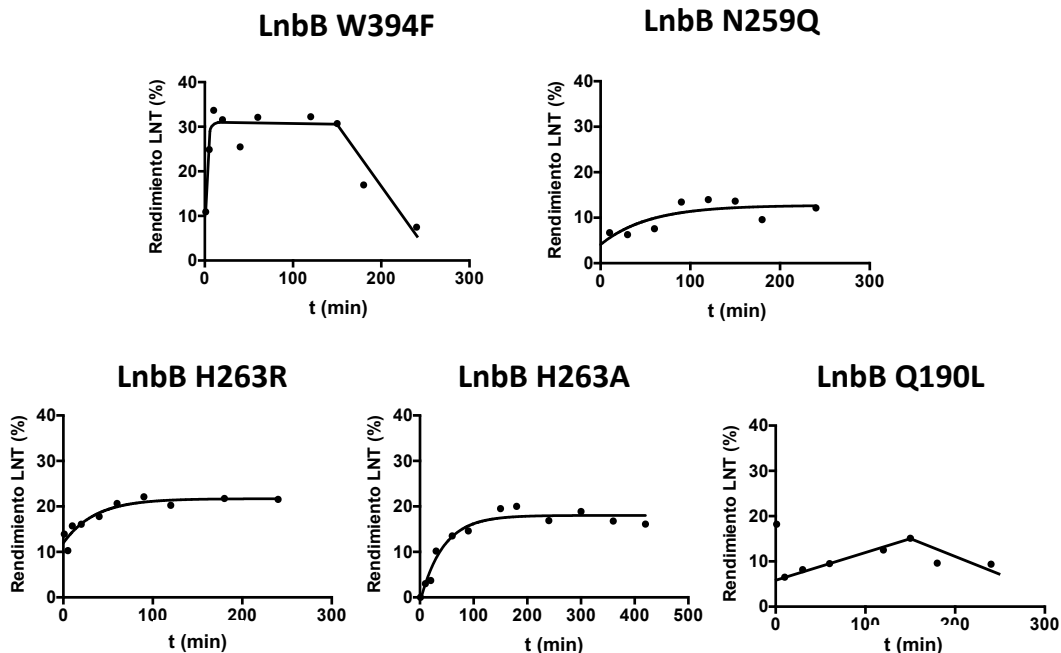
Las enzimas de la familia GH20, a excepción de LnbB, presentan un único subsitio negativo (subsitio -1) por lo que será en esta región donde se localizarán, principalmente, los residuos conservados involucrados en la catálisis, la unión de LNB-pNP y estabilización del intermedio de reacción. Como se puede observar en la **Tabla 2. 3**, en general, las mutaciones realizadas en esta región (W394F, Y419F, W465F, E321A, D320A y D320E) presentan una baja actividad hidrolítica residual reteniendo entre el 0.04% y el 3 % de la enzima salvaje. Dentro de este grupo también hay ciertas excepciones, siendo éstos los mutantes W373F y Y427F, los cuales retienen notablemente parte de la actividad hidrolítica de la enzima salvaje, 15.4% y 64% respectivamente.

Ya que LnbB alberga un segundo subsitio negativo, esta región no presentará residuos conservados a excepción de la His263, debido a su localización entre los subsitios -1 y -2. Analizando los resultados presentados en la **Tabla 2. 3** se aprecia como las mutaciones realizadas en el subsitio -2 han causado un menor impacto, encontrando enzimas en general, con un mayor carácter hidrolítico que las obtenidas tras realizar mutaciones en el subsitio -1. Los mutantes de los subsitios -2 que han permitido un mayor descenso de dicha actividad son Q190L, N259A, N259Q, H263R, D467A reteniendo entre un 0.04% y un 3 % la actividad hidrolítica de la enzima salvaje. Las demás mutaciones introducidas en esta región han dado lugar a variantes con actividades hidrolíticas residuales superiores al 10% (Q190H, E216A, E216D, D465E y L574V) indicando que dichas posiciones no tienen un gran efecto en la estabilización y/o unión del sustrato LNB-pNP.

### 2.4.1.2 Caracterización de la actividad TG

Con la caracterización de la actividad hidrolítica de los mutantes simples se ha observado como éstos retienen parte del carácter hidrolítico de la enzima salvaje. La no abolición de la actividad natural de la enzima puede suponer un inconveniente para la actividad TG, ya que cierta parte del dador será hidrolizado por la enzima y no podrá ser empleado para la reacción TG, limitando los rendimientos de esta reacción. Además, la presencia de actividad de hidrólisis residual también puede suponer un problema para la estabilidad del tetrasacárido, ya que éste podrá ser hidrolizado por la enzima (hidrólisis secundaria).

Ya que la reacción de TG puede darse a bajas velocidades, las reacciones serán monitorizadas a tiempos largos entre 3 y 24 horas. Dado el gran exceso en el que se encuentra la lactosa como aceptor, ésta no será monitorizada mediante HPLC-MS, siguiendo únicamente las masas de LNT (producto de TG), LNB-pNP y LNB (producto de hidrólisis). Para la cuantificación de los productos se han realizado rectas patrones de LNB, LNB-pNP y LNT comprendidas entre 1.6  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ . En la **Figura 2. 16** se presentan los rendimientos de LNT obtenidos con los mutantes W394F, N259Q, H263R, H263A y Q190 a lo largo del tiempo. En la sección de Anexos se muestra la evolución de la reacción TG de todos los mutantes realizados en términos de concentración de LNB, LNB-pNP y LNT.



**Figura 2. 16.** Evolución de los rendimientos de LNT obtenidos con los mutantes W394F, N259Q, H263R, H263A y Q190L. Para su determinación se ha monitorizado el compuesto LNT mediante HPLC-MS. Condiciones de reacción: 1  $\mu\text{M}$  LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C



En la **Tabla 2.4** se resumen los rendimientos de síntesis de LNT máximos obtenidos para cada uno de los mutantes estudiados (en base a la concentración inicial de dador en reacción) así como el intervalo de tiempo donde se obtienen las mayores concentraciones de LNT (intervalo de tiempo donde el rendimiento de LNT determinado presenta una variación de  $\pm$  5% respecto máximo obtenido).

**Tabla 2.4.** Rendimientos de LNT obtenidos en las reacciones de transglucosidación de los mutantes de LnbB.

Residuo (subsitio)	Mutante	Rendimiento máx LNT (%)	Intervalo de tiempo (min)	%H (mut/wt)
WT	WT	n.d.		100
Trp373 (-1)	W373F	0.5	[30–120]	15.4
Trp394 (-1)	W394F	32	[60–150]	0.28
Tyr419 (-1)	Y419F	1.8	[1–10]	0.6
Tyr427 (-1)	Y427F	2.1	[1–3]	64
Trp465 (-1)	W465F	4.1	[1–360]	0.3
Glu321*(-1)	E321A	---	---	3
Asp320** (-1/-2)	D320A	---	---	<0.04
	D320E	3.3	[60–120]	1.0
Gln190 (-2)	Q190L	15	[120–180]	0.6
	Q190H	1.4	[1–240]	43.3
Glu216 (-2)	E216A	4.3	[1–10]	18.0
	E216D	3.5	[1–60]	36
Asn259 (-2)	N259A	10.6	[10–30]	1.6
	N259Q	16.3	[90–360]	0.07
His263 (-2)	H263R	17	[40–240]	0.8
	H263A	21	[90–360]	0.6
Asp467 (-1/-2)	D467A	0.5	[30–120]	1.4
	D467E	2.8	[3–30]	10.4
Leu574 (-2)	L574V	1.9	[1–5]	65

\*Acido-base general; \*\*Residuo asistente (valores extraídos de Val-Cid 2016<sup>103</sup>), n.d.: no detectado. Condiciones de reacción: 1  $\mu$ M LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C. Para todos los mutantes estudiados el error asociado al rendimiento de LNT máx ha sido  $\leq$  al 10%.

Debido a la elevada actividad hidrolítica de la enzima LnbB salvaje no ha sido posible detectar la presencia del tetrasacárido LNT, ya que ésta hidroliza rápidamente el sustrato LNB-pNP. Cabe matizar, que la no detección del compuesto no confirma que la enzima salvaje no sea capaz de sintetizar LNT, ya que el tetrasacárido podría ser hidrolizado a la vez que es sintetizado. Por estos motivos, consideraremos la actividad TG de la enzima salvaje negligible.

Estudiada la reacción TG de los distintos mutantes se aprecia como éstos exhiben una tendencia similar observando como generalmente, una vez alcanzada la máxima concentración de LNT éste es hidrolizado por las enzimas debido a su hidrólisis secundaria. No obstante, este patrón no es seguido

por ciertos mutantes (Q190L, Q190H, H263A, H263R, N259Q y W465Y), los cuales no hidrolizan, o en muy poco grado, el LNT formado, indicando que la mutación ha permitido disminuir la hidrólisis secundaria de la enzima nativa. De los mutantes anteriormente mencionados, cabe destacar los resultados obtenidos con las variantes Q190L, H263A, H263R, N259Q y W465F, la cuales presentan rendimientos de LNT de entre el 3.2 - 21%, permaneciendo el tetrasacárido estable hasta las 24 horas de reacción. Con el mutante W394F se ha obtenido un rendimiento de síntesis del 32%, se aprecia como el compuesto LNT permanece estable en reacción hasta transcurridos 150 minutos siendo posteriormente hidrolizado por la enzima (**Figura 2. 16**).

Algunos de los residuos seleccionados en este estudio tienen papeles importantes en la actividad enzimática, en la unión del sustrato, o en la estabilización de los estados de transición; por lo que debido a su relevancia ya han sido estudiados en otras enzimas de la familia GH20. A continuación se discuten los resultados obtenidos y se comparan con los reportados para otras enzimas de la familia GH20.

- **Residuo asistente (Asp320)**

En este estudio, las mutaciones D320A y D320E han causado un impacto drástico sobre la actividad hidrolítica de la enzima, dando lugar a variantes prácticamente inactivas (<0.04% y 1% de %H respectivamente). A pesar de que con la mutación D320E se ha disminuido notablemente el carácter hidrolítico de la enzima, no se han obtenido unos buenos rendimientos de TG (3.3% de LNT).

Con la finalidad de incrementar la producción de LNT-II de la enzima  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa de *B.bifidum* (*BbHI*), (45%<sup>109</sup>, 16%<sup>105</sup>, en función de las condiciones experimentales), Chen<sup>109</sup> y colaboradores modificaron su residuo asistente mediante mutaciones dirigidas y aleatorias, identificando 7 candidatos interesantes (Ala, Gly, Glu, Cys, Ser, Val y Thr). La eficiencia sintética de estos nuevos catalizadores fue testada mediante el uso del dador GlcNAc-pNP y lactosa como aceptor, reportando unos rendimientos de síntesis de LNT-II del 84.7% con el mutante D720T. Asimismo, las mutaciones del residuo asistente de la  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa de *T. flavus* (*TfHex*) (D370G, Ala, Leu o Asn) mostraron una gran disminución de la actividad hidrolítica, pero, sorprendentemente la mutación D370V causó un incremento de dicha actividad. Para la caracterización de la actividad TG de aquellos mutantes menos hidrolíticos, se empleó GlcNAc-pNP como dador y aceptor, obteniendo como resultado una mezcla de quitoooligosacáridos con diferentes grados de plimerización<sup>110</sup>. Al igual que los ejemplos aquí mostrados, las mutaciones del residuo asistente de LnbB han permitido disminuir fuertemente la actividad hidrolítica de la enzima, pero a diferencia de los casos anteriores no han tenido ningún impacto sobre la actividad TG.

Dentro de esta familia también se ha explorado la estrategia glicosintasa para la producción de carbohidratos complejos, mutando para ello el residuo asistente y utilizando dadores oxazolina. Esta estrategia fue aplicada en la enzima *BbHI* mediante la mutación D746E, empleando como dador activado GlcNAc-oxazolina y lactosa como aceptor se obtuvieron unos rendimientos de LNT-II del 86%<sup>111</sup>. Dados los prometedores resultados obtenidos, esta estrategia fue aplicada a la enzima LnbB para la síntesis del tetrasacárido LNT. Modificando el residuo asistente Asp320 a Glu y empleando los sustratos LNB-oxazolina y lactosa obtuvieron unos rendimientos de síntesis de LNT del 30%, siendo estos inferiores a los reportados con *BbHI* debido a la alta hidrólisis del dador LNB-oxazolina<sup>88</sup>.

- **Plataforma hidrofóbica (Trp373, Trp394 y Trp465)**

Dado que la plataforma hidrofóbica puede tener una influencia significativa en la unión enzima-sustrato, en este estudio se ha realizado la mutación de los tres Trp conservados por Phe, para reducir así la hidrofobicidad de la región. Tras su caracterización (**Tabla 2.4**) se aprecia como las mutaciones han permitido disminuir, en menor o mayor grado, la actividad hidrolítica, causando impactos muy distintos en la actividad TG de las nuevas variantes. La mutación W465F ha causado una reducción notable en la actividad hidrolítica (0.3% H) de la nueva variante, causando un menor impacto en la actividad TG (4.1% LNT). Por otro lado, el mutante W394F con una actividad hidrolítica similar (0.28% %H) presenta un impacto notorio en la actividad TG, sintetizado LNT con rendimientos del 32%. Hasta la fecha este ha sido el mayor rendimiento de síntesis de LNT reportado por vía enzimática, sugiriendo que el mutante W394F podría ser un biocatalizador prometedor para la producción del tetrasacárido.

Considerando que los Trp465 y Trp394 pueden ejercer un papel relevante en la unión del sustrato y en la estabilización de los estados de transición respectivamente, estos residuos han sido explorados en otras N-acetilhexosaminidasas de la familia GH20. En *BbHI*, la mutación W882F (posición equivalente a Trp465 de LnbB) permitió una mejora significativa en la actividad TG, sintetizando LNT-II con un rendimiento del 66% (en comparación del 16% de la enzima wt); mientras que el mutante W801F (posición equivalente a Trp394 de LnbB) presentó los mismos rendimientos de LNT-II que la enzima nativa (17%)<sup>105</sup>. Los resultados obtenidos para los mutantes de LnbB son contrarios a los reportados para *BbHI*, ya que con el mutante W394F se obtuvieron los mejores rendimientos de síntesis de LNT mientras que la mutación W465F causó un efecto muy leve sobre la actividad TG. Aunque las posiciones estudiadas en *BbHI* y LnbB son equivalentes (alineación de secuencia), los resultados obtenidos podrían indicar que las cadenas laterales de los Trp presentan diferentes orientaciones relativas en las estructuras 3D de las proteínas (estructura 3D no resuelta para *BbHI*).

En este trabajo también se ha estudiado la posición Trp373 la cual no ha sido analizada en otras enzimas de la familia GH20. En esta ocasión la mutación W373F ha presentado una elevada actividad

hidrolítica residual (15%) no causando efecto alguno en la actividad TG. Si bien con las mutaciones de los triptófanos a Phe se están conservando las interacciones de apilamiento con el sustrato, se ha identificado como estas sustituciones han causado un ligero impacto en las actividades enzimáticas<sup>108</sup>.

- **Tyr419**

La Tyr419 de LnbB es un residuo conservado en la familia GH20, al igual que en las quitinasas de la familia GH18 y las endo- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas de la familia GH85, la cual interacciona con el intermedio oxazolina<sup>102,112</sup>. En *TfHex* este residuo (Tyr470) ha sido modificado a Phe, His y Asn, causando una reducción drástica de la actividad hidrolítica (0.5-4% de la actividad de la enzima wt)<sup>113</sup>. En *BbHI*, el mutante Y470F fue testado en reacciones tipo glicosintasa empleando como dador activado GlcNAc-oxazolina y lactosa como aceptor. Aunque este mutante mostró una mejora de los rendimientos de LNT-II a tiempos cortos de reacción (80%), el trisacárido sintetizado es degradado completamente por la actividad hidrolítica residual de la enzima<sup>111</sup>.

En este trabajo se ha realizado la mutación Y419F la cual ha permitido disminuir notablemente la actividad hidrolítica de la enzima (0.5% de hidrólisis residual) mostrando un leve impacto en la actividad TG (1.8%). Esta mutación también ha sido testada en reacciones tipo glicosintasa por Nidetzky y colaboradores<sup>88</sup>. Empleando LNB-oxazolina como dador activado y lactosa como aceptor los autores obtuvieron un rendimiento de síntesis de LNT del 30%, siendo éste rápidamente hidrolizado debido a la actividad hidrolítica residual de la enzima.

- **Residuos del subsitio -2**

En esta tesis también se han estudiado los residuos localizados en el subsitio -2 capaces de interactuar con el dador. Debido a que las demás N-acetilhexosaminidasas de la familia presentan un único subsitio negativo (-1), no existirán residuos equivalentes en otras GH20. En esta región se encuentran los residuos Gln190, Glu216, Asn259, His263, Asp467 y Leu574 los cuales mediante la formación de una red de puentes de hidrógeno con los hidroxilos del sustrato pueden tener un papel importante en la acomodación la unidad Gal de LNB. Los mutantes Q190L, N259A, H263A y H263R presentan una actividad hidrolítica residual aproximadamente del 1%, sintetizando LNT con unos rendimientos del 10-20%.

En el subsitio -2 también se encuentra el Asp467, el cual mediante la formación de puente de hidrogeno bidentado interaccionará con ambos monosacáridos de LNB. A pesar de que su mutación a Ala y Glu genera una pérdida de la capacidad hidrolítica de la enzima, en ambos casos las mutaciones no han causado impacto alguno en la actividad TG. Estos resultados concuerdan con los obtenidos

mediante la mutación Asp884Arg de *BbHI* (posición de secuencia equivalente a Asp465 de LnbB) de *BbHI*, la cual presenta una actividad TG inferior a la de la enzima salvaje (12%)<sup>105</sup>.

## 2.4.2 Caracterización de los dobles mutantes

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la síntesis de LNT con las mutaciones puntuales, se consideró interesante estudiar qué efecto podría causar la combinación de éstas. Concretamente para el diseño de los nuevos mutantes se plantearon dos estrategias distintas; a) la combinación de las mejores mutaciones identificadas en este trabajo, en términos de síntesis de LNT, con el mejor candidato descrito en Val Cid 2016<sup>103</sup> (Y419F), b) la combinación de los mutantes simples con mejores rendimientos de LNT identificados en esta tesis. Los mutantes dobles diseñados se muestran en la **Tabla 2.5**.

**Tabla 2.5.** Presentación de los dobles mutantes de LnbB propuestos. En la tabla se indica el residuo y su localización.

Mutaciones	Subsitios
W394F_Y419F	-1, -1
W394F_H263A	-1, -2
W394F_N259Q	-1, -2
W394F_N259A	-1, -2
Q190L_Y419F	-2, -1
H263A_Y419F	-2, -1
H263R_Y419F	-2, -1

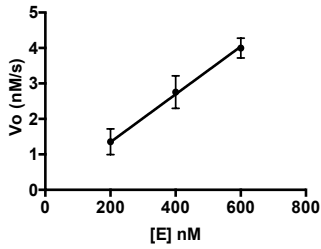
Los mutantes dobles fueron realizados mediante mutagénesis dirigida (SDM) empleando el método de Quik change PCR (véase sección 5.1.2 del capítulo materiales y métodos). Se obtuvieron con éxito los 7 mutantes dobles, se expresaron y se purificaron, obteniendo unos rendimientos de purificación comprendidos entre 55 y 100 mg de proteína por litro de cultivo. Finalmente se procedió a la caracterización de sus actividades hidrolíticas y TG.

### 2.4.2.1 Caracterización de la actividad hidrolítica y TG de los mutantes dobles de LnbB

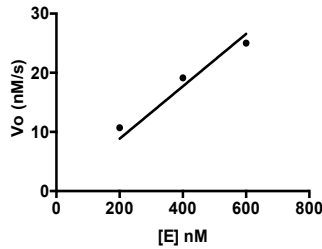
Obtenidos los dobles mutantes se caracterizó su actividad hidrolítica frente LNB-pNP y la actividad TG con LNB-PNP y lactosa, empleando las mismas condiciones que las descritas para los mutantes simples.

En las **Figura 2. 17** y **Figura 2. 18** se presentan los gráficos obtenidos tras caracterizar la actividad hidrolítica y TG de los diferentes mutantes dobles de LnbB.

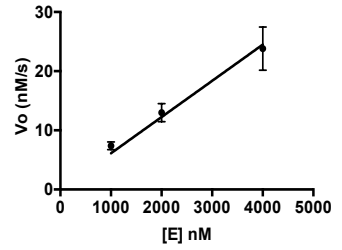
**a) LnbB W394F\_Y419F**



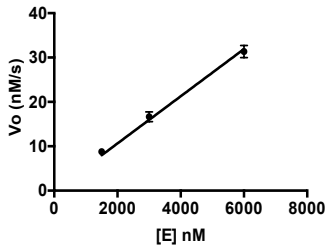
**b) LnbB W394F\_H263A**



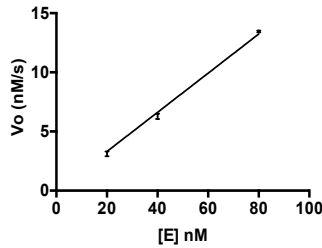
**c) LnbB W394F\_N259A**



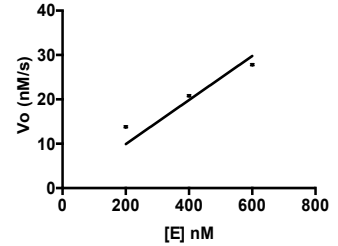
**d) LnbB W394F\_N259Q**



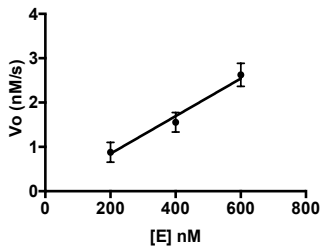
**e) LnbB Q190L\_Y419F**



**f) LnbB H263A\_Y419F**

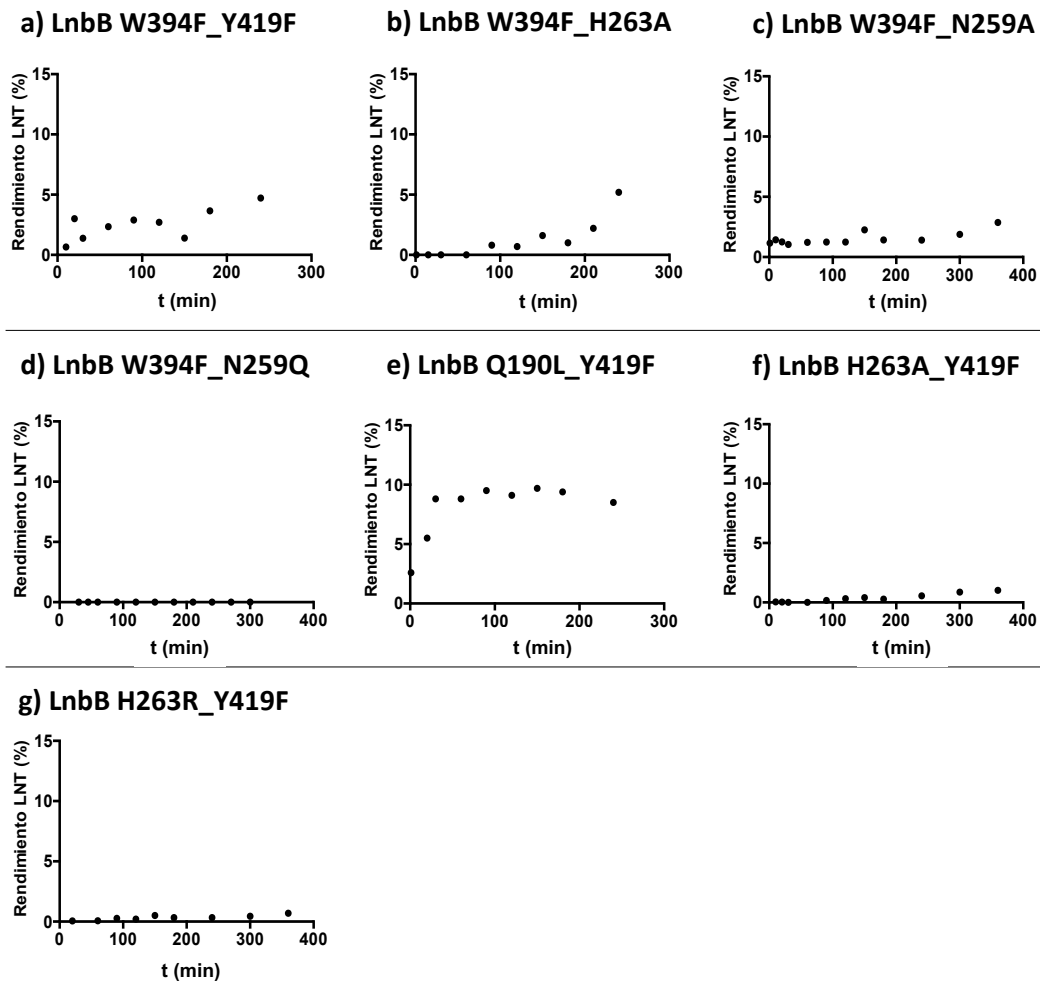


**g) LnbB H263R\_Y419F**



**Figura 2. 17.** Actividad específica de hidrólisis de los dobles mutantes de LnbB.

Condiciones de reacción: 250  $\mu$ M LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.



**Figura 2. 18.** Evolución de la reacción TG para los mutantes dobles de LnbB.

Evolución de los rendimientos de LNT obtenidos con los mutantes dobles de LnbB. Para su determinación se ha monitorizado el compuesto LNT mediante HPLC-MS. Condiciones de reacción SA<sub>H</sub>: 250 μM LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

En la **Tabla 2.6** se presentan las actividades hidrolíticas (SA<sub>H</sub>) y TG (%LNT) determinadas para cada uno de los dobles mutante estudiados y se compara con los mutantes simples.

**Tabla 2.6.** Tabla resumen de la actividad hidrolítica sobre LNB-pNP y de la actividad TG en términos de rendimientos de síntesis de LNT%.

Mutante	$SA_H$ ( $s^{-1}$ ) <sup>1</sup>	%H (mut/wt)	Rendimiento máx LNT (%)
W394F	0.07 ± 0.01	0.28	32
Y419F	0.13 ± 0.09	0.6	1.8
Q190L	0.14 ± 0.02	0.6	15
N259A	0.4 ± 0.1	1.6	10.6
N259Q	0.017 ± 0.002	0.07	16.3
H263A	0.14 ± 0.03	0.6	21
H263R	0.20 ± 0.01	0.8	17
W394F_Y419F	0.014 ± 0.009	0.06	4.7
W394F_H263A	0.044 ± 0.003	0.2	5.2
W394F_N259A	0.006 ± 0.0008	0.02	2.9
W394F_N259Q	0.0053 ± 0.0003	0.02	n.d
Q190L_Y419F	0.17 ± 0.01	0.7	9.7
H263A_Y419F	0.05 ± 0.005	0.2	1
H263R_Y419F	< 0.01	< 0.04	0.7

$SA_H$ : actividad específica de hidrólisis, n.d: no detectado. Condiciones de reacción TG: 1  $\mu$ M LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C. Condiciones de reacción  $SA_H$ : 250  $\mu$ M LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C. Para todos los mutantes estudiados el error asociado al rendimiento de LNT máx ha sido  $\leq$  al 10%.

La incorporación de nuevas mutaciones a las ya existentes ha permitido disminuir la actividad hidrolítica de los mutantes puntuales prácticamente en todos los casos, a excepción de Q190L\_Y419F. Los dobles mutantes retienen una ínfima parte de la actividad hidrolítica de la enzima salvaje, presentando actividades hidrolíticas residuales comprendidas entre el 0.2 y el 0.04%. Todo y ser enzimas muy poco hidrolíticas no muestran una mejora en la actividad TG, sintetizando LNT en rendimientos inferiores al 10% en todos los casos.

Caracterizadas las actividades de hidrólisis y TG de los mutantes dobles, se concluye que la introducción de nuevas mutaciones no ha permitido incrementar los rendimientos de síntesis de LNT obtenidos con los mutantes simples, siendo el mutante W394F el mejor biocatalizador encontrado hasta el momento (32% LNT).

### 2.4.3 Exploración del residuo Trp394

Tras caracterizar un gran número de mutantes, simples y dobles, el mutante W394F es, hasta día de hoy, el biocatalizador más prometedor para la síntesis del compuesto LNT identificado en este trabajo.



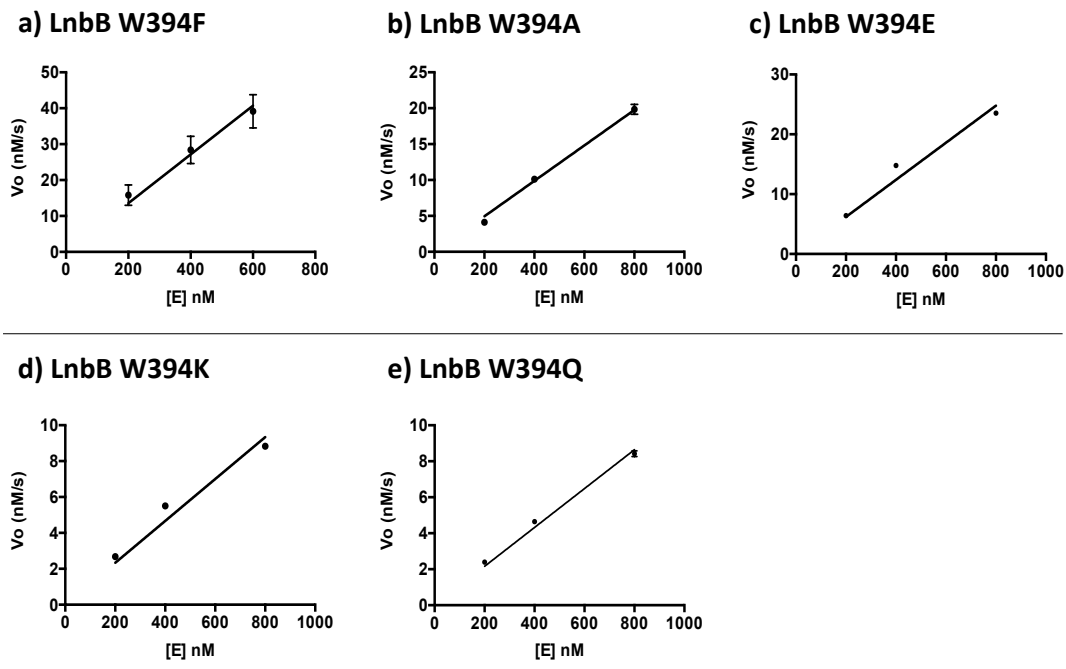
A lo largo de este capítulo se ha descrito la importancia del residuo Trp394 en la estabilización y formación del intermedio oxazolona, efecto que se ve perturbado por la mutación W394F.

Con la finalidad de estudiar más detalladamente su función se propuso el reemplazo de este residuo por aminoácidos con diferentes propiedades fisicoquímicas, para estudiar así su efecto sobre la actividad hidrolítica y TG. Concretamente el Trp394 se mutó a lisina, ácido glutámico, alanina y glutamina, aminoácidos que otorgaran características distintas a esta posición, eliminando así, su carácter hidrofóbico natural.

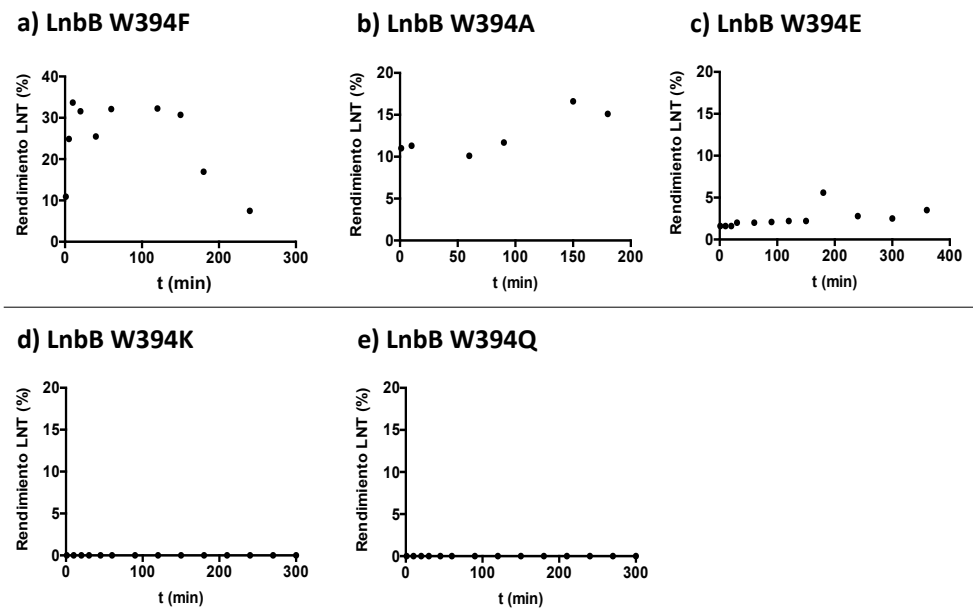
La lisina presenta en su cadena lateral un grupo amino protonable, proveyendo a esta posición carga positiva. La mutación W394K puede influir en la catálisis enzimática, debido a la proximidad del residuo al centro anomérico. Durante los estados de transición el intermedio de reacción se encuentra cargado positivamente, conformación que puede verse desestabilizada electroestáticamente debido a la carga positiva de la lisina. Por el contrario, con la mutación W394E se está otorgando al residuo carga neta negativa. Debido a la oposición de cargas entre el residuo y el intermedio de reacción (ion oxazolona), esta mutación podría estabilizar los estados de transición debido a la atracción electroestática entre éstos.

Otro factor que se ha explorado es la polaridad del residuo, introduciendo en esta posición un aminoácido polar (Gln) y uno apolar (Ala). La Gln en su cadena lateral contiene un grupo amida, el cual puede formar fácilmente puentes de hidrógeno con el sustrato, pudiendo participar en su proceso de unión o en la estabilización de los intermedios de reacción. También se ha propuesto la mutación W394A, incorporando así un residuo igualmente hidrofóbico, pero con propiedades muy distintas. La sustitución de un aminoácido muy voluminoso por otro de tamaño muy reducido podría alterar el posicionamiento del sustrato, efecto que puede causar alteraciones en las actividades de la enzima.

Las nuevas variantes fueron obtenidas por mutagénesis dirigida (SDM) empleando el método de Quick change PCR, usando el ADN molde pET28b(+)-LnbB-FL-Cterm. Una vez confirmadas las mutaciones, se expresaron y purificaron las nuevas enzimas y se caracterizó su actividad hidrolítica y TG, empleando la metodología estándar. A continuación, se muestran las actividades específicas de hidrólisis (**Figura 2. 19**) y los rendimientos de LNT obtenidos (**Figura 2. 20**) con los mutantes de la posición Trp394. Como referencia se incluirá en estos análisis el mutante W394F.



**Figura 2. 19.** Actividad específica de hidrólisis de los mutantes de la posición Trp394 de LnbB. Condiciones de reacción: 250  $\mu$ M LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.



**Figura 2. 20.** Evolución de la reacción TG de los mutantes del residuo Trp394 de LnbB. Monitorización de los rendimientos de LNT obtenidos con los mutantes de la posición Trp 394 de LnbB. Para su determinación se a monitorizado el compuesto LNT mediante HPLC-MS. Condiciones de reacción: 1  $\mu$ M enzima, 2.5 mM LNB-pNP, 200mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

Para facilitar la comprensión de los resultados se recogen los parámetros determinados para ambas actividades en la **Tabla 2.7**.

**Tabla 2.7.** Resumen de la actividad hidrolítica sobre LNB-pNP y de la actividad TG en términos de rendimientos de síntesis de LNT%.

Residuo	Mutación	SA <sub>H</sub> (s <sup>-1</sup> )	%H (mut/wt)	Rendimiento máx LNT (%)	Intervalo de tiempo
Trp394 (-1)	Phe	0.07 ± 0.01	0.28	32	[60–150]
	Ala	0.030 ± 0.001	0.13	16.6	[90–180]
	Gln	0.011 ± 0.001	0.04	6.8	[1500]
	Glu	0.031 ± 0.002	0.12	5.6	[20–360]
	Lys	<0.01	<0.04	n.d	--

SA<sub>H</sub>: actividad específica de hidrólisis, n.d: no detectado. Condiciones de reacción TG: 1 μM LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C. Condiciones de reacción SA<sub>H</sub>: 250 μM LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C. Para todos los mutantes estudiados el error asociado al rendimiento de LNT máx ha sido ≤ al 10%.

Mientras que el W394F presenta una actividad hidrolítica residual del 0.28%, las demás mutaciones exhiben una menor actividad de hidrólisis, pero en ningún caso superan el rendimiento de LNT del 32% presentado por éste. El caso más extremo tiene lugar con la mutación W394K, la cual presenta una SA<sub>H</sub> inferior a 0.01 s<sup>-1</sup>, traducándose en una actividad residual inferior al 0.04%. Esta pérdida de actividad también se refleja en la actividad TG de la enzima, ya que dicha mutación no presenta capacidad de sintetizar el compuesto LNT. Como se había sugerido, la introducción de una carga positiva en esta posición podría causar efectos drásticos en la actividad enzimática, pudiendo deberse a la desestabilización de los estados de transición.

Por otro lado, la introducción de una cadena lateral electronegativa (W394E) ha causado unos efectos menos drásticos, presentando una actividad hidrolítica residual del 0.12% y unos rendimientos de TG inferiores al 5.6%. Con la mutación W394Q se han obtenido un rendimiento de TG del 6.8%, y una mayor reducción de la actividad hidrolítica, 0.04%. Los bajos rendimientos de TG obtenidos con las mutaciones W394E y W394Q en comparación con W394F, podrían atribuirse a dos factores. En primer lugar, con la introducción de los residuos Gln y Glu se está generando espacio en el subsitio -1, ya que éstos son de menor tamaño que Phe y Trp. Este hecho, o bien, la orientación adoptada por la cadena lateral de los residuos Gln y Glu podrían modificar el posicionamiento del dador, pudiendo repercutir en la conformación del estado de transición. Por otro lado, con estas mutaciones (W394E y W394Q) se ha eliminado totalmente el carácter hidrofóbico del residuo original o su mutante Phe, dada la cercanía del residuo al subsitio +1 estas variantes podrían disminuir la afinidad enzima-aceptor lo que podría afectar negativamente a su actividad TG. La diferencia de actividades entre ambos aminoácidos podría explicarse por la estabilización del intermedio de reacción. La introducción de una cadena

negativa (Glu) podría jugar un papel en la estabilización del estado de transición, pudiendo causar un incremento de la actividad hidrolítica primaria y secundaria de la enzima. Esto se vería reflejado en los resultados obtenidos ya que con la mutación W394E obtenemos mayor actividad hidrolítica y menor actividad TG que con el mutante W394Q, el cual estabilizaría en menor grado el estado de transición.

A diferencia de los otros mutantes, la variante W394A ha permitido sintetizar el compuesto LNT con un rendimiento del 16.6%, encontrando así otro mutante capaz de sintetizar LNT con rendimientos alrededor del 15%. En esta ocasión se está reemplazando un aminoácido de grandes dimensiones por uno de tamaño muy reducido, proporcionando así, espacio en el subsitio -1 del centro activo. Dado que el residuo Trp394 esta colindante a los subsitios del aceptor, esta cavidad generada podría tener un efecto en la accesibilidad del aceptor, facilitando su llegada y posicionamiento en el centro activo y por lo tanto favoreciendo la actividad TG.

#### **2.4.4 Relación entre la actividad hidrolítica y de transglicosidación de los mutantes de LnbB.**

Tras caracterizar la actividad TG de los distintos mutantes se aprecia cómo éstos sintetizan LNT con rendimientos muy distintos. Con la finalidad de estudiar la relación existente entre ambas actividades se representan los rendimientos de transglicosidación (rendimiento LNT%) en función de la actividad hidrolítica residual (%H) de cada uno de los mutantes estudiados (**Figura 2. 21**)

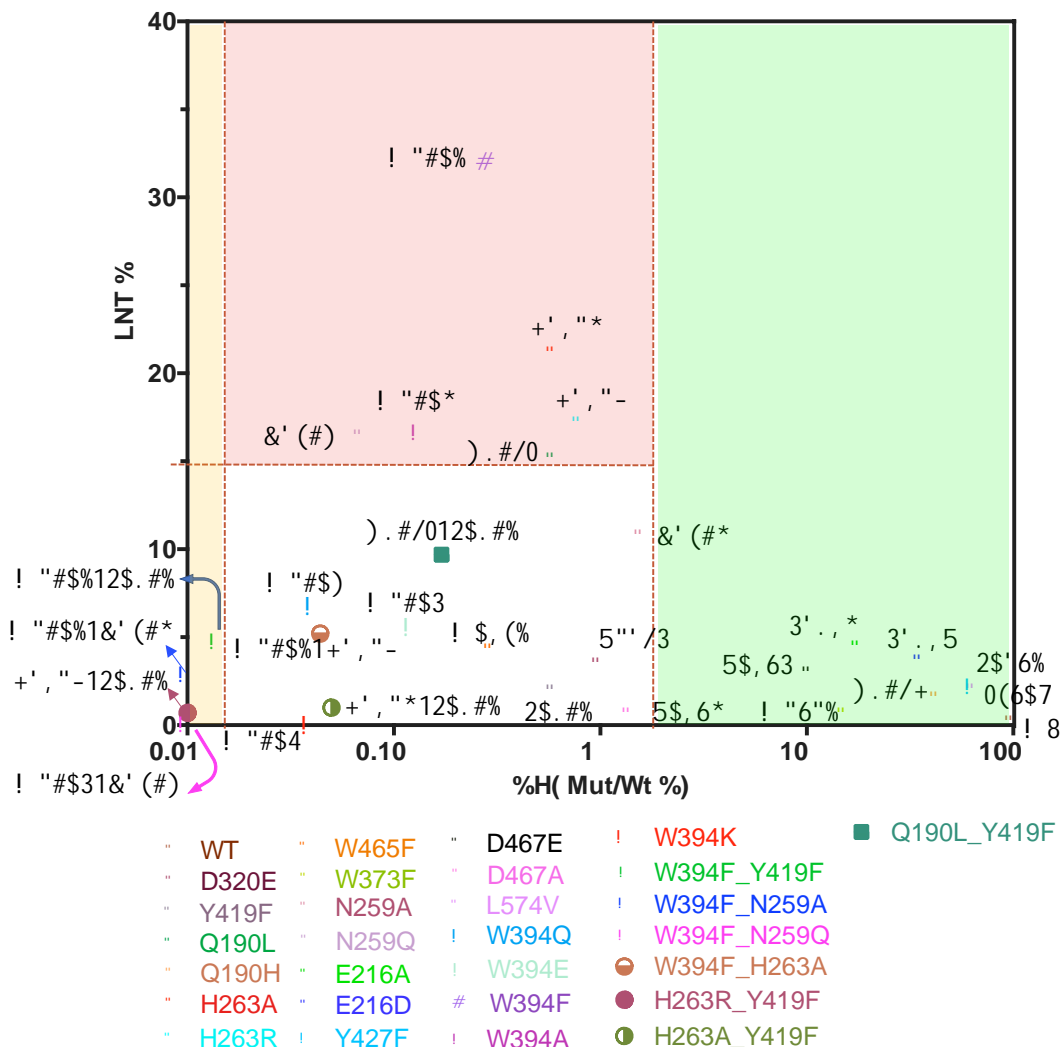


Figura 2. 21. Rendimientos de transglucosidación (%LNT) vs. actividad hidrolítica (H%) de los mutantes de LnbB.

El grafico obtenido ha permitido dividir los mutantes de LnbB en 3 grupos distintos en función de la relación observada entre ambas actividades: enzimas con una actividad hidrolítica residual inferior al 0.05% (Figura 2. 21, naranja), enzimas con una actividad hidrolítica residual superior al 1.6% (Figura 2. 22, verde) y aquellos con actividades comprendidas entre 0.05 y 1.6% (Figura 2. 21, rojo).

### Enzimas con actividad residual inferior al 0.05%.

Este grupo (Figura 2. 21, naranja) alberga los dobles mutantes W394F\_N259A, W394F\_N259Q y H263R\_Y419F los cuales presentan unos valores de %H del 0.02, 0.02 y <math>< 0.04\%</math> respectivamente. Por lo que atañe a la actividad TG, estas enzimas sintetizan LNT en rendimientos inferiores al 3%

estos muy inferiores a los determinados para las mutaciones simples correspondientes. Dados los resultados obtenidos, se considera aquellos mutantes con actividades inferiores al 0.05% inactivos, siendo estos incapaces de catalizar ninguna de las dos reacciones. Probablemente la combinación de estas mutaciones ha afectado notablemente a la unión o el posicionamiento del dador en los subsitios negativos del centro activo de las enzimas y/o ha afectado el estado de transición.

Ciertas mutaciones realizadas sobre el residuo Trp394 han dado lugar a enzimas prácticamente inactivas, siendo estas las variantes W394K y W394Q ya que presentan una retención de la actividad hidrolítica inferior al 0.04% en ambos casos. Al igual que los demás mutantes de este grupo estas variantes no son buenas candidatas para la síntesis de LNT, obteniendo un rendimiento de LNT del 6.8% con el mutante W394Q, siendo el compuesto indetectable con el mutante W394K.

### **Enzimas con una actividad hidrolítica residual (%H) entre 0.05 y 1.6%**

Las enzimas de este grupo (**Figura 2. 21**, rojo) presentan bajas actividades hidrolíticas, pero tienen comportamientos sintéticos diferentes en función de su localización. Las mutaciones realizadas en el subsitio -2 y clasificadas en este grupo son Q190L, N259Q, H263R y H263A. Estas variantes se caracterizan por mostrar una drástica disminución de la hidrólisis secundaria, ya que no hidrolizan el tetrasacárido formado. Concretamente estos mutantes retienen entre un 0.05 y un 0.8% de la actividad hidrolítica de la enzima parental. Esta baja actividad permitirá que el sustrato LNB-pNP pueda ser más accesible para la reacción TG, favoreciendo así esta reacción. Debido a las características proporcionadas por estas mutaciones, estas variantes presentan la capacidad de sintetizar LNT en rendimientos superiores al 15%.

Por otro lado, las mutaciones localizadas en el subsitio -1 son D320E, W394F, Y419F, W465F y D467A. Dentro de este grupo se encuentran ciertos residuos altamente conservados en las GH20 como el residuo asistente (Asp320) involucrado en la etapa catalítica, parte de la plataforma hidrofóbica (Trp394 y Trp465) y la tirosina Tyr419, residuos que jugarán un importante papel en la unión del dador. Pero también se encuentra el residuo Asp467, el cual no está conservado dentro de la familia, pero podría desarrollar un importante papel en la unión de LNB. Concretamente los mutantes D320E, Y419F, W465F y D467A a pesar de presentar una drástica reducción de la actividad hidrolítica no presentan una mejora notable en la síntesis de LNT (3.3, 2.8, 4.1 y 0.5% LNT respectivamente). No obstante, el mutante W394F, ha permitido sintetizar el tetrasacárido de interés con un rendimiento del 32% el cual perdura, sin ser hidrolizado, durante un período prolongado de tiempo. Debido a su posicionamiento estratégico, el residuo Trp394 interactuará mediante interacción catión-pi con el anillo oxazolina formado en los intermedios de reacción. Mediante la mutación W394F se reduce la hidrofobicidad del residuo, perturbando así la interacción entre éste y el sustrato. Esto afectará en la estabilización y

formación de los intermedios de reacción traduciéndose en una disminución de la actividad hidrolítica primaria y secundaria, hechos que favorecerán la actividad TG.

Dentro de este grupo también se encuentran los dobles mutantes W394F\_Y419F, W394F\_H263A, Q190L\_Y419F y H263A\_Y419F, reteniendo entre un 0.06 – 0.7% de la actividad hidrolítica de la enzima nativa. Todos los dobles mutantes estudiados muestran unos rendimientos de síntesis de LNT inferiores a los obtenidos con las mutaciones puntuales, sintetizando el tetrasacárido de interés con unos rendimientos comprendidos entre el 1 y el 9.7%.

Dadas las actividades determinadas para los mutantes W394A y W394E éstos se encontrarán clasificados en este grupo, ya que presentan una retención de la actividad hidrolítica de la enzima nativa del 0.13% y 0.12% respectivamente. Todo y presentar unos rendimientos de síntesis inferiores a los determinados para la mutación W393F, cabe destacar los resultados obtenidos con el mutante W394A el cual ha permitido sintetizar el compuesto de interés con un rendimiento del 16.6%. Por otro lado, la mutación W394E ha causado poco impacto sobre la actividad TG, dando lugar a unos rendimientos de síntesis de LNT del 5.6%.

### **Enzimas con una actividad hidrolítica residual (%H) superior al 1.6%**

Tras caracterizar la actividad hidrolítica se aprecia como ciertas mutaciones no han causado un impacto notable en esta actividad, concretamente en este grupo se analizarán los mutantes con actividades hidrolíticas residuales iguales y/o superiores al 1.6% (**Figura 2. 21**, verde).

Gran parte de los mutantes englobados en este grupo se encuentran localizados en el subsitio -2 (Q190H, E216A, E216D, D467E y L574V), a excepción de los mutantes W373F y Y427F situadas en el subsitio -1. Estas enzimas, al presentar actividades hidrolíticas considerables hidrolizarán el dador LNB-pNP con cierta rapidez restringiendo su acceso para la reacción TG. El tetrasacárido formado también se verá afectado por la elevada hidrólisis secundaria de estas enzimas, ya que será hidrolizado por ellas. Por estos motivos los mutantes de este grupo presentaran baja capacidad sintética, produciendo LNT en rendimientos inferiores al 5%.

Ciertamente existen posiciones que en función de la mutación realizada se englobarán en uno o otro grupo, estos son los casos de Q190H/Q190L y D467A/D467E. El residuo Gln190 se localiza en el subsitio -2 de la enzima estando involucrado en la unión del dador, ya que forma puentes de hidrógeno con Gal de LNB. El reemplazo de este residuo por una histidina puede estar sustituyendo las interacciones por puente de hidrógeno originales por una interacción de apilamiento, traduciéndose en un incremento de la unión y estabilización del sustrato. Esta hipótesis se ve respaldada por los resultados obtenidos,

ya que el mutante Q190H retiene un 43% de la actividad hidrolítica de la enzima wt, siendo el efecto causado sobre la reacción TG despreciable (rendimiento de LNT del 1.4%). Por otro lado, con la mutación Q190L se elimina cualquier posible interacción polar entre el residuo y el sustrato, perturbando así la unión entre ambos. Al eliminar puentes de hidrógeno en los subsitios dadores se está entorpeciendo la unión dador-enzima causando así una disminución de la actividad natural de la enzima, efecto que se traduce en una mejora de la actividad TG, como se ve reflejado en los resultados obtenidos en la caracterización del mutante.

Los mutantes D467E/D467A todo y encontrarse en grupos distintos no presentan resultados muy dispares en cuanto a transglucosidación. Este residuo localizado entre los subsitios -1 y -2, tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno bidentados con las unidades de Gal y GlcNAc de LNB, los cuales son eliminados al ser reemplazado por una alanina. Por otro lado, al sustituir este residuo por uno de mayor tamaño (glutamina) puede causar un entorpecimiento en el posicionamiento del sustrato, aunque la formación de puente de hidrógeno bidentado continuará siendo posible. La mutación D467A ha permitido disminuir la actividad de hidrólisis natural de la enzima en mayor grado que D467E (1.4 vs 10.4 de %H), ambas mutaciones no presentan resultados prometedores en la síntesis de LNT, produciendo el compuesto en unos rendimientos del 0.5 y 2.8% respectivamente.

Analizada la actividad hidrolítica y TG de los diferentes mutantes de LnbB, se ha podido identificar un fuerte compromiso entre ambas actividades, concluyendo que los mutantes con mayor capacidad transglucosídica retienen entre un 0.05 y un 1.6% la actividad hidrolítica de la enzima salvaje. Si bien este grupo alberga enzimas capaces de sintetizar el compuesto LNT con rendimientos muy distintos (6-32%), afirmamos que los biocatalizadores más prometedores para la síntesis de LNT deben de retener entre un 0.06 y un 1.6% de la actividad hidrolítica de la enzima salvaje, identificando 6 mutantes capaces de sintetizar el tetrasacárido con rendimientos superiores al 15% (W394F, Q190L, N259Q, H263A, H263R Y W394A). En base a los resultados obtenidos en esta tesis se considerarán aquellos mutantes con actividades inferiores al 0.05% inactivos en términos de hidrólisis y TG, y aquellos con actividades superiores al 1.6% demasiado hidrolíticos para ser empleados como biocatalizadores para la síntesis de LNT.

En este apartado se ha determinado que los mejores biocatalizadores de LnbB deben retener entre un 0.06 y un 1.6% la actividad hidrolítica de la enzima salvaje, esta relación entre la reacción de hidrólisis y la reacción TG podría ser un dato de gran utilidad para diseñar futuros ensayos de HTS, permitiendo fijar así un rango óptimo de TG. Éste una vez generada una librería de mutantes, permitirá identificar posibles biocatalizadores de LNT mediante la caracterización de su actividad hidrolítica, estudiando únicamente la actividad TG de aquellas variantes con actividades que se encuentren dentro del rango óptimo fijado.



## 2.5 Caracterización cinética de los mejores biocatalizadores

A lo largo de este capítulo se ha estudiado la actividad hidrolítica y TG de 30 nuevos mutantes de la enzima LnbB, identificando 6 biocatalizadores capaces de sintetizar el compuesto LNT con unos rendimientos superiores al 15%. Dentro de este grupo cabe destacar el mutante W394F, con el cuál se han obtenido los mejores rendimientos de síntesis de LNT (32% de LNT) reportados hasta el momento.

En esta sección se va a estudiar la actividad específica en modo transglicosidación ( $SA_T$ ) y a caracterizar los parámetros cinéticos en términos de hidrólisis y transglicosidación de aquellos mutantes con rendimientos de síntesis de LNT superiores al 15%.

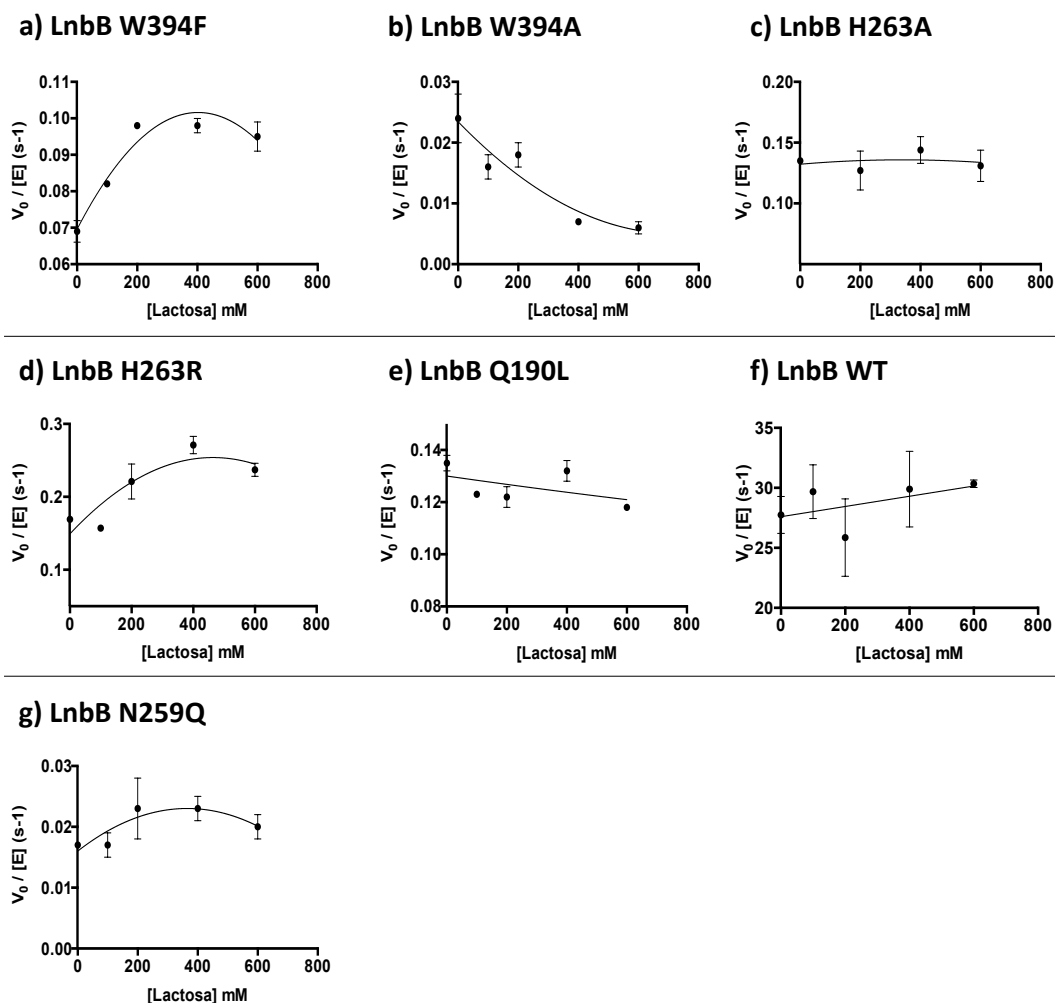
### 2.5.1 Determinación de la actividad específica de transglicosidación a distintas concentraciones de aceptor

La liberación del cromóforo pNP se da en la primera etapa del mecanismo de doble desplazamiento, etapa común tanto para la reacción de hidrólisis como para la reacción TG. Dada esta característica, la actividad específica calculada a partir de la liberación de pNP hará referencia a la actividad específica global de la enzima, es decir la suma de la actividad hidrolítica y TG. En ausencia de aceptor, la liberación de cromóforo se deberá exclusivamente a la actividad hidrolítica de la enzima, ya que debido a la especificidad enzimática no se da la autocondensación del dador, reflejando así la actividad específica de hidrólisis ( $SA_H$ ). Por otro lado, en presencia de aceptor la  $V_o$  determinada a partir de la liberación de pNP no reflejará únicamente la actividad TG de la enzima, sino que también incluirá la liberación de cromóforo procedente de la hidrólisis del dador, llamando a este parámetro actividad específica en modo transglicosidación ( $SA_T$ ).

Para poder evaluar el efecto que las mutaciones seleccionadas han causado sobre la actividad TG, en esta sección se estudiará la ratio aparente entre las actividades de transglicosidación y hidrólisis ( $SA_T/SA_H$ ). Existen diversas maneras de describir la ratio T/H en bibliografía, siendo las más realistas las determinadas a partir de las  $V_o$  de formación de los productos de TG y hidrólisis, o bien, aquella determinada a partir de las concentraciones de los productos de ambas reacciones a cierto instante de tiempo. Dado que la enzima LnbB cataliza la hidrólisis primaria del dador y la hidrólisis secundaria del producto LNT, no es posible determinar que concentración de LNB proviene exclusivamente de la reacción de hidrólisis de LNB-pNP, así como que concentración de dador ha sido consumida para la reacción de hidrólisis o TG. Por estos motivos, en este trabajo vamos a denominar a la ratio T/H "ratio aparente T/H", ya que su determinación se realizará en función de la liberación global de cromóforo.

Para este estudio se realizaron reacciones a una concentración fija de aceptor ( $250 \mu\text{M}$  LNB-pNP, concentración no saturante) en ausencia o presencia de aceptor ( $100\text{-}600 \text{ mM}$  de lactosa). Concretamente para la determinación de la ratio aparente se empleará la  $SA_T$  resultante de la reacción realizada a una concentración de lactosa de  $200 \text{ mM}$ , nombrando específicamente a este parámetro  $SA_{T200}$ . Este hecho nos permitirá comparar las ratios aparentes obtenidas con los diferentes mutantes, la cual nombraremos  $SA_{T200}/SA_H$ .

En la **Figura 2. 22** se presentan los gráficos obtenidos en las diferentes reacciones realizadas ( $250 \mu\text{M}$  LNB-pNP y  $0\text{-}600 \text{ mM}$  lactosa), mostrando la actividad específica global de la enzima en función de la concentración de lactosa en reacción.



**Figura 2. 22.** Determinación de la actividad específica global de los mutantes de LnbB. Condiciones de reacción: LnbB variable,  $250 \mu\text{M}$  LNB-pNP,  $0\text{-}600 \text{ mM}$  lactosa,  $50 \text{ mM}$  citrato/ $50 \text{ mM}$  fosfato a pH 4.5,  $30^\circ\text{C}$ .

En la **Figura 2. 22** se observa como los mutantes presentan diferentes comportamientos frente a las distintas concentraciones de lactosa analizadas. Las enzimas WT y el mutante H263A no presentan una dependencia de SA (actividad específica global) frente a la concentración de lactosa empleada, ya que los valores del parámetro permanecen prácticamente constantes. Por otro lado los mutantes W394F, H263R y N259Q presentan un incremento de sus SA a medida que se aumenta la concentración de lactosa, alcanzando su máximo entre 200-400 mM de aceptor. Por el contrario, los mutantes W394A y Q190L muestran la tendencia opuesta, identificando una disminución de SA a medida que se incrementa la concentración de aceptor. Estos resultados podrían sugerir que la lactosa podría actuar como inhibidor de la actividad enzimática, efecto que se vería acentuado en el mutante W394A.

Una vez determinadas las SA, se determinarán los valores de  $SA_{T200}$  y  $SA_H$  necesarios para calcular la ratio aparente  $SA_{T200}/SA_H$ . Para este parámetro se plantean tres escenarios posibles: i) mutantes con una ratio aparente  $> 1$  para aquellas enzimas transglicosídicas, ii) T/H igual a 1 para la enzima WT, iii) y  $T/H < 1$  para aquellos mutantes donde la lactosa actúe como inhibidor de la actividad enzimática. En la **Tabla 2. 8** se muestran los valores de  $SA_H$ ,  $SA_{T200}$  y la ratio aparente  $SA_{T200}/SA_H$  determinadas para cada mutante.

**Tabla 2. 8.** Actividades específicas ( $SA_{T200}$  y  $SA_H$ ) y determinación de la ratio aparente entre éstas de los mutantes seleccionados.

Mutante	$SA_H^1 (s^{-1})$	$SA_{T200}^2 (s^{-1})$	Ap. T/H ratio <sup>3</sup>
WT	$27.7 \pm 1.54$	$27.96 \pm 2.63$	1.0
W394F	$0.069 \pm 0.003$	$0.098 \pm 0.0001$	1.4
W394A	$0.024 \pm 0.004$	$0.018 \pm 0.002$	0.8
H263R	$0.169 \pm 0.003$	$0.22 \pm 0.02$	1.3
H263A	$0.135 \pm 0.001$	$0.13 \pm 0.02$	0.9
N259Q	$0.017 \pm 0.001$	$0.023 \pm 0.005$	1.3
Q190L	$0.135 \pm 0.003$	$0.122 \pm 0.004$	0.9

<sup>1</sup> Condiciones de reacción  $SA_H$  at 250  $\mu$ M LNB-*p*NP, 50 mM tampón citrato / 50 mM fosfato, pH 4.5 and 30 °C. <sup>2</sup> Condiciones de reacción  $SA_{T200}$  at 250  $\mu$ M LNB-*p*NP, 200 mM lactosa, 50 mM tampón citrato / 50 mM fosfato, pH 4.5 and 30 °C. <sup>3</sup> Ratio T/H aparente ( $SA_{T200}/SA_H$ ),

El mutante W394F es el que presenta una mayor ratio aparente  $SA_{T200}/SA_H$ , siendo este resultado consistente ya que ésta es la variante más transglicosídica identificada en esta tesis (32% de LNT). Durante el estudio de las SA (**Figura 2. 22 y Tabla 2. 8**) se había observado como los mutantes W394F, H263R y N259Q presentaban la misma tendencia, presentando también unas ratios aparente T/H muy similares (1.3-1.4). Por otro lado, para los mutantes W394A y Q190L se había observado lo que podría ser un posible efecto de inhibición, hipótesis que se vería reflejada en las ratios aparentes

determinadas (<1). El mutante H263A también presenta una ratio inferior a 1, sugiriendo que la reacción TG no se va visto favorecida por la mutación.

Tras la determinación de la ratio aparente T/H de los mutantes seleccionados, concluimos que los mutantes que han permitido desbalancear el equilibrio natural T/H hacia la reacción de síntesis son W394F, H263R y N259Q.

## 2.5.2 Determinación de los parámetros cinéticos

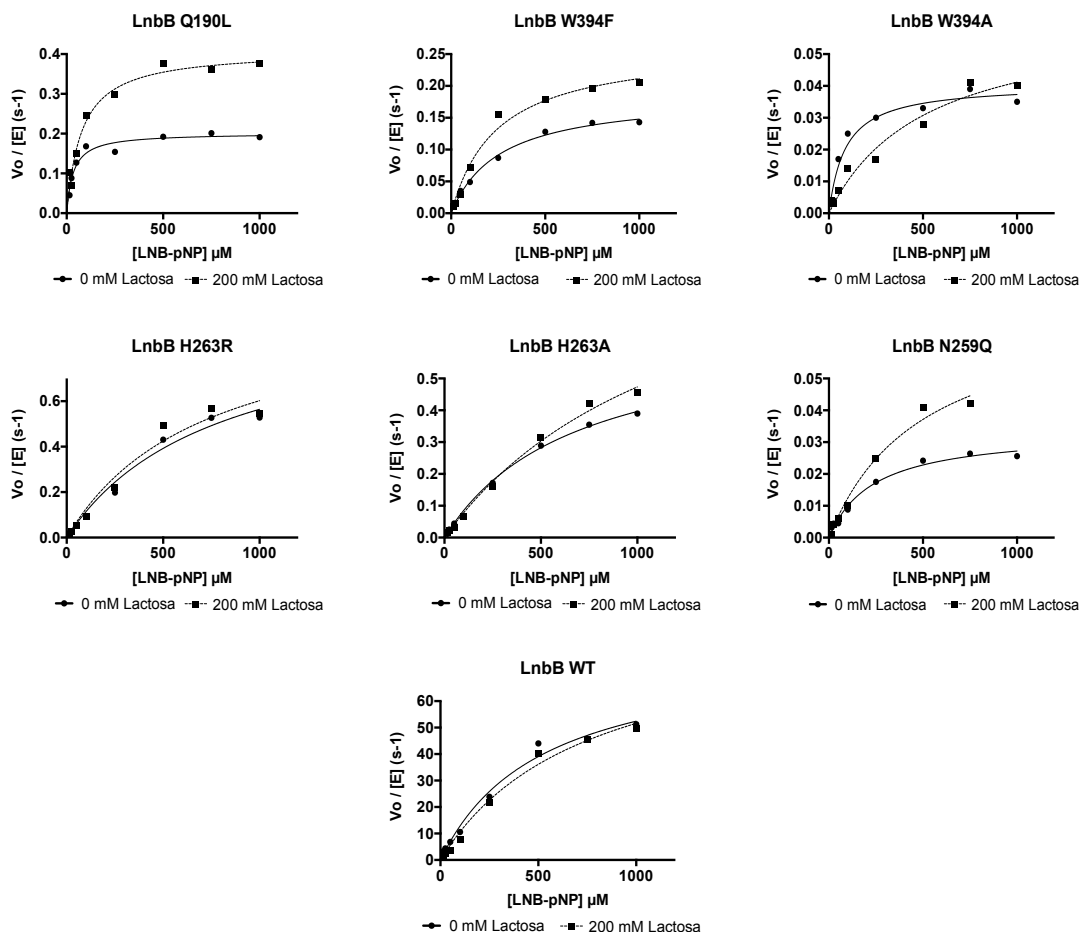
En este apartado se determinarán los parámetros cinéticos  $k_{cat}$  y  $K_M$  de las reacciones de hidrólisis y en modo TG de los mutantes seleccionados (W394F, W394A, H263R, H263A, N259Q, Q190L), realizando este cálculo a partir de las  $V_o$  obtenidas en función de la liberación de pNP.

Para la actividad hidrolítica, se realizaron reacciones empleando una concentración de dador variable (15 a 1000  $\mu$ M LNB-pNP) en ausencia de aceptor. Para la reacción en modo TG se utilizaron las mismas concentraciones de dador (entre 15 – 1000  $\mu$ M) en presencia de una concentración de constante de aceptor (lactosa 200 mM). Las cinéticas obtenidas siguen una dependencia hiperbólica frente la concentración de dador, por lo que los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (**Figura 2. 23**). En la **Tabla 2. 9** se muestran los valores de las constantes cinéticas determinadas para los mutantes LnbB

**Tabla 2. 9.** Parámetros cinéticos de los mutantes de LnbB para las reacciones de hidrólisis y en modo TG.

Mutante	Actividad hidrolítica			Actividad en modo TG			T/H ( $k_{cat}/K_M$ ) <sup>1</sup>
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
WT	80 ± 8	520 ± 120	1.53·10 <sup>5</sup>	90 ± 13	750 ± 200	1.20·10 <sup>5</sup>	0.8
W394F	0.186 ± 0.008	260 ± 30	7.18·10 <sup>2</sup>	0.26 ± 0.02	240 ± 52	1.09·10 <sup>3</sup>	1.5
W394A	0.041 ± 0.003	87 ± 22	4.58·10 <sup>2</sup>	0.06 ± 0.01	530 ± 190	1.19·10 <sup>2</sup>	0.3
H263R	1.0 ± 0.2	780 ± 310	1.29·10 <sup>3</sup>	1.0 ± 0.2	720 ± 300	1.44·10 <sup>3</sup>	1.1
H263A	0.67 ± 0.03	670 ± 60	9.82·10 <sup>2</sup>	1.08 ± 0.18	1280 ± 320	8.93·10 <sup>2</sup>	0.9
N259Q	0.034 ± 0.002	235 ± 42	1.45·10 <sup>2</sup>	0.07 ± 0.01	490 ± 150	1.50·10 <sup>2</sup>	1.0
Q190L	0.201 ± 0.009	34 ± 7	5.93·10 <sup>3</sup>	0.41 ± 0.02	78 ± 14	5.24·10 <sup>3</sup>	0.9

<sup>1</sup>Ratio aparente T/H calculada a partir del parámetro  $k_{cat}/K_M$  determinado en la reacción de hidrólisis y TG. Condiciones reacción hidrólisis: 15-1000  $\mu$ M LNB-pNP, tampón 50 mM citrato/50 mM fosfato pH 4.5, 30°C. Condiciones reacción TG: 15-1000  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, tampón 50 mM citrato/50 mM fosfato pH 4.5, 30°C.



**Figura 2. 23.** Reacciones de Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos de los mutantes de LnbB seleccionados. Condiciones reacción hidrólisis: 15-1000  $\mu\text{M}$  LNB-pNP, tampón 50 mM citrato/50 mM fosfato pH 4.5, 30°C. Condiciones reacción TG: 15-1000  $\mu\text{M}$  LNB-pNP, 200 mM lactosa, tampón 50 mM citrato/50 mM fosfato pH 4.5, 30°C.

Determinados los parámetros cinéticos para la reacción de hidrólisis, se aprecia como todas las mutaciones estudiadas presentan unos valores de  $k_{\text{cat}}$  notablemente inferiores a los obtenidos para la enzima salvaje, siendo los casos más extremos las variantes W394A y N259Q. En el caso de  $K_M$ , se observa como los mutantes presentan valores inferiores a los obtenidos para la enzima wt, a excepción de las variantes H263A y H263R, indicando que estas mutaciones han permitido incrementar la afinidad enzima-sustrato. Dado que la ratio  $k_{\text{cat}}/K_M$  permite evaluar la eficiencia catalítica, en este caso de la reacción de hidrólisis, se concluye que los mutantes H263R y Q190L son aquellos que retienen en mayor grado la actividad hidrolítica de la enzima salvaje ya que exhiben unos valores de  $k_{\text{cat}}/K_M$  dos órdenes de magnitud inferiores a los de la enzima salvaje, siendo de tres ordenes inferior para los demás mutantes.

Determinados los parámetros cinéticos en presencia de aceptor (lactosa), se observa como el mutante W394A experimenta un aumento significativo de la  $K_M$  aparente del dador (aproximadamente 6 veces superior a la obtenida en la reacción de hidrólisis), mientras que para los demás mutantes la influencia de la lactosa sobre la  $K_M$  aparente para el dador ha sido inferior ( $\leq 2$  veces). Estos resultados sugerirían que la mutación W394A podría causar una pérdida de afinidad enzima-dador en presencia de aceptor en reacción. Por otro lado, los valores de  $K_M$  determinados para el mutante W394F indican que la lactosa no modifica la afinidad enzima-dador, ya que los valores de  $K_M$  determinados en ambas reacciones no presentan prácticamente variación.

Tras determinar los valores de  $k_{cat}$  en la reacción en modo transglucosidación, se observa de manera generalizada, como los mutantes presenta un incremento de la constante en presencia de aceptor. Ciertamente, este resultado es esperado ya que en presencia de aceptor la liberación de pNP sucederá debido a la reacción de hidrólisis y a la reacción TG. El cálculo de la ratio aparente T/H determinado a partir de la relación  $k_{cat}/K_M$  para ambas reacciones sigue el mismo perfil que el determinado en la sección anterior, apreciando de nuevo como el mutante W394F es aquel con mayor tendencia hacia la reacción TG.

## 2.6 Caracterización del mutante W394F

Tras caracterizar numerosos mutante de la enzima LnbB el mejor biocatalizador para la síntesis de LNT identificado en este trabajo ha sido el mutante W394F, sintetizando el tetrasacárido deseado con unos rendimientos del 32%. En esta sección se estudiará la influencia del pH sobre la reacción TG, así como la regioselectividad del nuevo enlace formado por la variante W394F de LnbB, para corroborar así que el producto sintetizado es el deseado (LNT).

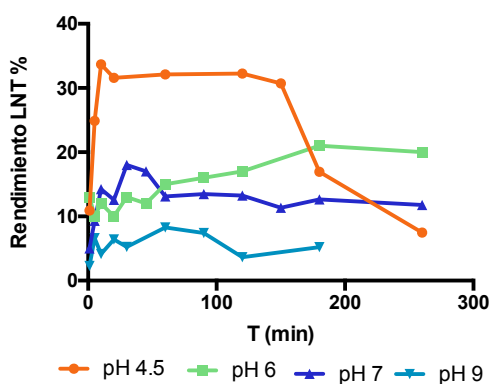
### 2.6.1 Influencia del pH en la reacción TG

Trabajos publicados<sup>114,115</sup> han revelado como el pH puede ser un parámetro importante en la reacción TG. La alteración del pH en las reacciones enzimáticas puede modificar el estado de ionización del centro activo de la proteína, pudiendo influir notablemente en la actividad enzimática, en el equilibrio TG/H natural de la enzima, en la hidrólisis secundaria, etc. La influencia del pH sobre la reacción TG fue estudiada por Bonnin y colaboradores con la enzima exo- $\beta$ 1,4-galactanasa de *Aspergillus. aculeatus*. En este trabajo los autores no únicamente determinaron la existencia de pH óptimos independientes para la reacción de hidrólisis (pH 3.5) y TG (pH 7), sino que identificaron que el grado de polimerización

alcanzado en la reacción de síntesis era dependiente del pH, sugiriendo que el grado de ionización de la enzima y/o del sustrato, tendría un efecto determinante en la etapa de unión enzima-sustrato<sup>115</sup>.

Hasta el momento las reacciones TG habían sido estudiadas a pH 4.5, siendo este el pH óptimo de la reacción de hidrólisis de la enzima LnbB. Teniendo en cuenta la importancia que puede jugar este parámetro, se realizó el estudio de la actividad TG del mutante W394F a diferentes pH de reacción (6, 7 y 9) empleando las condiciones de reacción estándares de transglucosidación (1  $\mu$ M LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 30°C).

En la **Figura 2. 24** se muestran los rendimientos de LNT obtenidos con el mutante W394F a los diferentes pHs estudiados (4.5, 6, 7 y 9)



**Figura 2. 24.** Caracterización de la actividad TG para el W394F de LnbB.

Se muestran los rendimientos de LNT obtenidos para al realizar reacciones TG a los pHs 4.5, 6, 7 y 9. La monitorización del compuesto LNT se ha realizado mediante HPLC-MS. Condiciones de reacción: 1  $\mu$ M W394F LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 30°C, pH variable.

En la **Tabla 2.10** se recogen los rendimientos máximos de LNT obtenidos con el mutante W394F a los distintos pHs estudiados.

**Tabla 2.10.** Rendimientos de TG obtenidos con el mutante W394F de LnbB a diferentes pH de reacción.

Mutante	pH	Rendimiento máx LNT (%)	Intervalo de tiempo (min)
W394F	4.5	32	60-150
	6	20	30-420
	7	18	30-45
	9	7.6	60-420

Condiciones de reacción: 1  $\mu$ M LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 30°C, pH variable. Para todos los pHs estudiados el error asociado al rendimiento de LNT máx ha sido  $\leq$  al 10%.

Puede apreciarse como a los distintos pHs estudiados el mutante W394F muestra actividad TG sintetizando el compuesto LNT con rendimientos superiores al 15% en todos los casos a excepción de la reacción realizada a pH 9. Comparando los perfiles de reacción a los nuevos pH estudiados con el obtenido a pH 4.5, se obtienen ciertas diferencias interesantes (véase el capítulo de Anexos). En las reacciones realizadas a pH 6, 7 y 9 las concentraciones de LNB en reacción son inferiores a las obtenidas a pH 4.5, indicando una reducción de la actividad hidrolítica. Otra apreciación importante es la estabilidad del compuesto LNT a lo largo del tiempo, el cual es hidrolizado en menor grado que a pH 4.5, indicando la reducción de la hidrólisis secundaria de la enzima. Pese a que a pH 6, 7 y 9 el mutante W394F presenta una menor actividad hidrolítica primaria y secundaria que a pH 4.5, no se traduce en una mejora de la actividad TG, indicando que a pH más alcalinos de 4.5 la enzima podría ser catalíticamente menos eficiente.

La realización de la reacción TG a pHs más alcalinos que 4.5 no ha permitido incrementar los rendimientos de síntesis de la enzima LnbB, siendo el pH 4.5 aquel que permite sintetizar el tetrasacárido de interés en mayores rendimientos (32% de LNT).

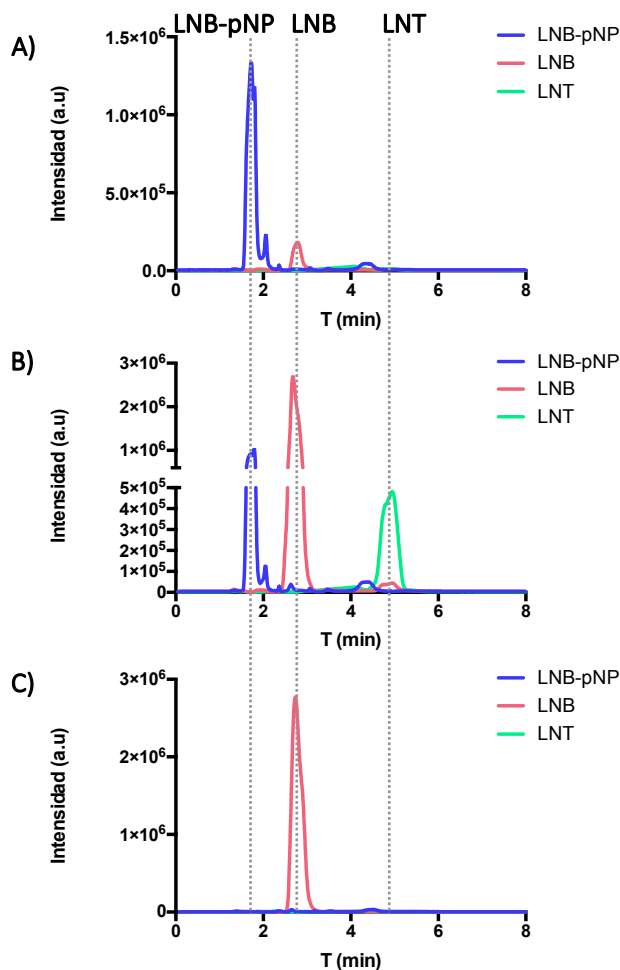
### 2.6.2 Estudio de la regioselectividad del nuevo enlace formado por el mutante W394F de LnbB

Para corroborar que el tetrasacárido sintetizado por el mutante W394F es el de interés (LNT), se estudiará la regioselectividad del nuevo enlace glicosídico formado por el mutante. Para este estudio vamos a tomar ventaja de la especificidad presentada por la enzima LnbB salvaje, la cual hidroliza de manera natural el enlace central  $\beta$ 1,3 localizado entre los disacáridos LNB y lactosa del compuesto LNT, mostrándose inactiva para otros enlaces como  $\beta$ 1,4<sup>96</sup>.

Para este estudio se realizó la reacción TG con el mutante W394F, la cual fue tratada a posteriori con la enzima LnbB wt para identificar así si el producto sintetizado era sustrato para ésta. Para eliminar la posibilidad de que el tetrasacárido fuera hidrolizado por el propio mutante W394F previamente al tratamiento con la enzima wt, se realizó la inactivación térmica de la reacción, introduciendo a continuación la enzima wt.

En la **Figura 2. 25** se muestran los cromatogramas obtenidos a tiempo inicial y tras 90 minutos de reacción con la enzima W394F, así como el cromatograma obtenido tras tratar la reacción con la enzima WT.





**Figura 2. 25.** Monitorización mediante HPLC-MS (EI-MS) de la reacción TG de la enzima LnbB W394F para el estudio de la regioselectividad del producto formado. Condiciones reacción: 1  $\mu$ M LnbB W394F, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM Lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, T 30°C. A) reacción a tiempo 0; B) reacción a tiempo 90 minutos seguido de inactivación térmica; C) adición de 1  $\mu$ M de la enzima LnbB WT tras 15 min de reacción.

Tras 90 minutos de reacción se aprecia la formación del compuesto LNT (verde, **Figura 2. 25, B**). A continuación, la muestra se sometió a tratamiento térmico (10 min, 100°C) para inactivar la enzima LnbB W394F, una vez atemperada la muestra se adicionó la enzima LnbB wt (1  $\mu$ M). Tras 15 minutos de reacción con la enzima salvaje el pico correspondiente a LNT y LNB-pNP han desaparecido, identificando únicamente el compuesto LNB, siendo esto consecuencia de la reacción de hidrólisis catalizada por la enzima LnbB wt (**Figura 2. 25, C**).

Gracias a los resultados obtenidos se concluye que el producto sintetizado por la enzima LnbB W394F se trata tetrasacárido LNT, ya que el producto resultante de la reacción TG es hidrolizado por la enzima

wt la cual presenta una elevada especificidad para hidrolizar en enlace  $\beta$ 1,3 presente entre las unidades de LNB y lactosa de LNT.

## 2.7 Conclusiones del capítulo

Tras realizar el estudio estructural y de secuencia de la enzima LnbB se han identificado 13 posiciones involucradas en la unión y estabilización del dador LNB (Gln190, Glu216, Asn259, His263, Asp320, Glu321, Trp373, Trp394, Tyr419, Tyr427, Trp465, Asp467 y Leu574).

Para estudiar la influencia de los residuos seleccionados estos han sido mutados, generando 19 nuevas variantes de la enzima LnbB, de las cuales se ha estudiado su actividad hidrolítica frente a LNB-pNP y su actividad TG frente a LNB-pNP y lactosa. Tras su caracterización se han identificado 6 mutantes (W394F, N259A, Q190L, N259Q, H263R y H263A) capaces de sintetizar el compuesto de interés (LNT) en unos rendimientos superiores al 15%.

Para intentar potenciar la actividad sintética de los 5 mutantes más transglicosídicos se han realizado dobles mutantes, resultantes de la combinatoria de ciertas mutaciones simples. De nuevo se ha evaluado su actividad hidrolítica y TG determinando que las dobles mutaciones no permitían incrementar los rendimientos de síntesis de los mutantes simples.

Caracterizada la actividad sintética de las 26 nuevas variantes de la enzima LnbB, se concluye que el mutante W394F es aquel con mayor carácter transglicosídico, sintetizado el compuesto LNT con unos rendimientos del 32%. Para estudiar más detalladamente esta posición, se sustituyó este residuo por aminoácidos con distintas características fisicoquímicas (Ala, Lys, Gln y Glu), obteniendo en todos los casos rendimientos inferiores a los reportados con W394F.

Todo y que el mutante W394F es aquel que presenta un mayor carácter transglicosídico merecen especial atención los mutantes H263R y H263A. Estas variantes sintetizan el compuesto LNT con rendimientos del 21 y 17% respectivamente manteniéndose el tetrasacárido estable en reacción, considerando los resultados obtenidos estos mutantes podrían ser unos biocatalizadores interesantes desde un punto de vista operacional.

Gracias a la caracterización de la actividad hidrolítica y TG de todos los mutantes realizados en esta tesis concluimos que las variantes con mayor capacidad sintética retienen entre un 0.07% y un 1.6% la actividad hidrolítica de la enzima wt, siendo este dato de gran utilidad para la realización de estudios de HTS (high throughput screening).

Se ha determinado la ratio aparente T/H de los mejores biocatalizadores siendo la mutación W394F aquella que permite un mayor desequilibrio de la ratio T/H respecto la enzima wt hacia una actividad de síntesis.

Se ha estudiado la regioselectividad del producto de transglicosidación formado por el biocatalizador W394F. Mediante la utilización de la enzima LnbB wt se ha determinado que el nuevo enlace O-glicosídico formado entre LNB-pNP y la lactosa es  $\beta$ 1,3, confirmando, que el producto sintetizado se trata del tetrasacárido LNT.

## Capítulo 3 Exploración de los subsitios positivos de LnbB

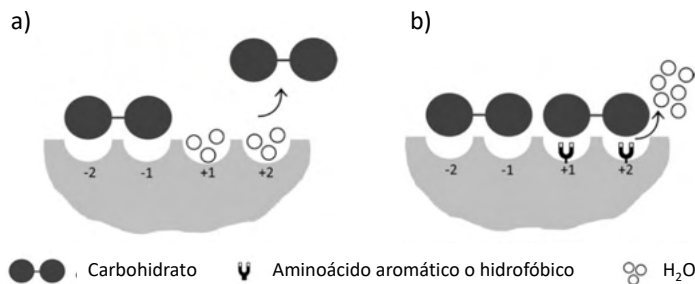
---



En las últimas décadas el interés por la síntesis de oligosacáridos ha incrementado debido a sus potenciales usos como productos de alto valor añadido (aditivos alimentarios, prebióticos, etc).

Las GH son una familia de enzimas altamente empleadas en la síntesis de oligosacáridos mediante la reconversión de su actividad nativa de hidrólisis hacia la actividad de transglicosidación. En el capítulo anterior se exploró el rediseño de los subsitios negativos de la enzima LnbB, identificando el mutante W394F como el biocatalizador más prometedor para la síntesis de LNT (32% de rendimiento del tetrasacárido). Con la finalidad de intentar mejorar estos resultados en este capítulo se estudiará el rediseño de los subsitios positivos de la enzima LnbB.

Actualmente se tienen claras evidencias del importante papel que juegan los aminoácidos localizados en los subsitios positivos en la reacción TG. El rediseño de los subsitios positivos de las enzimas tiene dos objetivos principales; i) incrementar la afinidad entre la enzima y el aceptor, ii) y/o reducir el impedimento estérico de la región, creando así nuevos subsitios capaces de acomodar nuevos aceptores, por ejemplo, de mayor longitud. El primer objetivo es el más empleado para incrementar la ratio T/H de las GHs, siendo la estrategia más empleada la introducción de residuos aromáticos y hidrofóbicos en los subsitios positivos de la enzima. Estas modificaciones permitirán crear nuevas interacciones entre la proteína y el aceptor favoreciendo así la afinidad entre éstos, lo que podría influenciar positivamente en la reacción TG. Como se muestra en la **Figura 3. 1** estas mutaciones permiten incrementar la afinidad enzima-aceptor a la vez que disminuyen la difusión de las moléculas de agua hacia el centro activo de la enzima, potenciando la reacción TG<sup>76</sup>.



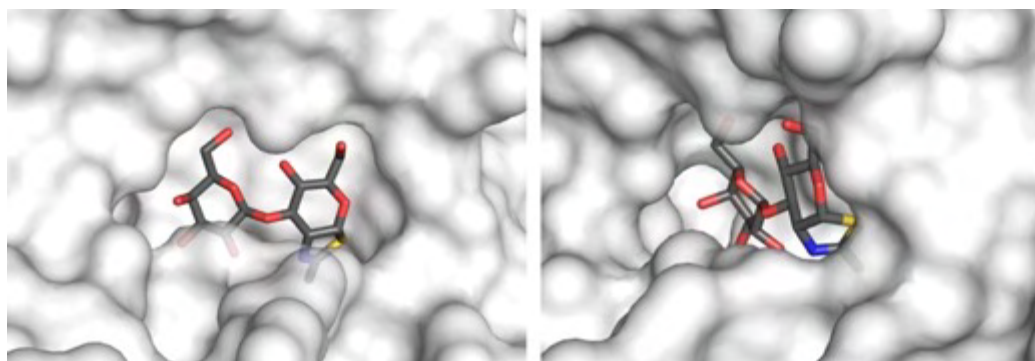
**Figura 3. 1** Estrategia empleada para mejorar la actividad TG de las GH mediante la introducción de aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos en los subsitios aceptores. Figura adaptada de<sup>76</sup>

El rediseño de los subsitios positivos ha sido empleado en diversas proteínas para distintas finalidades. Con el objetivo de obtener una transarabinofuranosidasa eficiente de *Thermobacillus xylanilyticus* (TxAbf), Fauré y colaboradores estudiaron la influencia de las mutaciones G179F (+1) y N216Trp (+2). Con estas sustituciones, se está incrementado la hidrofobicidad de la región aceptora, efecto que podría traducirse en una mayor afinidad enzima-aceptor y en un mejor posicionamiento del aceptor.

Caracterizada su actividad sintética, los autores concluyeron que la mejora proporcionada por las nuevas variantes (13% vs 7% enzima nativa, rendimientos de transglucosidación del producto benzil  $\alpha$ -L-Arabinofuranósido-(1,2)- $\alpha$ -D-xilapiranosil (Bn  $\alpha$ -L-Araf-(1,2)- $\alpha$ -D-Xylp)) no era suficiente como para obtener una transarabinofuranosidasa eficiente. No obstante, identificaron cómo la combinación de mutaciones en la región dadora y aceptora daba lugar a un incremento notable de los rendimientos de TG de las nuevas variantes (superiores al 60% en producto de transglucosidación)<sup>116</sup>.

En el caso de la xilanasa de *Pseudomonas cellulosa* (Xyn10, GH10) los mismos autores reemplazaron los residuos Asn182 (subsitio +2), Tyr255 (subsitio +3) y Tyr220 (subsitio +4) por alaninas. Tras caracterizar los nuevos mutantes, los autores concluyeron que la reducción de la hidrofobicidad de la cavidad aceptora causaba una disminución en la afinidad enzima-aceptor. Además estas mutaciones facilitan la entrada de moléculas de agua al centro activo de la enzima, acelerando así la hidrólisis del dador causando un fuerte impacto negativo en la actividad TG de la enzima<sup>79</sup>.

Gracias a la resolución de la estructura cristalográfica de la enzima LnbB en complejo con el inhibidor LNB-tioxazolina (PDB 4JAW) se observa que la cavidad de unión del dador es estrecha y definida, explicando así que LnbB sea específica para la molécula LNB<sup>98</sup>. Por otro lado, la enzima presenta una cavidad de unión al aceptor amplia y abierta (**Figura 3. 2**) y no específica para un ligando específico permitiendo así, que la enzima acepte diferentes sustratos como lacto-N-hexosa (LNH) o el derivado LNT-piridilamino<sup>96,98,117,118</sup>.



**Figura 3. 2.** Visualización de la proteína LnbB con el ligando LNB-tiazolina (PDB 4JAW)

Dada la ausencia de subsitios aceptores definidos en LnbB, en este capítulo se propone su diseño racional empleado métodos computacionales con el fin de identificar residuos, la mutación de los cuales pueda dar lugar a un incremento de la afinidad enzima-aceptor. Concretamente para el rediseño de los subsitios aceptores de la enzima se empleó el software BINDSCAN desarrollado en el Laboratorio de Bioquímica de IQS.

## 3.1 Diseño *in silico* de los mutantes de los subsitios positivos

### 3.1.1 BINDSCAN como herramienta *in silico*

BINDSCAN es una herramienta *in silico* diseñada para predecir mutaciones a lo largo de la secuencia de aminoácidos de una proteína, las cuales permitirían incrementar la afinidad de unión (descrita como  $\Delta G$ ) entre ésta y un ligando definido. El objetivo de este algoritmo es medir la afinidad entre una proteína y un sustrato, empleando para ello ciertas funciones de puntuación, siguiendo una metodología exhaustiva y sistemática. Debido a su funcionalidad BINDSCAN es una potencial herramienta para la reconversión de GH en TG. Dado que el algoritmo BINDSCAN no está publicado, la metodología seguida por el software se explicará de manera genérica.

La metodología descrita por este algoritmo se puede dividir en tres etapas tal como se observa en la **Figura 3. 3**. La primera de ellas es la creación de una librería de mutantes a partir de la estructura tridimensional enzima-ligando de interés. Esta librería será generada en la región de la proteína predefinida por el usuario, donde cada uno de los residuos presentes en ésta, serán mutados por aquellos aminoácidos naturales definidos. En la segunda etapa, BINDSCAN generará 30 modelos estructurales de cada uno de los mutantes de la librería, siendo construidos por homología a la estructura tridimensional de la enzima salvaje. Y en la última etapa se evaluará la afinidad de unión ( $\Delta G$ ) entre los mutantes y el ligando de interés. Concretamente para cada mutante el algoritmo determinará los valores de  $\Delta G$  de cada uno de los 30 modelos estructurales obtenidos previamente, dando como valor final el promedio de éstos.

En esta tesis se ha seleccionado que para cada residuo en estudio éste sea mutado a todos los aminoácidos naturales, por lo que para cada uno de ellos se determinará la  $\Delta G$  de la enzima nativa. Considerando el número de posiciones estudiadas se obtendrán diferentes valores de  $\Delta G$  de la enzima wt los cuales se promediarán para poderlos comparar así con los obtenidos con los demás mutantes generados.



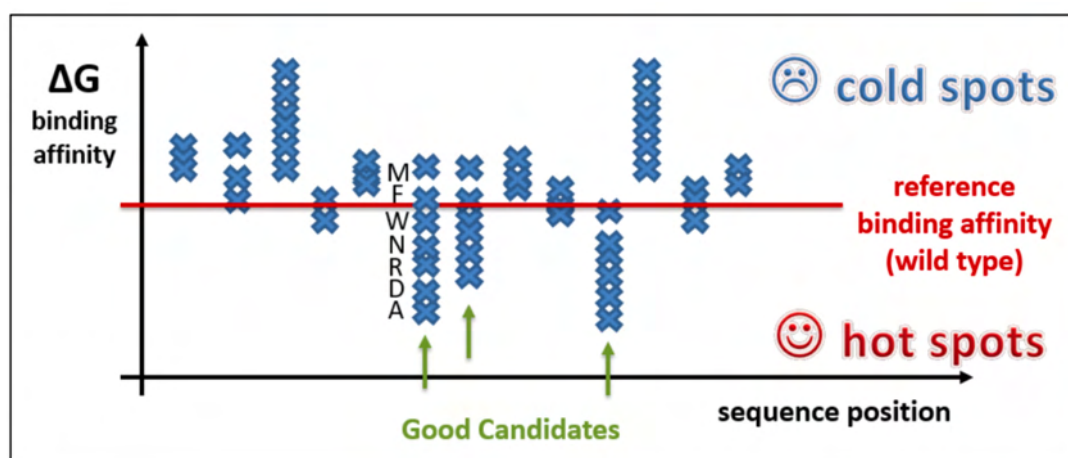
**Figura 3. 3.** Resumen de las tres etapas seguidas por el algoritmo BINDSCAN.

Donde en primer lugar se generará la librería de mutantes. Seguido de la etapa de generación de los modelos estructurales 3D enzima-ligando, evaluando su energía de afinidad (Kcal/mol) en la última etapa.



Finalizado este cálculo, BINDSCAN graficará la afinidad de unión ( $\Delta G$  (kcal/mol)) determinada para cada mutante y la enzima wt ( $\Delta G$  de referencia) frente el ligando de interés, pudiendo identificar así qué aminoácidos de la región estudiada pueden tener un mayor efecto en la afinidad enzimática.

En la **Figura 3. 4** se muestra un ejemplo del gráfico de resultados generado por BINDSCAN, donde en forma de línea horizontal se presentan los valores de  $\Delta G$  determinados para la enzima wt (línea roja). Aquellos mutantes con  $\Delta G$  inferiores a las determinadas para la enzima nativa serán nombrados *hot spots*, ya que dada su rebaja de  $\Delta G$  presentarán una mayor afinidad por el sustrato estudiado que la enzima salvaje. Por lo contrario, los mutantes con  $\Delta G$  superiores, los nombraremos *cold spots*, presentarán una menor afinidad.



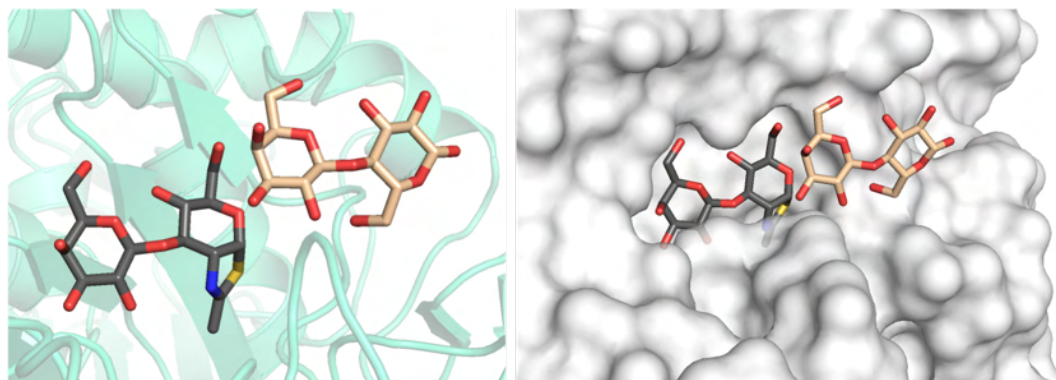
**Figura 3. 4.** Visualización ejemplo de los resultados generados por BINDSCAN. En el eje X, se muestran la secuencia de aminoácidos. En el eje Y se muestran los valores  $\Delta G$  promedio obtenidos de los 30 modelos estructurales de cada una de las mutaciones (Vega 2019, comunicación personal).

## 3.2 BINDSCAN para el rediseño de los subsitios positivos de LnbB

Actualmente en la base de datos PDB únicamente encontramos dos estructuras cristalográficas de la proteína LnbB resueltas, la enzima en su forma apo (PDB: 4H04) y en complejo con el inhibidor LNB-tiazolina (PDB: 4JAW), no estando reportada su estructura en presencia de lactosa.

Como se ha mencionado anteriormente, BINDSCAN requiere como *input* la estructura tridimensional enzima-ligando que se quiera evaluar. Dado que en esta ocasión el foco de estudio es la reacción TG será necesario crear un modelo estructural de la enzima en complejo con el dador y el receptor (lactosa). Para la creación de este modelo, se iniciaron los estudios con la estructura cristalográfica PDB

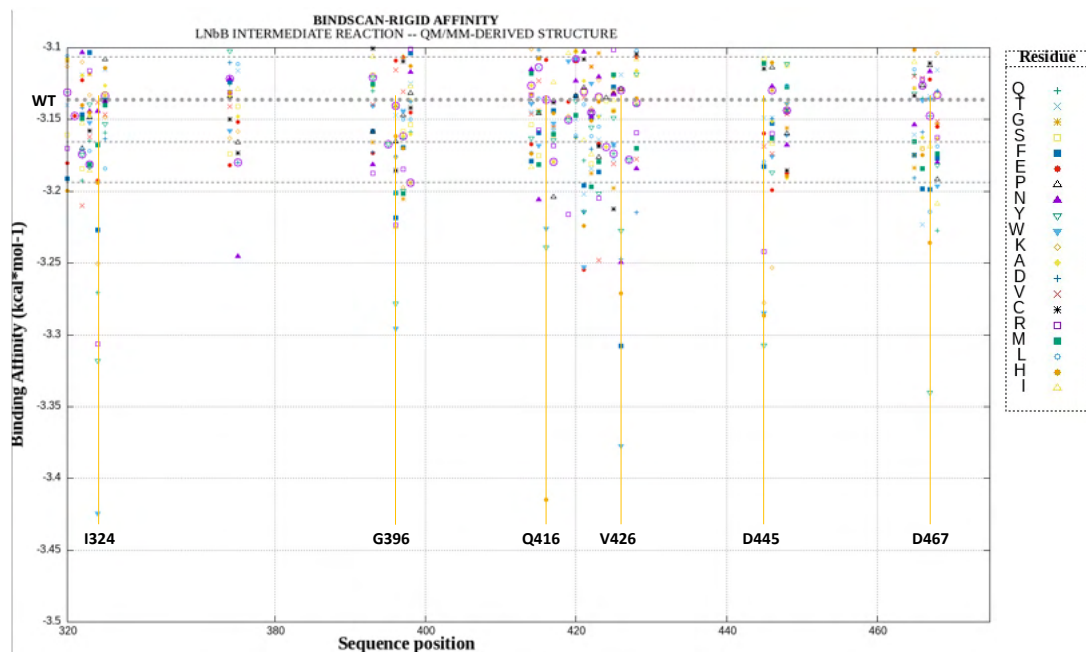
4JAW ya que ésta presenta el inhibidor LNB-tiazolina, molécula análoga al dador natural LNB. Con este fin, se realizaron dockings del sustrato  $\beta$ -lactosa en el centro activo de la enzima en complejo con el dador LNB-tiazolina, identificando tres conformaciones principales. Tras los cálculos se seleccionó la conformación POSBLAC-12 (-3.6 kcal/mol) para futuros experimentos debido a la conformación adoptada por la lactosa durante el cálculo.



**Figura 3. 5.** Conformación adquirida por el aceptor  $\beta$ -lactosa tras realizar su análisis por Docking del centro activo de LnbB (POSBLAC-12). En color negro se muestra la molécula LNB-tiazolina original del fichero PDB: 4JAW, en color naranja la  $\beta$ -lactosa.

Una vez generado el modelo estructural de la enzima con los dos sustratos de interés, tendremos el *input* necesario para emplear el algoritmo BINDSCAN. La hipótesis planteada en este capítulo se basa en que un incremento de la afinidad enzima-aceptor podría causar en un incremento de la actividad TG de la enzima. Por estos motivos se propone el uso de BINDSCAN para identificar posibles mutaciones la cuales puedan incrementar la afinidad entre la enzima y la molécula aceptora. Con este objetivo, se limitó la región de estudio a los átomos de residuos localizados hasta 5Å de los disacáridos LNB-tiazolina y lactosa, identificando 41 residuos en esta zona. Estos fueron mutados a todos los aminoácidos naturales (saturación) generando un total de 820 mutantes. Obtenida la librería el algoritmo calculará las energías libres de unión de cada uno de ellos y de la enzima wt con la molécula de interés (lactosa).

Gracias a la representación gráfica de los valores de  $\Delta G$  obtenidos para cada uno de los mutantes generados (**Figura 3. 6**) se identificaron 6 *hot spots*: Ile324, Gly396, Gln416, Val426, Asp445 y Asp467 (**Figura 3. 7**). Se puede apreciar como la mayoría de las mutaciones realizadas en estas posiciones dan lugar a unos valores de  $\Delta G$  más negativos que los obtenidos con la enzima salvaje. En la **Tabla 3. 1** se muestran aquellos mutantes de los subsitios positivos con menores  $\Delta G$  calculadas por BINDSCAN.

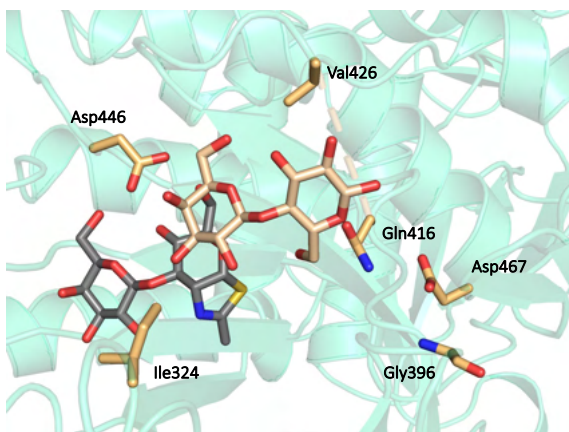


**Figura 3. 6.** Representación gráfica de los resultados obtenidos tras ejecutar BINDSCAN empleando como como *input* POSBLAC-12. Concretamente se muestra la zona del gráfico donde aparecen los mutantes más destacados.

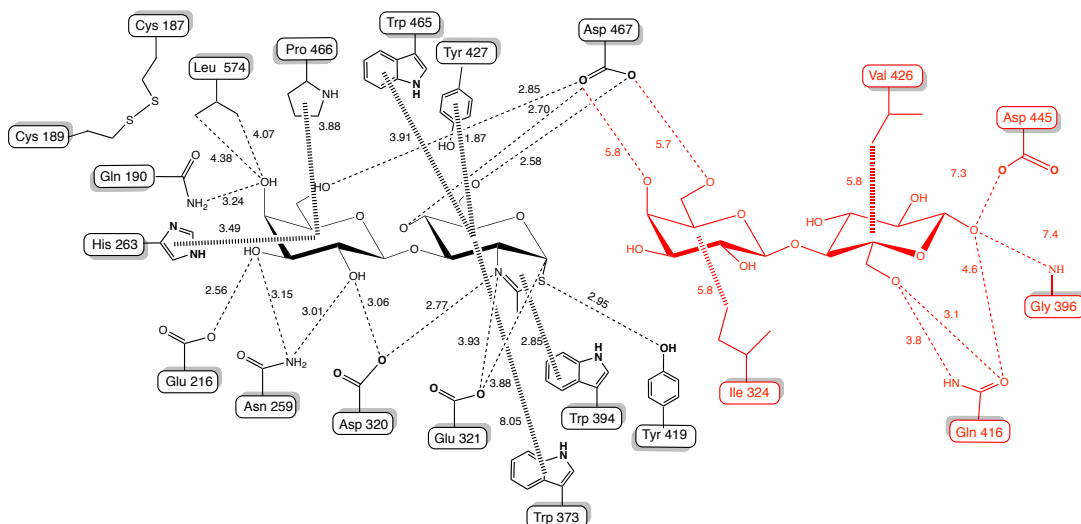
**Tabla 3. 1.** Mutantes de LnbB con menores valores de  $\Delta G$  calculados. Valores obtenidos con el algoritmo BINDSCAN (Vega 2019, comunicación personal).

Mutante	$\Delta G$ (kcal/mol)
WT	$-3.164 \pm 0.032$
I324W	-3.460
G396W	-3.325
Q416H	-3.428
V426W	-3.399
D445Y	-3.359
D467Y	-3.375

Estas posiciones muestran una disminución de  $\Delta G$  similar, siendo ésta de como máximo  $-0,30$  kcal/mol respecto al valor determinado para la enzima wt. Con la finalidad de determinar las posibles interacciones entre estos residuos y la lactosa se realizó su estudio estructural, mostrando en la **Figura 3. 8** el mapa de interacciones entre estos aminoácidos y la molécula aceptora.



**Figura 3. 7.** Residuos *hot spots* identificados por BINDSCAN (Asp467, Ile324, Val426, Gln416, Asp467 y Gly396). En gris se representa el dador LNB-tiazolina y en naranja el aceptor lactosa. Representación de la conformación POSBLAC-12.

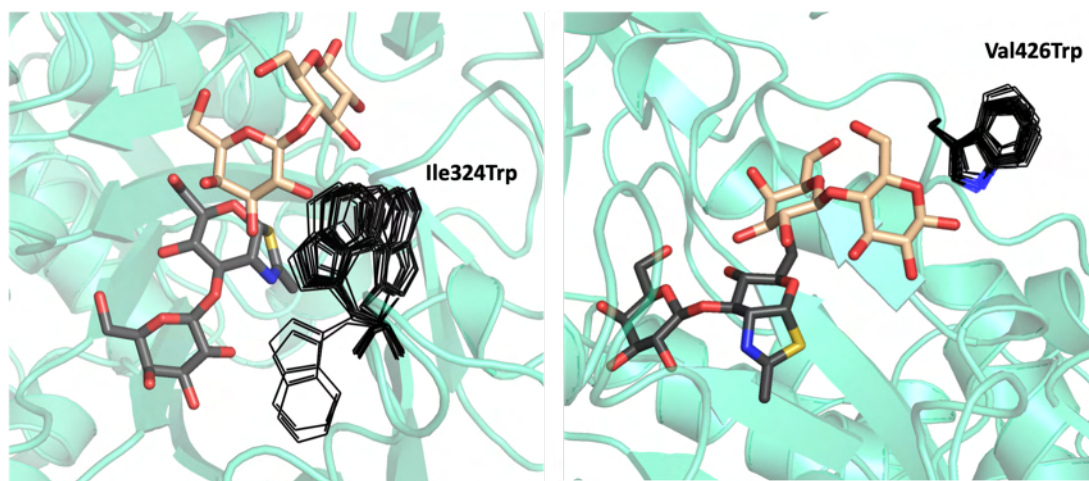


**Figura 3. 8.** Mapa estructural de la proteína LnbB y sus interacciones con los sustratos LNB-tiazolina (negro) y lactosa (rojo). En negro se muestran los residuos seleccionados de los subsitios negativos y en rojo los aminoácidos de los subsitios positivos identificados por BINDSCAN.

En la **Tabla 3. 1** se representan los *hot spots* identificados por BINDSCAN y sus posibles interacciones con la lactosa en la conformación POSBLAC-12. Dada la localización del residuo Asp467, éste puede interactuar tanto con la molécula dadora y la molécula aceptor, estableciendo puentes de hidrógeno con los 5OH y 6OH del anillo 1 de la lactosa. En el caso de los dos residuos apolares alifáticos, Ile324 y Val426, éstos pueden interactuar hidrofóticamente con los anillos +1 y +2 de la lactosa, respectivamente. Por otro lado, se observa como los demás residuos (Asp445, Gly396 y Gln416) únicamente pueden establecer puentes de hidrógeno con el anillo +2, identificando en algunos casos

distancias de enlace mayores 7 Å. Dado que se trata de una primera aproximación, para este estudio se seleccionaron aquellos aminoácidos más cercanos a la lactosa.

Observando el posicionamiento de los residuos Ile324, Val426 y Gln416, se aprecia un hecho interesante. Dada la localización de los residuos Ile324 y Val426 éstos podrían interactuar con los anillos +1 y +2 respectivamente, ya que se sitúan en extremos opuestos de la lactosa (**Figura 3. 7**). Su mutación simultánea por un residuo hidrofóbico y voluminoso, como un Trp, permitirá crear nuevas interacciones de apilamiento entre la enzima y el sustrato generando así una plataforma hidrofóbica la cual podría tener un fuerte impacto en el reconocimiento y la unión del aceptor. En la **Figura 3.9** se muestran las 30 conformaciones obtenidas para cada mutante mediante BINDSCAN con el dador LNB-tiazolina y la lactosa.

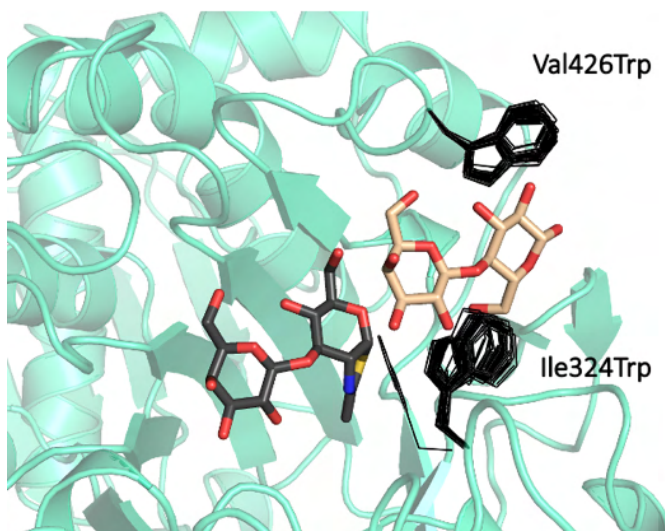


**Figura 3.9.** Mutantes de LnbB Ile324Trp y Val426Trp en complejo con los sustratos LNB-tiazolina y lactosa. Se muestran las 30 conformaciones de cada una de las mutaciones obtenidas por BINDSCAN. En color negro se muestra la molécula LNB-tiazolina original del fichero PDB: 4JAW, en color naranja la  $\beta$ -lactosa.

En la **Figura 3. 10** se presenta el mapa estructural donde se muestran las interacciones resultantes de las mutaciones I324W y V426W.

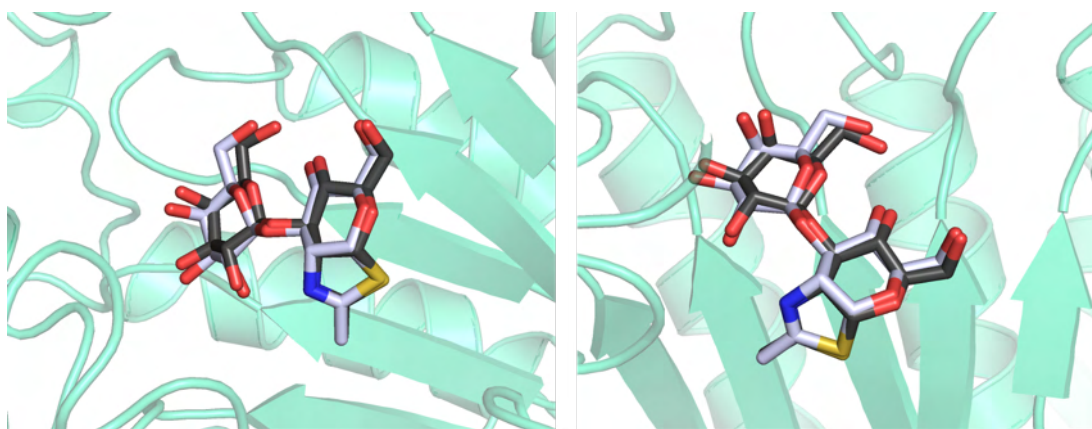






**Figura 3. 11.** Mutante Ile324Trp\_Val426Trp de LnbB en complejo con LNB-tiazolona (negro) y lactosa (naranja). En la imagen se representan los 30 modelos estructurales generados por BINDSCAN.

Dada la relevancia del residuo Trp394 en esta tesis, se considera interesante estudiar computacionalmente si la mutación W394F podría alterar la conformación del dador LNB-tiazolona, pudiendo ser ésta distinta a la adoptada en la enzima nativa. Para este estudio, se realizaron 20 dockings empleando como molde la enzima LnbB W394F, de los distintos complejos enzima-sustrato generados se seleccionó como modelo estructural la conformación con menor  $\Delta G$  (-8.91 kcal/mol, POSLNB-1, **Figura 3. 12**).

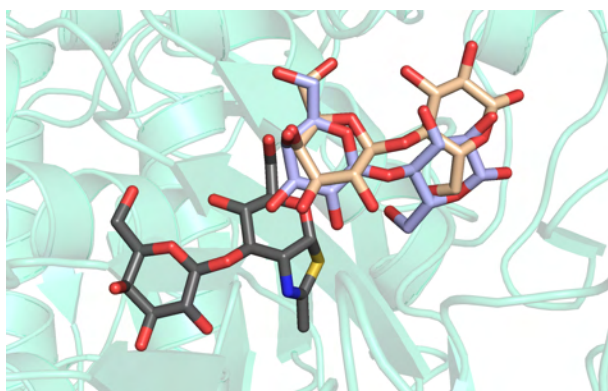


**Figura 3. 12.** Visualización mediante PyMOL del complejo POSLNB-1 (gris) y la estructura PDB 4JAW original (negro).

Tras analizar la conformación adoptada por el dador LNB-tiazolona en diferentes complejos enzima-sustrato, ninguna de las estructuras del disacárido presentó una conformación análoga a la obtenida

con la enzima nativa (PDB:4JAW). Los principales cambios conformacionales de la nueva conformación (POSLNB-1) se observan en la galactosa debido a un ligero cambio en su orientación, por otro lado, GlcNAc-tiazolina presenta una geometría muy similar en las dos ocasiones (**Figura 3. 12**) Se propone así que el mutante W394F modifica la conformación adoptada por el dador en el centro activo de la enzima, pudiendo ser esta geometría más eficiente catalíticamente para la actividad transglucosidasa.

Dado que la introducción de la mutación W394F en LnbB ha inducido variaciones en la conformación del dador LNB-tiazolina, se considera interesante estudiar si dicha mutación influirá en la geometría adoptada por el aceptor lactosa. Para ello se realizaron dockings con el aceptor  $\beta$ -lactosa empleando como molde el complejo enzima-dador definido anteriormente POSLNB-1, generando así una nueva conformación para la lactosa POSBLAC-12.2 ( $\Delta G = -4.184$  kcal/mol). Como se observa en la **Figura 3. 13** las conformaciones adoptadas por la lactosa en POSBLAC-12 (wt, naranja) y POSBLAC-12.2 (W394F, lila) son diferentes. No obstante, se aprecia cierta similitud en la orientación de los oxígenos Gal-O3 involucrados en la catálisis y la orientación de los grupos  $\text{CH}_2\text{OH}$  de ambas estructuras.



**Figura 3. 13.** Conformaciones adoptadas por la molécula  $\beta$ -lactosa en la estructura POSBLAC-12 (naranja) y en POSBLAC1-12.2 (lila). En negro se representa el dador LNB-tiazolina de la estructura POSLNB-1.

Calculados los valores de las energías de unión, se aprecia como el mutante simple W394F presenta diferentes valores de  $\Delta G$  en función de la conformación de aceptor empleada. Con POSBLAC-12.2 (molde LnbB W394F) se ha obtenido una rebaja de  $-1.159$  kcal/mol respecto POSBLAC-12 (molde LnbB wt), indicando que la mutación W394F, a parte de permitir un mejor posicionamiento del dador para la reacción TG, causa un efecto positivo en la unión de la lactosa.

Nuevos estudios de BINDSCAN del mutante W394F están en curso en el laboratorio de Bioquímica para reevaluar los posibles mutantes en los subsitios positivos.



Realizado el estudio *in silico* con BINDSCAN de los subsitios positivos, se han identificado mutaciones prometedoras, las cuales podrían tener un efecto positivo sobre la afinidad enzima-lactosa (I324W y V426W), efecto que podría verse potenciado por la W394F. Por estos motivos se propone la obtención *in vitro* de los mutantes I324W, V426W, I324W\_V426W, W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W con la finalidad de estudiar su efecto sobre la reacción TG.

### 3.3 Estudio *in vitro* de los mutantes de los subsitios positivos

Con la finalidad de estudiar si las mutaciones seleccionadas tienen un efecto positivo sobre la reacción TG, en esta sección se preparan y caracterizan las actividades hidrolíticas y TG de los mutantes seleccionados *in silico*.

#### 3.3.1 Clonaje, expresión y purificación de los mutantes seleccionados

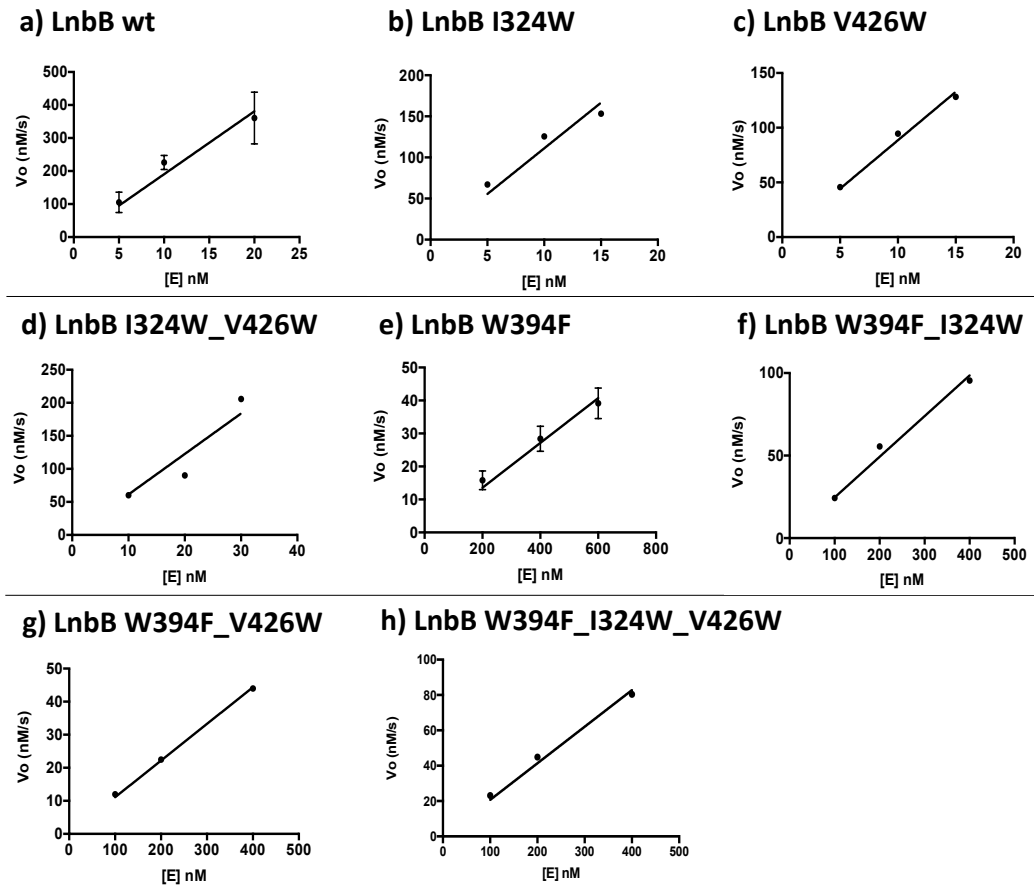
Se generaron los mutantes I324W, V426W, W394F\_I324W y W394F\_V426W empleando como ADN molde los plásmidos pET24b(+)-LnbB-FL-Cterm y pET24b(+)-LnbB-W394F-Cterm en función del mutante objetivo. Las mutaciones fueron introducidas mediante mutagénesis dirigida (SDM) empleando el método de Quik Change PCR (QC-PCR) creando en cada ocasión una pareja de cebadores sense (Fw) y antisense (Rv) los cuales presenta una región no solapante (extremo 3') y una región complementaria (cebador-cebador) en su extremo 5' (véase apartado 5.1.3 del capítulo materiales y métodos). Para la reacción se empleó la polimerasa iProof High-Fidelity Master Mix 2x (0,04U/μL, Bio-rad).

Para la obtención de los mutantes restantes se empleó como ADN molde el plásmido pET24b(+)-LnbB-I324F-Cterm para la obtención del doble mutante I324W\_V426W, y el plásmido pET24b(+)-LnbB-W394F\_I324F-Cterm para la del triple mutante (W394F\_I324W\_V426V). Para la generación de los mutantes se siguió el mismo procedimiento que el descrito para los mutantes anteriores.

Confirmadas las mutaciones mediante secuenciación de ADN por el método Sanger se transformaron las células *E. coli* BL21(DE3)star con los diferentes plásmidos para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes, siguiendo el mismo protocolo que el usado para los mutantes de los subsitios dadores. Se obtuvieron unos rendimientos de purificación comprendidos entre 54-85 mg de proteína por L de cultivo.

### 3.3.2 Determinación de la actividad hidrolítica

Para cada uno de los mutantes generados se determinó en primer lugar su actividad hidrolítica específica ( $SA_H$ ) frente al dador LNB-pNP. Se realizaron reacciones a tres concentraciones de enzima distintas y se determinó su velocidad inicial ( $V_o$ ). En la **Figura 3.14** se muestran los gráficos empleados para el cálculo de la actividad específica de hidrólisis ( $SA_H$ ). En la sección de Anexos se muestran los gráficos obtenidos tras monitorizar la evolución de liberación de pNP de los distintos mutantes en el estudio de esta actividad.



**Figura 3.14.** Actividad específica de hidrólisis para los mutantes de los subsitios positivos ( $SA_H$ ). Condiciones de reacción: concentración de enzima variable, 250  $\mu$ M LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

En la **Tabla 3. 2** se recopilan los valores de  $SA_H$  y la actividad hidrolítica residual respecto el WT (%H) de los mutantes estudiados.

**Tabla 3. 2.** Actividad hidrolítica de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB frente a LNB-pNP.

Mutante	SA <sub>H</sub> (s <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	%H (mut/wt)
WT	24 ± 1.8	100
I324W	11.11 ± 0.86	46
V426W	8.85 ± 0.29	37
I324W_V426W	6.13 ± 0.74	25
W394F	0.07 ± 0.01	0.3
W394F_I324W	0.25 ± 0.01	1
W394F_V426W	0.12 ± 0.02	0.5
W394F_I324W_V426W	0.207 ± 0.007	0.9

<sup>1</sup>Condiciones de reacción: 250 μM LNB-pNP, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

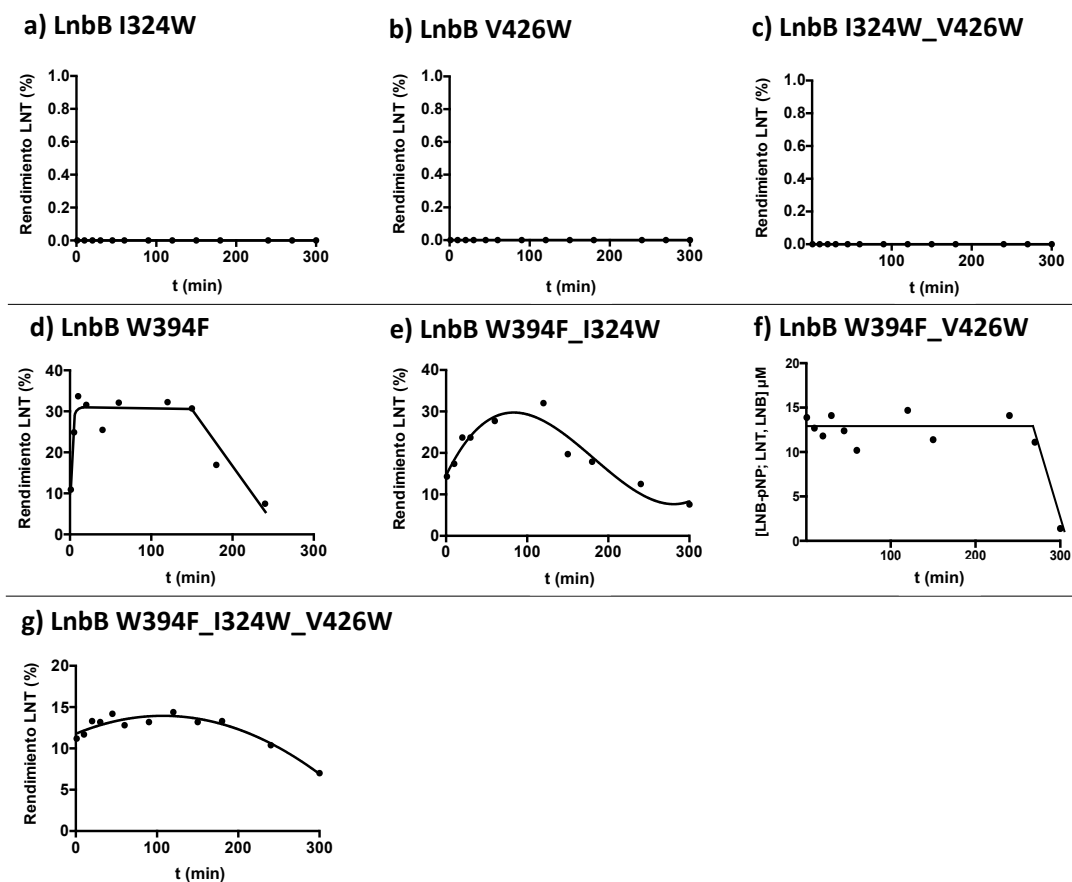
Caracterizada la actividad hidrolítica de las variantes derivadas de la enzima wt, se aprecia como las mutaciones I324W y V426W han permitido reducir ligeramente la actividad hidrolítica de la enzima salvaje, presentando unas actividades hidrolíticas residuales de 46 y 37% respectivamente (**Tabla 3. 2**). Por otro lado, el mutante I324W\_V426W, resultante de la combinación de las mutaciones simples, permite reducir aún más la actividad hidrolítica, presentando en esta ocasión un 25% de actividad residual. En los mutantes estudiados se ha reemplazado el aminoácido original por triptófanos creando así un entorno más hidrofóbico en los subsitios positivos de la enzima, lo cual podría afectar a la unión de la molécula aceptora, así como reducir el acceso de las moléculas de agua al centro activo. Aunque estos mutantes presentan un menor carácter hidrolítico que la enzima salvaje continúan reteniendo una parte notable de esta actividad, lo cual, podría ser contraproducente para la actividad TG.

Por otro lado, al incorporar las mutaciones I324W, V426W y I324W\_V426W a la variante de LnbB W394F, éstos presentan una actividad hidrolítica ligeramente mayor a la presentada por el mutante W394F en los subsitios negativos (0.07 s<sup>-1</sup>), presentando en todos los casos un %H inferior o igual al 1%. Dados estos resultados se determina que la incorporación de nuevas mutaciones a la variante W394F no permite una reducción adicional de su actividad hidrolítica.

En el capítulo anterior, habíamos identificado una relación entre la actividad hidrolítica residual de los mutantes y sus rendimientos de TG, determinando que aquellas variantes que retienen entre un 0.07 y un 1.6% la actividad hidrolítica de la enzima wt pueden ser unos buenos candidatos para la síntesis de LNT. Caracterizada la actividad hidrolítica de los diferentes mutantes de los subsitios positivos, se identifica como 3 de ellos (W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W) se encuentran dentro de la ventana de transglucosidación, siendo unos candidatos potenciales para la síntesis de LNT.

### 3.3.3 Determinación de la actividad TG

La caracterización de la actividad TG se realiza como en el capítulo 2, empleando LNB-pNP como dador y lactosa como molécula aceptora, fijando la concentración de enzima a 1  $\mu\text{M}$  para todos los mutantes. En la **Figura 3.15**, se presenta la evolución de la reacción TG en términos de rendimientos de LNT, de los mutantes I324W, V426W, I324\_Val426W, W394F, W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W; mostrándose en la sección de Anexos la evolución de las concentraciones de LNB, LNB-pNP y LNT de las reacciones.



**Figura 3.15.** Evolución de los rendimientos de LNT obtenidos en las reacciones TG de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB. Condiciones de reacción: 1  $\mu\text{M}$  LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C.

Tras estudiar la actividad TG de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB se aprecia como el dador LNB-pNP es consumido durante los primeros 60 minutos de reacción en todas las reacciones, siendo esta desaparición más rápida en los mutantes más hidrolíticos (I324W, V426W, y

I324W\_V426V) ( véase capítulo de Anexos). En todas las reacciones se obtiene el producto LNB como producto mayoritario, identificando el tetrasacárido LNT solamente en las reacciones realizadas con los mutantes W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V326W.

Determinado el perfil de la reacción TG de cada una de las variantes, en la **Tabla 3. 3** se muestran los rendimientos de síntesis de LNT máximos obtenidos para cada una de ellas. Cabe recordar que este parámetro se ha determinado en función de la concentración de dador inicial de cada reacción determinada mediante HPLC-MS.

**Tabla 3. 3.** Actividad TG de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB expresada en rendimientos de síntesis de LNT. También se indica la actividad hidrolítica residual de los mutantes respecto a la enzima nativa (%H) y el intervalo de tiempo donde se obtienen las mayores concentraciones de LNT.

Mutante	Rendimiento máx LNT (%)	%H (mut/wt)	Intervalo de tiempo
WT	n.d.	100	
I324W	n.d.	46	
V426W	n.d.	37	
I324W_V426W	n.d.	25	
W394F	32	0.28	[60–150]
W394F_I324W	30.4	1	[60–120]
W394F_V426W	13.6	0.5	120
W394F_I324W_V426W	13.3	0.9	[45–120]

n.d: no detectado. Condiciones de reacción: 1  $\mu$ M LnbB, 2.5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa, 50 mM citrato/50 mM fosfato a pH 4.5, 30°C. Para todos los mutantes estudiados el error asociado al rendimiento de LNT máx ha sido  $\leq$  al 10%.

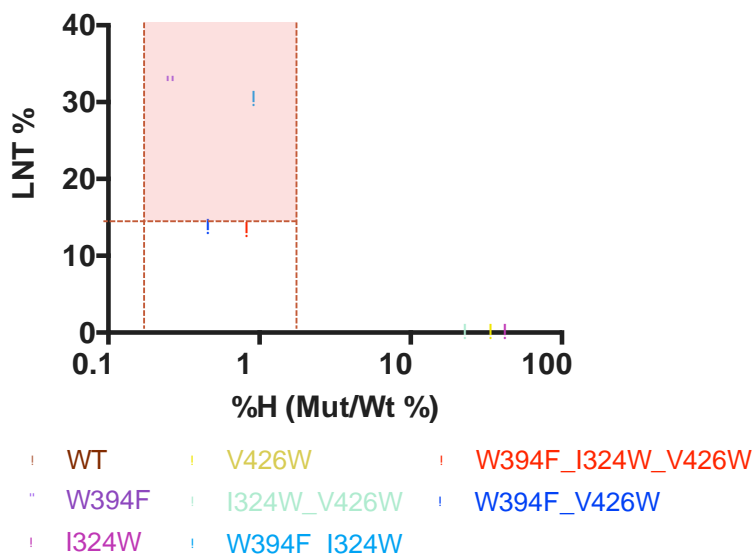
Tal y como habíamos pronosticado anteriormente, la elevada actividad hidrolítica presentada por los mutantes derivados de la enzima salvaje, resulta contraproducente para la reacción TG. Como puede apreciarse en la **Tabla 3. 3** no ha sido posible detectar LNT en las reacciones realizadas con los mutantes I324W, V426W, y I324W\_V426W. La no detección del compuesto no nos permite concluir que éste no sea sintetizado por las variantes ya que el tetrasacárido podría ser producido y hidrolizado inmediatamente por las enzimas, las cuales presentarían una elevada hidrólisis secundaria haciendo imposible su detección mediante HPLC-MS.

Por otro lado, todas las mutaciones derivadas de la enzima LnbB W394F son capaces de sintetizar LNT con unos rendimientos superiores al 13%, siendo el mutante W394F\_I324F el más transglucosídico (30.4%), presentando unos rendimientos similares a los obtenidos con el mutante simple (32%). El residuo Ile324 se encuentra localizado en el extremo del subsitio +1 colindante al subsitio +1, pudiendo interactuar con el dador y aceptor simultáneamente. Dada la cercanía del residuo al centro catalítico de la enzima podría atraer la lactosa hacia una posición catalíticamente favorable, potenciando así la

reacción de síntesis. Caracterizados los mutantes derivados de la enzima W394F se determina que ninguna de las mutaciones introducidas en los subsitios positivos ha permitido mejorar los rendimientos de síntesis del mutante W394F.

Como se observa en la **Tabla 3. 3** los mutantes W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W presentan unos rendimientos de LNT muy similares, alrededor del 13%, observando de nuevo como la combinación de las diferentes mutaciones individuales no presentan un efecto aditivo entre ellas. Se aprecia como los mutantes que contienen la mutación V426W presentan una menor eficiencia sintética. Considerando la localización del residuo (**Figura 3.9**) y el cambio de hidrofobicidad que la mutación aportara a la región, el Trp introducido podría alterar la orientación de la lactosa, afectando negativamente a la reacción TG.

Caracterizada la actividad hidrolítica de los mutantes de los subsitios positivos y gracias a la ventana de TG identificada en el capítulo 2, se había sugerido que los mutantes W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W podrían ser unos candidatos potenciales para la síntesis de LNT. Como se muestra en la **Tabla 3. 3** estos mutantes retienen entre un 0.5% y un 1% la actividad hidrolítica de la enzima salvaje, rango identificado como óptimo para la reacción de síntesis (0.07 y un 1.6% de %H). Tras evaluar su actividad TG, se ha identificado como estos 3 mutantes sintetizan el compuesto LNT en unos rendimientos superiores al 13.3% dando robustez a la ventana de transglicosidación hallada.



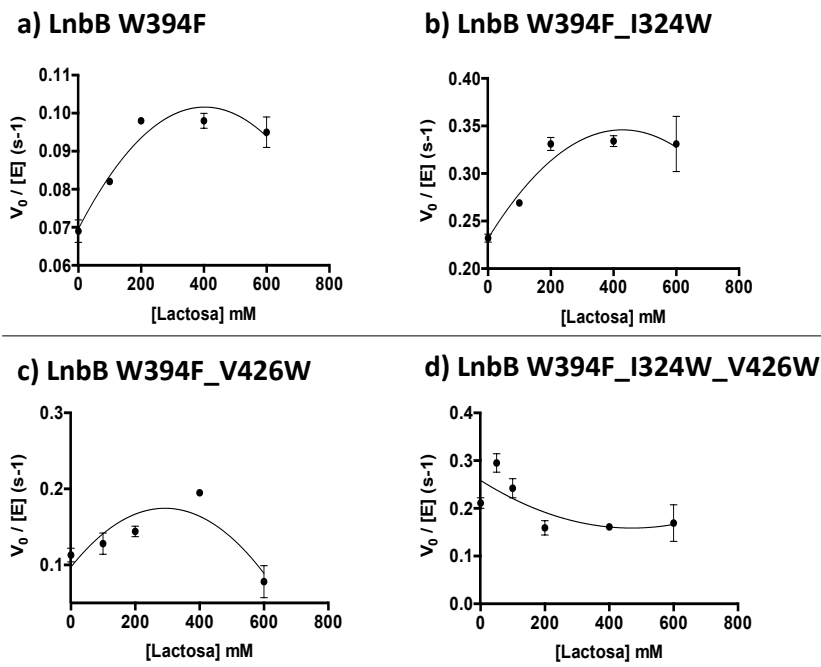
**Figura 3. 16.** Ventana TG de los mutantes de los subsitios positivos. Representación de la actividad TG (%LNT) vs. actividad hidrolítica (H%) de los mutantes de LnbB. En naranja se remarca el rango óptimo de H% donde hallamos los mutantes más transglicosídicos.

## 3.4 Caracterización cinética de los mutantes derivados de LnbB Trp394Phe

En la sección anterior, se ha observado como únicamente aquellos mutantes derivados de la variante LnbB W394F son capaces de sintetizar el compuesto de interés. A lo largo de este capítulo hemos realizado varias hipótesis del efecto que pueden causar las mutaciones de los subsitios positivos sobre la lactosa. En esta sección se estudiará más detalladamente la influencia de la molécula aceptora en los mutantes W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W.

### 3.4.1 Determinación del parámetro $SA_{T200}/SA_H$

De nuevo, para estudiar el efecto que la lactosa puede causar sobre las mutaciones introducidas nos basaremos en la determinación de la ratio aparente T/H entre la actividad de hidrólisis y TG de las nuevas variantes. Para su determinación se realizaron reacciones empleando una concentración de dador constante (250  $\mu$ M) frente diferentes concentraciones de lactosa (comprendidas entre 0-600 mM) estableciendo una concentración fija de enzima para cada mutante. En la **Figura 3. 17** se muestra la actividad específica global de los mutantes seleccionados, para ello se han determinado las  $V_o$  de p-nitrofenol liberado de las diferentes reacciones realizadas en presencia y ausencia de aceptor.



**Figura 3. 17.** Determinación de la actividad específica global enzimática frente diferentes concentraciones de lactosa. Condiciones de reacción: 250  $\mu\text{M}$  LNB- $p\text{NP}$ , 0-600 mM de lactosa, 50 mM tampón citrato / 50 mM fosfato, pH 4.5 and 30  $^{\circ}\text{C}$

La ratio aparente T/H se define como el cociente  $SA_{T200}/SA_H$ , donde  $SA_H$  es la actividad específica de hidrólisis (ausencia de aceptor) y  $SA_{T200}$  la actividad específica en modo transglucosidación (200 mM de lactosa), mostrándose estos parámetros en la **Tabla 3. 4**

**Tabla 3. 4.** Actividades específicas ( $SA_{T200}$  y  $SA_H$ ) y determinación de la ratio aparente entre éstas de los mutantes seleccionados (Ap. T/H ratio).

Mutante	$SA_H^1 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$SA_{T200} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Ap. T/H ratio <sup>3</sup>
WT	$24 \pm 1.8$	$28.0 \pm 2.6$	1.0
W394F	$0.07 \pm 0.01$	$0.098 \pm 0.0001$	1.4
W394F_I324W	$0.25 \pm 0.01$	$0.33 \pm 0.007$	1.4
W394F_V426W	$0.12 \pm 0.02$	$0.144 \pm 0.006$	1.3
W394F_I324W_V426W	$0.207 \pm 0.007$	$0.16 \pm 0.01$	0.8

<sup>1</sup>  $SA_H$  at 250  $\mu\text{M}$  LNB- $p\text{NP}$ , 50 mM tampón citrato / 50 mM fosfato, pH 4.5 and 30  $^{\circ}\text{C}$ . <sup>2</sup>  $SA_{T200}$  at 250  $\mu\text{M}$  LNB- $p\text{NP}$ , 200 mM lactosa, 50 mM tampón citrato / 50 mM fosfato, pH 4.5 and 30  $^{\circ}\text{C}$ . <sup>3</sup> Ratio T/H aparente ( $SA_{T200}/SA_H$ ),

Tras estudiar la actividad específica global de los diversos mutantes se aprecia como las variantes presentan tres comportamientos distintos frente a las concentraciones de lactosa ensayadas. Los mutantes W394F y W394F\_I324W presentan una tendencia muy similar en cuanto a saturación de



lactosa, alcanzando su máxima actividad a una concentración de aceptor de 200 mM (**Figura 3. 17**). Todo y presentar  $SA_{T200}$  y  $SA_H$  muy distintas, la ratio aparente determinada para ambos mutantes es muy similar, con una relación de actividades alrededor a 1.4 (**Tabla 3. 4**).

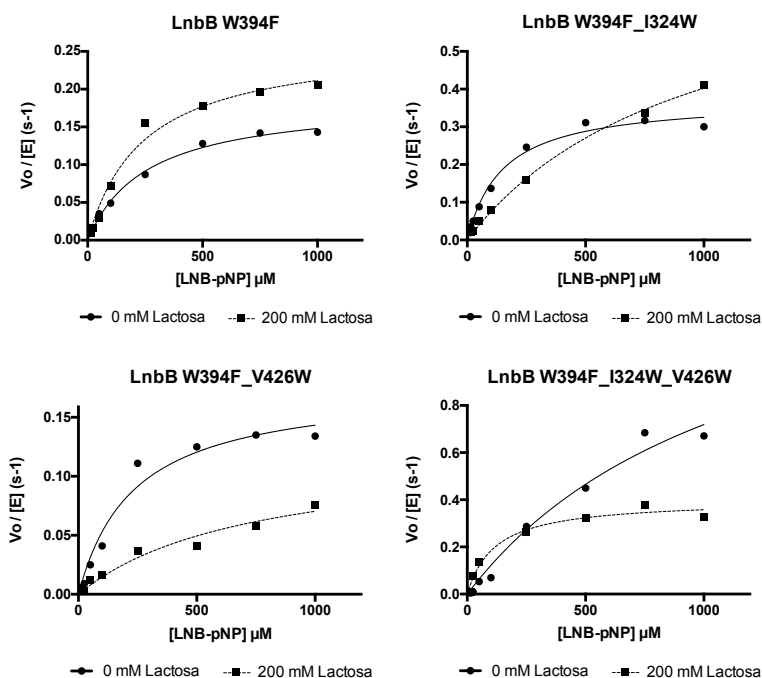
Por otro lado, el mutante W394F\_V426W presenta una tendencia creciente de la actividad específica global hasta alcanzar una concentración de lactosa en reacción de 400 mM, observando un descenso en su actividad a concentraciones superiores de aceptor (**Figura 3. 17**). Para la caracterización de  $SA_{T200}$  se ha empleado en todo momento una concentración de lactosa de 200 mM, a dicha concentración la variante muestra una actividad específica global muy similar a la determinada en ausencia de lactosa, indicando a priori que la reacción hidrolítica es la mayoritaria. Dado que a esta concentración el mutante sintetiza el tetrasacárido con un rendimiento del 13.6% estos resultados podrían sugerir que la incorporación de la mutación V426W podría dificultar la entrada de la molécula aceptora al centro activo de la enzima por efecto estérico, pero en una conformación favorable para la transglucosidación. Se identifica como a concentraciones superiores a 400 mM de aceptor, la actividad específica global de la enzima decae notablemente, sugiriendo que a concentraciones superiores a 400 mM la lactosa podría actuar como inhibidor de la actividad enzimática.

Finalmente, se aprecia como el mutante W394F\_I324W\_V426W presenta una reducción de su actividad específica global a medida que se incrementa la concentración de lactosa en reacción, siendo esta una tendencia opuesta a la identificada para los demás mutantes. La tendencia obtenida, juntamente con el valor de ratio T/H aparente determinado ( $<1$ ) indicarían una posible inhibición de la actividad enzimática. Concretamente la determinación de  $SA_{T200}$  se realiza mediante la reacción a 200 mM de lactosa, concentración a la cual ya se da la inhibición. Pese a que a esta concentración la enzima puede no presentar la totalidad de su actividad, se ha obtenido el compuesto LNT con unos rendimientos del 13%. Considerando estos resultados se estudió la reacción TG a una concentración de lactosa de 50 mM con la finalidad de evaluar los rendimientos sintéticos, obteniendo un rendimiento de LNT del 5%. Estos resultados indicarían que la reacción predominante a esta concentración es la hidrólisis, la cual, debido a la inhibición enzimática se vería desfavorecida a mayores concentraciones de lactosa influyendo positivamente en la reacción TG.

### 3.4.2 Determinación de los parámetros cinéticos

Con la finalidad de caracterizar más detalladamente los mutantes W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W en esta sección se determinan los parámetros cinéticos ( $k_{cat}$  y  $K_M$ ) de la reacción de hidrólisis y TG.

La determinación de dichos parámetros se ha realizado en base a las  $V_o$  de liberación de pNP de ambas reacciones. Concretamente para el estudio de la actividad hidrolítica se realizaron reacciones a una concentración de dador variable (15 a 1000  $\mu\text{M}$  LNB-pNP) en las cuales no habrá presencia de aceptor; por otro lado, en el estudio de la actividad en modo TG se testarán las mismas concentraciones de dador, pero en esta ocasión en presencia de 200 mM de lactosa. Como se aprecia en la **Figura 3. 18** las cinéticas obtenidas presentan una dependencia hiperbólica frente la concentración de dador, empleado para la determinación de las constantes cinéticas la ecuación de Michaelis-Menten.



**Figura 3. 18.** Reacciones de Michaelis-Menten para la determinación de los parámetros cinéticos de los mutantes de los dadores positivos de LnbB para su reacción de hidrólisis y TG.

En la **Tabla 3. 5** se muestran los valores de las constantes cinéticas determinadas tanto para la actividad hidrolítica como para la actividad en modo TG. En ésta también se indica el parámetro  $k_{cat}/K_M$  para evaluar así, la eficiencia catalítica de las nuevas variantes.

**Tabla 3. 5.** Parámetros cinéticos de los mutunes de LnbB para las reacciones de hidrólisis y TG.

Mutante	Actividad hidrolítica			Actividad en modo TG			T/H ( $k_{cat}/K_M$ ) <sup>1</sup>
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
W394F	0.186 ±	260 ±	7.18·10 <sup>2</sup>	0.26 ±	240 ± 52	1.09·10 <sup>3</sup>	1.4
	0.008	30		0.02			

Capítulo 3: Exploración de los subsitios positivos de LnbB

W394F_I324W	0.374 ±	149 ±	2.51·10 <sup>3</sup>	0.785 ±	951 ±	8.26·10 <sup>2</sup>	0.33
	0.018	24		0.071	154		
W394F_V426W	0.177 ±	234 ±	7.55·10 <sup>2</sup>	0.122 ±	733 ±	1.66·10 <sup>2</sup>	0.22
	0.018	70		0.028	323		
W394F_I324W_V426W	1.58 ±	1195 ±	1·10 <sup>3</sup>	0.40 ±	118 ± 33	3.39·10 <sup>3</sup>	3.28
	0.44	542		0.03			

<sup>1</sup>Ratio aparente T/H calculada a partir del parámetro  $k_{cat}/K_M$  determinado para cada uno de los mutantes en la reacción H y TG. Condiciones reacción hidrólisis: 15-1000  $\mu$ M LNB-pNP, tampón 50 mM citrato/50 mM fosfato pH 4.5, 30°C. Condiciones reacción TG: 15-1000  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, tampón 50 mM citrato/50 mM fosfato pH 4.5, 30°C.

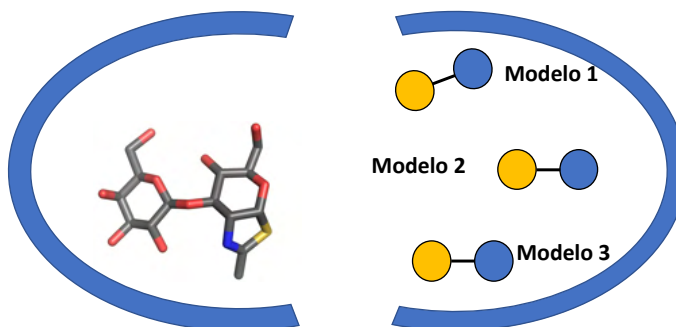
Determinada la constante  $k_{cat}$  de la reacción de hidrólisis, se aprecia como los dobles mutantes presentan unos valores similares a los obtenidos para la enzima LnbB W394F; siendo para el mutante triple aproximadamente diez veces superior. Este patrón también se puede identificar en  $K_M$ , ya que los dobles mutantes presentan unos valores similares de esta constante, siendo ésta 8 veces superior para el triple mutantes. Estos resultados podrían indicar que los mutantes W394F, W393F\_I324W y W394F\_V426W presentan una afinidad similar por el dador empleado, la cual disminuiría notablemente cuando se introducen las tres mutaciones simultáneamente (W393F\_I324W\_V426W).

Tras realizar el estudio de la actividad en modo transglucosidación de las nuevas variantes, se aprecia como los mutantes W394F y W394F\_I324W muestran un incremento de la  $k_{cat}$ , respecto a la determinada por la actividad de hidrólisis, debido a la aparición de la reacción TG. Por otro lado, el mutante W394F\_V426W muestra una ligera disminución de  $k_{cat}$  comparada con la determinada en la reacción de hidrólisis. Tal como se había observado en **Figura 3. 17** la actividad global de la enzima en presencia de 200 mM de lactosa es prácticamente la misma que en ausencia de ésta, sugiriendo que a esta concentración de aceptor la reacción TG no se ve favorecida catalíticamente.

Estudiada la actividad enzimática en modo TG se observa como los mutantes se ven influenciados de maneras distintas por la presencia de lactosa en reacción. Los mutantes W394F\_I324W y W394F\_V426W presentan unos valores de  $K_M$  superiores a los determinados en la reacción de hidrólisis, lo que podría indicar que las mutaciones introducidas en los subsitios positivos han podido modificar la afinidad enzima-dador. Por otro lado, el mutante W394F\_I324W\_V426W presenta una rebaja significativa de dicho parámetro al realizar la reacción en presencia de aceptor.

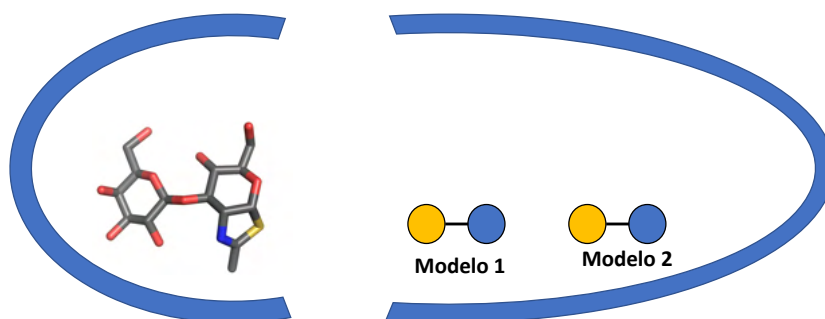
Dado que los experimentos realizados no permiten determinar la unión de las enzimas con el aceptor, sería interesante estudiar la energía de unión por la lactosa experimentalmente, empleando por ejemplo la técnica de ITC (calorimetría de titulación isotérmica), ya que así podríamos comparar directamente los valores obtenidos *in sillico* con los *in vitro*.

Tras caracterizar la actividad TG de los mutantes obtenidos por BINDSCAN, se concluye que el incremento en la afinidad enzima-aceptor calculado computacionalmente no ha causado un aumento de la actividad TG, siendo W394F el mutante más transglucosídico hallado en esta tesis. Dada la morfología de la cavidad dadora, en este trabajo se han identificado varios modelos productivos de unión enzima-lactosa en los cuales se verían involucrados diferentes aminoácidos creando así diferentes interacciones enzima-aceptor. Todo y así, los modelos obtenidos presentaban energías de unión similares, dificultando la elección del modelo estructural correcto. Considerando estos factores y los resultados obtenidos tras la caracterización cinética de los mutantes podrían sugerir que el modelo estructural de partida de la lactosa elegido es incorrecto, pudiéndose localizar el aceptor en otra región de la cavidad u orientación, y por lo tanto las mutaciones introducidas no causarían el efecto esperado en la afinidad enzima-aceptor. En la **Figura 3. 19** se ejemplifica de manera esquemática 3 posibles modos de unión de la lactosa a la cavidad aceptora de la enzima LnbB.



**Figura 3. 19** Esquema donde se ejemplifican 3 posibles modos de unión de la lactosa (representada con redonda amarilla y azul) en la cavidad aceptora.

Otra posible hipótesis es que el modo de unión de la lactosa escogido sí sea el correcto y por lo tanto las mutaciones introducidas en la cavidad originen una mejora de la afinidad enzima-aceptor, pero uniendo la lactosa en un modo no productivo o bien en un posicionamiento incorrecto. En la **Figura 3. 20** se ejemplifica como las mutaciones incorporadas podrían originar que la lactosa se uniese en un modo incorrecto (modelo 2) lo cual imposibilitaría la reacción TG.



**Figura 3. 20.** Ejemplo de como las mutaciones introducidas en la cavidad aceptora pueden originar que la lactosa se una incorrectamente dificultando así la reacción TG.

### 3.5 Conclusiones del capítulo

Una vez estudiada la estructura tridimensional de la enzima LnbB, no se identificaron subsitios definidos para la unión de la lactosa, imposibilitando el rediseño racional de esta región. Por este motivo, con la finalidad de intentar mejorar los rendimientos de LNT obtenidos con el mutante W394F, se realizó el rediseño *in silico* de dicha región mediante el software BINDSCAN. Tras ejecutar el algoritmo, se realizó el estudio estructural de los mutantes propuestos por BINDSCAN, seleccionando los mutantes I324W, V426W y I324W\_V426W para su estudio. Con la finalidad de incrementar la actividad TG obtenida en el proyecto, se combinaron las mutaciones propuestas en los subsitios positivos con el mejor biocatalizador hallado hasta el momento W394F, por lo que se generaron y caracterizaron los mutantes I324W, V426W, I324W\_V426W, W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W.

Tras la caracterización de los mutantes se aprecia cómo las variantes I324W, V426W y I324W\_V426W presentan un gran carácter hidrolítico, repercutiendo negativamente en la reacción TG ya que no ha sido posible detectar en ningún caso el tetrasacárido de interés.

Caracterizada la actividad de los mutantes derivados de la variante W394F, únicamente se obtuvieron rendimientos de síntesis de LNT similares a los del mutante simple con la variante W394F\_I324W (31% LNT). Aunque estos mutantes no han permitido mejorar los rendimientos de síntesis, todos ellos presentan la capacidad de sintetizar LNT en rendimientos superiores al 13%.

Dadas las actividades hidrolíticas residuales (%H), se identificaron las variantes W394F\_I324W, W394F\_V426W y W394F\_I324W\_V426W en la ventana transglicosídica definida en el capítulo 2. Todo y mostrar rendimientos superiores al 13% en todos los casos, ningún mutante presentó rendimientos superiores a los obtenidos con el mutante simple W394F.

Finalizado el estudio de estos mutantes, se ha podido observar como la hipótesis realizada de que un incremento de la afinidad podría traducirse en un incremento de la reacción TG no ha sucedido. La mejora en la energía de unión de la lactosa identificada computacionalmente por BINDSCAN no se ha traducido en una mejora de los rendimientos de trasnglicosidación, pudiendo deberse a la elección incorrecta del modelo estructural de partida de la lactosa, o bien a que ésta adopta un modo no productivo de unión o un posicionamiento incorrecto en la cavidad aceptora para la catálisis.



## Capítulo 4 Exploración de la síntesis secuencial de LNT

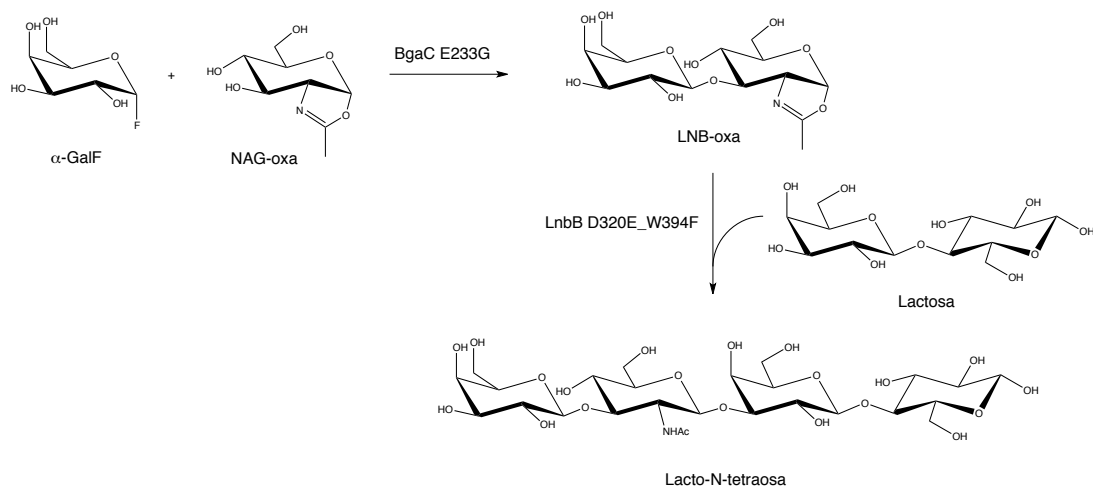
---





En los capítulos anteriores de esta tesis, se ha explorado la obtención del compuesto LNT mediante la reacción de transglucosidación, empleado para ello la enzima LnbB. Tras analizar la capacidad sintética de los diferentes mutantes de LnbB propuestos<sup>108</sup>, se identificó que la variante LnbB W394F era aquella con mayor actividad transglucosídica, sintetizando el compuesto LNT con unos rendimientos del 32%. Ya que el compuesto LNT y sus derivados (LNFP-I, LNFP-II, etc) son los principales HMOs de la leche humana<sup>11</sup>, existe un gran interés en la comunidad científica para obtener este tetrasacárido. Nidetzky y colaboradores exploraron la síntesis de LNT a través de la reacción glicosintasa mediante la mutación del residuo asistente de LnbB (D320E) y empleando como dador activado LNB-oxazolina, obteniendo unos rendimientos del 30%. Con esta mutación los autores eliminaron la hidrólisis secundaria de la enzima, ya que la concentración de LNT permanece estable a lo largo del tiempo, solucionando así, una de las principales desventajas de la reacción de transglucosidación<sup>88</sup>.

Dado que la enzima LnbB es capaz de aceptar el dador LNB-oxazolina y por lo tanto puede actuar como una glicosintasa, surgió la colaboración entre el laboratorio de Bioquímica de IQS y el laboratorio del Dr. Fauré (Toulouse Biotechnology Institute (TBI), Toulouse) para explorar la síntesis en cascada y one-pot del compuesto LNT. El diseño de esta síntesis se presenta en la **Figura 4. 1**, la cual implica la utilización de dos enzimas: la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Bacillus circulans* (BgaC) y LnbB. Se propone la utilización de la BgaC para la síntesis *in situ* del dador activado LNB-oxazolina, el cual sería sustrato de la enzima LnbB para su utilización como glicosintasa en la síntesis de LNT.



**Figura 4. 1.** Reacción en cascada de las enzimas BgaC E233G y LnbB D320E\_W394F para la síntesis de LNT empleando como sustratos  $\alpha$ -GalF, GlcN-oxazolina y lactosa.

La enzima BgaC está clasificada en la familia GH35 de la base de datos CAZy presentando un mecanismo catalítico ácido-base con retención de la configuración. Las enzimas de esta familia catalizan la hidrólisis

de unidades de Gal de los extremos no reductores de oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas, siendo la actividad específica de BgaC la hidrólisis de enlaces terminales Gal $\beta$ 1-3. Así como otras GHs BgaC presenta actividad transglicosídica, sintetizando nuevos enlaces  $\beta$ 1,3. Concretamente esta enzima fue empleada por Hernáiz y colaboradores en la síntesis del disacárido LNB, testando diferentes líquidos iónicos y empleando los sustratos Gal-pNP y GlcNAc los autores reportaron unos rendimientos de síntesis del disacárido del 97%<sup>119</sup>. Como alternativa a la reacción de transglicosidación, BgaC fue rediseñada como glicosintasa mediante la sustitución de su residuo nucleófilo (Glu233) por uno no nucleofílico obteniendo exitosamente la glicosintasa BgaC E233G, empleando en esta ocasión el dador activado  $\alpha$ -GalF<sup>120,121</sup>. En los diferentes trabajos publicados sobre la glicosintasa BgaC E233G se han explorado gran diversidad de aceptores (Gal $\beta$ -pNP, GlcNAc $\beta$ -pNP, GlcNAc $\alpha$ -pNP, GalNAc $\beta$ -pNP, GalNAc $\alpha$ -pNP, Glc $\beta$ -pNP, Gal, GlcNAc,  $\beta$ -GlcNAc-linker-tBoc, etc), determinando que la enzima presenta una mayor eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) sobre glucósidos con configuración  $\alpha$  que sobre los de conformación  $\beta$ . En estos estudios se ha determinado que la nueva variante glicosintasa se muestra inactiva sobre los aceptores GlcNAc $\beta$ -pNP y GalNAc $\beta$ -pNP debido a la conformación del centro activo de la enzima.

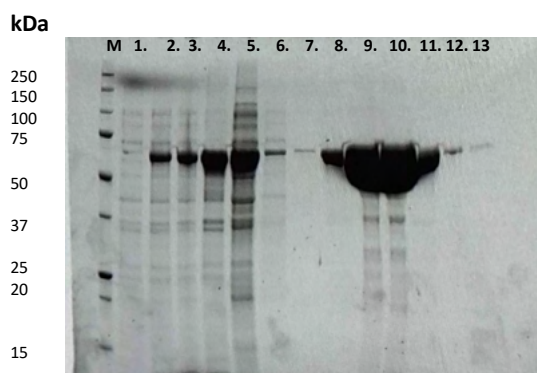
En la primera etapa de la reacción secuencial se pretende emplear la glicosintasa de BgaC (E233G) para la síntesis del disacárido LNB-oxazolina (dador de LnbB), a partir del dador  $\alpha$ -GalF y empleado GlcN-oxazolina como aceptor. Mediante esta estrategia se obtendría el disacárido LNB-oxazolina *in situ* el cual sería empleado por el mutante de LnbB para sintetizar el compuesto LNT, evitando así los problemas de inestabilidad de los compuestos oxazolina. Puesto que la enzima acepta glucósidos con configuración  $\alpha$  como aceptores, nuestra hipótesis es que podría aceptar también GlcN-oxazolina que posee dicha configuración. Sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado la utilización de GlcN-oxazolina como aceptor de BgaC, por lo que en este capítulo se evaluará si la enzima puede aceptar dicho sustrato como molécula aceptora.

Gracias a los estudios realizados por Nidetzky y colaboradores<sup>88</sup> se conoce que el mutante D320E de LnbB actúa como glicosintasa y puede aceptar LNB-oxazolina como dador. Tras explorar numerosas mutaciones de la enzima LnbB, en este trabajo hemos concluido que el mutante W394F es aquel que permite sintetizar el compuesto LNT con mayores rendimientos. Considerando estos hechos, en la segunda etapa de la reacción en cascada de LNT, se pretende sintetizar el tetrasacárido LNT mediante la creación de una glicosintasa de LnbB empleado LNB-oxazolina y lactosa como sustratos. En este proyecto se propone el mutante D320E\_W394F de LnbB para testar su potencial uso como glicosintasa, combinando así, el mutante D320E el cual ha dado buenos resultados como glicosintasa en la síntesis de LNT<sup>88</sup> con el mutante más transglicosídico de este proyecto, W394F.



Para la expresión de la proteína BgaC nativa y el mutante glicosintasa se realizan cultivos de 300 mL, siendo estos iniciados a una  $OD_{600}$  inicial de 0.05. Se realiza un primer crecimiento celular a 37 °C y 160 rpm hasta alcanzar una  $OD_{600}$  de 0.8, momento en el que se iniciará la expresión proteica mediante la adición del inductor isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM<sup>120-122</sup>. A continuación, el cultivo se incuba a 25 °C y 160 rpm durante 16 horas. Con la finalidad de estudiar el proceso de expresión proteica de ambas proteínas, se tomaron muestras de cultivo a distintos tiempos de incubación (pre y post-inducción) las cuales se analizarán mediante un gel SDS-PAGE (12% acrylamide Stain-Free™ precast gel). En la **Figura 4. 3** se muestra el gel resultante de este análisis (carriles 1-4), apreciando como en la muestra correspondiente al cultivo pre-inducción no aparece la banda correspondiente a la proteína de interés, indicando así, que no ha habido expresión basal de la proteína de BgaC (66 kDa). En las muestras tomadas a distintos tiempos de inducción (carril 2-4) se observa como la banda correspondiente a BgaC incrementa de intensidad a medida que avanza el tiempo de inducción, indicando así, que el proceso de expresión ha tenido lugar exitosamente.

Tras realizar la lisis celular del cultivo se purifica la fracción soluble por cromatografía de afinidad por metal, realizando la elución proteica mediante un gradiente de imidazol (0-500 mM). En la purificación de las proteínas BgaC wt y BgaC E233G se ha obtenido el mismo perfil, por lo que únicamente se muestra el gel de la proteína nativa. En la **Figura 4. 3** se muestran los resultados obtenidos tras realizar la purificación proteica (carriles 6-13).



**Figura 4. 3.** Gel SDS-PAGE 12% Acrilamida (12% acrylamide Stain-Free™ precast gel) de la enzima BgaC WT. En los gels se analizan las fracciones obtenidas durante el proceso de expresión y purificación. M: Precision Plus Protein™, 1: pre-inducción, 2: tras 2:30h de inducción, 3: tras 5:30h de inducción, 4: pellet final de cultivo (16 horas de inducción), 5: flow through, 6: wash 1, 7: wash 2, 8: E1/5 (elución con 5 mM de imidazol), 9: E1/20 (elución con 20 mM de imidazol), 10: E1/100 (elución con 100 mM de imidazol), 11: E1/250 (primera elución con 250 mM de imidazol), 12: E2/250 (segunda elución con 100 mM de imidazol), 13: E1/500 (elución con 500 mM de imidazol).

En los *flow through* y en los lavados se aprecia presencia de la proteína de interés, indicando que se ha sobrepasado la capacidad de unión de la columna. En las muestras correspondientes a la elución de la

proteína (carriles 8-13) se identifica en todas ellas la presencia de BgaC, seleccionando y uniendo las fracciones E1/20, E1/100 y E1/250 para su diálisis frente a tampón 50 mM PBS pH 8. Finalmente se cuantifican las proteínas purificadas mediante NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), obteniendo unos rendimientos de purificación de 229 mg de proteína/L de cultivo para la enzima BgaC wt y de 88 mg de proteína/L para el mutante E233G, cantidades suficientes para realizar su caracterización cinética.

#### 4.1.2 Clonaje del mutante D320E\_W394F, “glicosintasa” de LnbB

Para la preparación del mutante D320E\_W394F se ha empleado el ADN molde pET24(+)\_LnbB-FL-Cterm\_W394F en el cual se encuentra clonada la proteína LnbB con la mutación W394F, albergando en su extremo C-terminal una cola de histidinas para su futura purificación. El mutante se ha obtenido mediante el método de mutagénesis dirigida (SDM) Quik Change PCR, empleando una pareja de cebadores sense (Fw) y antisense (Rv) con las características descritas en la sección anterior. Para la reacción de mutagénesis, se empleó la polimerasa Iproof HF MasterMix 2x (Biorad). Tras confirmar la obtención de la mutación mediante el método de secuenciación de Sanger se transforman las células *E. coli* BL21(DE3)star con el plásmido pET24(+)\_LnbB-FL-Cterm\_D320E\_W394F.

La expresión y purificación del mutante D320E\_W394F no llegó a realizarse, por los motivos que se describirán a lo largo de este capítulo.

#### 4.1.3 Síntesis de sustratos

Para la exploración de la reacción glicosintasa de la enzima BgaC E233G se empleará el dador  $\alpha$ -GalF, el cual deberá ser sintetizado. Dado que el objetivo de la primera etapa de la síntesis secuencial es la obtención del disacárido LNB-oxazolina, también se sintetizará el sustrato GlcN-oxazolina, que será empleado como aceptor en la reacción.

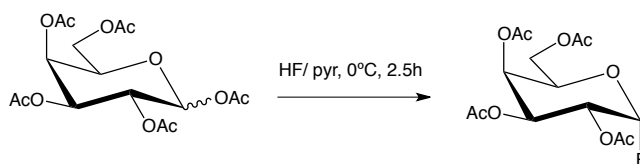
#### 4.1.4 Síntesis del dador $\alpha$ -GalF

La química de los compuestos organofluorados ha sido explorada desde inicios del siglo XIX dadas las propiedades únicas que confiere el átomo de flúor, causando efectos drásticos en el pKa o la lipofilicidad de la molécula modificada. Este elemento presenta una elevada electronegatividad proporcionando al enlace C-F una fuerte polarización, además, este elemento presenta un radio de Van der Waals similar al del H ( $F= 1.35, H1.1 \text{ \AA}$ )<sup>123–126</sup>.

Los fluoruros de glicosilo (carbohidratos donde un OH ha sido reemplazado por F) son comúnmente empleados en enzimología ya sea para su uso como marcadores en estudios mecanísticos cinéticos y estructurales, para estudiar la interacción proteína-ligando, o bien, para su uso como sustratos para reacciones glicosintasa. Una de las principales dificultades de la síntesis de carbohidratos radica en el control de la estéreo- y regio-selectividad de la reacción, requiriendo para ello diversas etapas de protección y desprotección de los hidroxilos del azúcares<sup>124</sup>.

El HF es uno de los principales reactivos empleados en las reacciones de fluoración debido a su coste y a su eficiencia atómica. No obstante, dada su corrosividad y toxicidad en estado gaseoso hace que su manipulación requiera de una elevada seguridad. Considerando que el ion fluoruro ( $F^-$ ) es fuertemente solvatado en medio acuoso, disminuyendo su nucleofilia, una forma segura y sencilla de manipular el HF es emplearlo juntamente con una base, la cual permitirá la formación de complejos líquidos con la  $Et_3N$  o la piridina (reactivo de Olah)<sup>123</sup>. En 1970 Olah y colaboradores reportaron una manera sencilla de manipular el HF la cual proporciona una elevada eficiencia de fluoración, proponiendo la mezcla HF/piridina (70:30) ya que la piridina permite formar soluciones estables con el fluoruro de hidrógeno<sup>127</sup>.

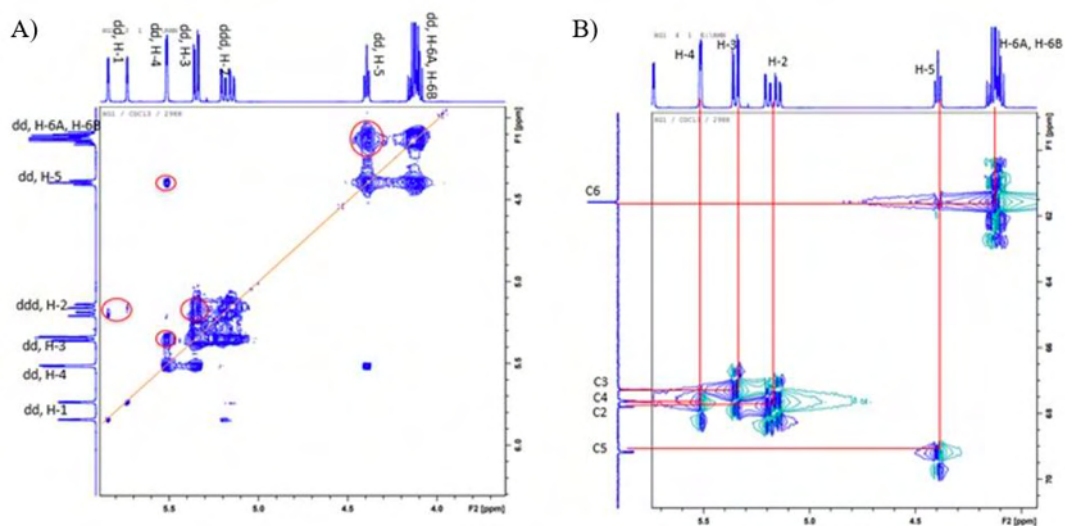
Ya que el objetivo de esta síntesis es la obtención del  $\alpha$ -GalF se empleará Gal peracetilada como sustrato inicial. Considerando que el C anomérico es el más electrofílico debido al oxígeno endocíclico, será el lugar preferente donde se dará la fluoración nucleofílica ya que en las condiciones HF/piridina (70:30) el ion fluoruro actuará como nucleófilo mediante el mecanismo  $SN1$ <sup>124</sup>. En la **Figura 4. 4** se muestra el esquema de la reacción de fluoración de la Gal peracetilada.



**Figura 4. 4.** Síntesis del compuesto fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosilo partiendo del reactivo 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranososa empleando HF/piridina (70:30) como agente de fluoración.

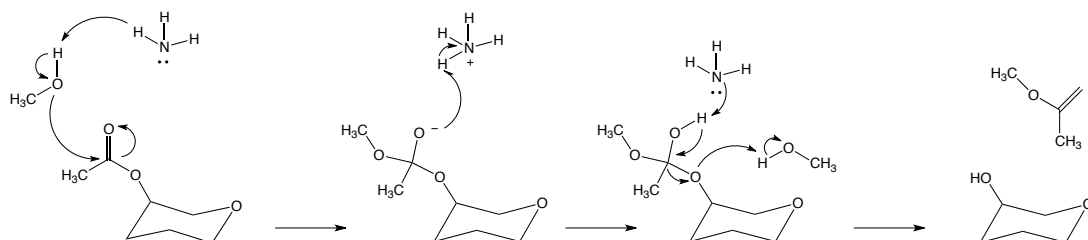
Tras realizar la purificación del producto mediante cromatografía flash (eluyente: acetato de etilo y éter de petróleo) se obtuvo el producto 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosilo con un rendimiento del 81%, confirmando la obtención del producto deseado mediante RMN  $^1H$ , COSY y HSQC (**Figura 4. 5**). El análisis COSY (CORrelation SpectroscopY) nos permitirá relacionar los acoplamiento de los átomos de H de la molécula con los demás H del sistema, pudiendo asignar así el H-1 con un acoplamiento de 53.3 Hz característico. Por otro lado, mediante el espectro HSQC (Heteronuclear

Single Quantum Correlation spectroscopy) se relacionarán las señales asignadas para cada H con su correspondiente C, identificando como H1 se acopla a C1, H2 a C2 y así sucesivamente.



**Figura 4. 5.** A) Espectro COSY del compuesto fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosilo. B) Espectro HSQC del compuesto fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosil.

Una vez obtenido el fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosilo se realiza la desprotección de los grupos acetilo para así obtener el producto deseado  $\alpha$ -GalF, empleando para ello una solución de  $\text{NH}_3$  en metanol. Considerando el mecanismo de desacetilación propuesto por Meier<sup>128</sup> y colaboradores se propone el siguiente mecanismo para la reacción realizada (**Figura 4.6**). La reacción de desacetilación propuesta sucederá mediante el ataque nucleofílico sobre el C del carbonilo del acetilo por parte de la molécula de  $\text{MeOH}$ , la cual será activada por el  $\text{NH}_3$ , este ataque originará un intercambio de protones permitiendo así la evolución de la reacción<sup>128</sup>.



**Figura 4.6.** Mecanismo de acción propuesto para la reacción de desacetilación mediada por  $\text{MeOH}$  y  $\text{NH}_3$ , adaptado de Meier y colaboradores<sup>128</sup>.

Finalizada la reacción de desacetilación se obtuvo el producto  $\alpha$ -GalF con un rendimiento del 81%, confirmando la estructura de la molécula mediante su análisis por <sup>1</sup>H-RMN (**Figura 4. 7**) mediante la



asignación de las señales:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOD- $d_4$ ): 5.56 ppm (1H, dd,  $J_{1,2} = 2.5$  Hz,  $J_{1,F} = 54.6$  Hz, H-1), 3.95-3.93 ppm (2H, m), 3.83-3.68 ppm (4H, m).

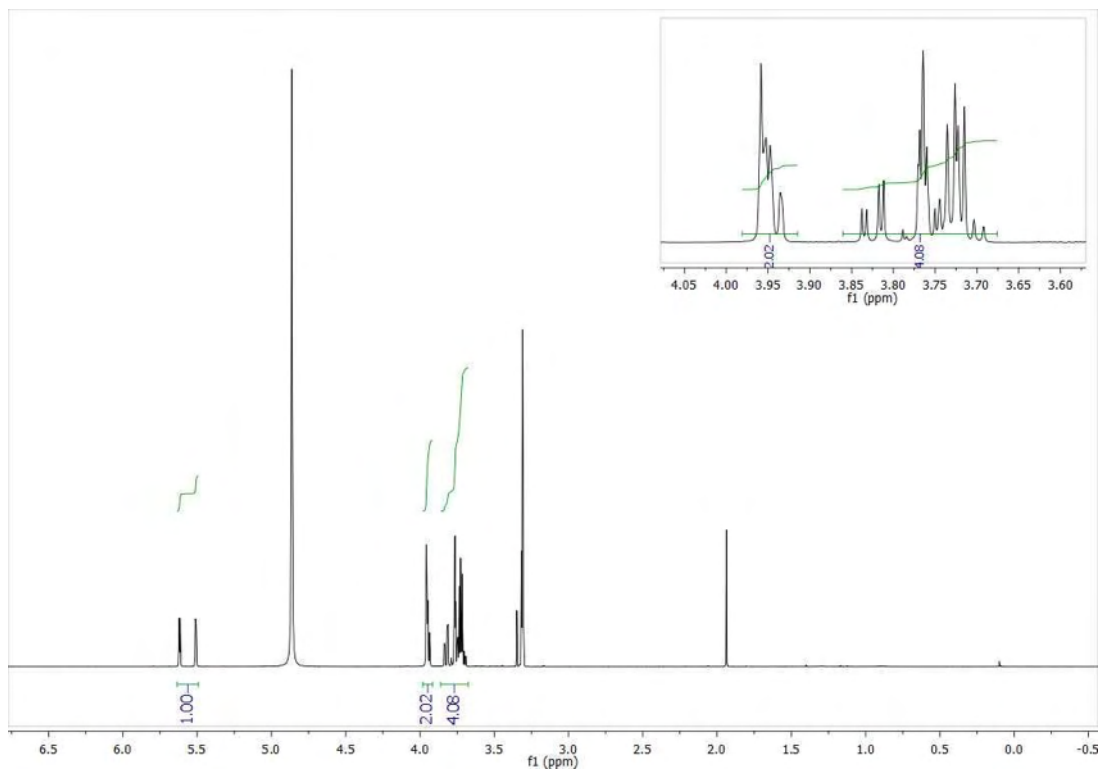
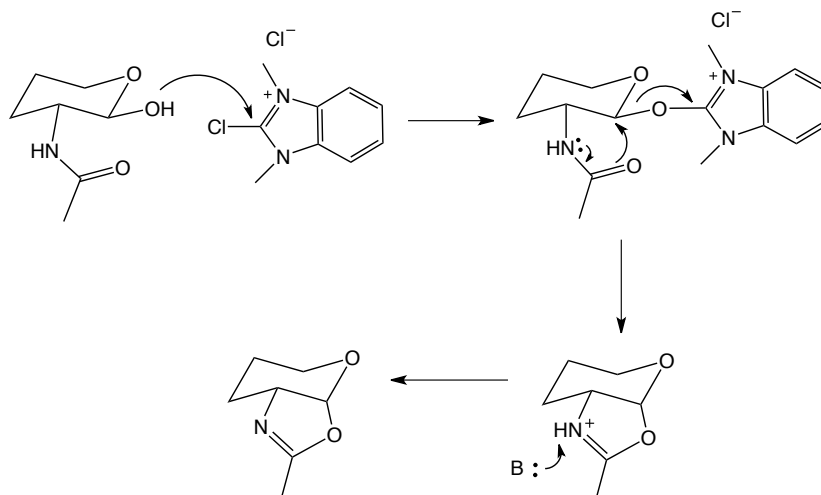


Figura 4. 7. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN obtenido para el producto  $\alpha$ -GalF.

#### 4.1.4.1 Síntesis del aceptor GlcN-oxazolina

Dada la relevancia de los derivados oxazolina de GlcNAc en la síntesis enzimática de oligosacáridos, polisacáridos y glicoproteínas se han explorado diversas vías sintéticas para su obtención. Una de las vías más populares era la síntesis empleando el carbohidrato de partida protegido, estas reacciones requerían la utilización de ácidos de Lewis fuertes los cuales a menudo causaban la ruptura de los enlaces glicosídicos<sup>129</sup>. Con la finalidad de crear una vía eficiente de síntesis de azúcares de oxazolina, Shoda y colaboradores<sup>130</sup> propusieron la síntesis directa de estos compuestos partiendo del carbohidrato desacetilado empleando una carbodiimida soluble en agua como reactivo deshidratante, siendo éste el reactivo CDMBI (cloruro de 2-cloro-1,3-dimetil-1H-benzimidazol-3-io). Para la síntesis del aceptor GlcN-oxazolina se siguió la metodología propuesta por Shoda, empleando como reactivos GlcNAc y CDMBI. Para que se de la formación del anillo oxazolina, es esencial que se de la condensación intramolecular entre el grupo 2-acetamido y el C anomérico. Con la finalidad de potenciar la nucleofilia del OH anomérico será necesario emplear una base en la reacción. El mecanismo de formación del anillo oxazolina requiere el ataque preferencial del OH anomérico al C-2 del reactivo CDMBI formando

el intermedio con configuración  $\beta$ . A continuación, se da el ataque intramolecular del O del carbonilo del grupo 2-acetamido a C-1 seguido por la desprotonación de la amida por parte de la base, dando lugar a la formación del azúcar oxazolina (**Figura 4. 8**)<sup>130</sup>.



**Figura 4. 8.** Mecanismo de reacción para la formación de azúcares oxazolina descrito en<sup>129,130</sup>.

Dado que la reacción de formación del anillo oxazolina requiere una base se realizarán reacciones empleando  $\text{Et}_3\text{N}$  o  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . En primer lugar, se testó la reacción con la base  $\text{Et}_3\text{N}$  y se realizó su desalado con acetonitrilo (AcN), el producto GlcN-oxazolina sintetizado no se obtuvo puro ya que éste contenía  $\text{Et}_3\text{N}$ . Por otro lado, tras realizar la reacción con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  y su posterior desalado se obtuvo el producto deseado con unos rendimientos del 100%, sugiriendo que las sales o el exceso de reactivo continuaban estando presentes en el producto obtenido. Estos resultados concuerdan con los presentados en Schmölzer 2019<sup>88</sup> donde se reporta que la purificación de la reacción propuesta por Shoda<sup>130</sup> con acetonitrilo da lugar a unos bajos rendimientos de purificación, por lo que será importante controlar la relación pureza/rendimiento del producto sintetizado tras su tratamiento con acetonitrilo. El producto obtenido se caracterizó mediante RMN 1D ( $^1\text{H}$ ) y 2D (COSY y HSQC) (**Figura 4. 9** y **Figura 4.10**), conformando la obtención del producto mediante la asignación de la señal característica del H-1 en presencia del anillo oxazolina por  $^1\text{H}$ -RMN (6.08 ppm, 1H, d,  $J = 7.3$  Hz, H-1).

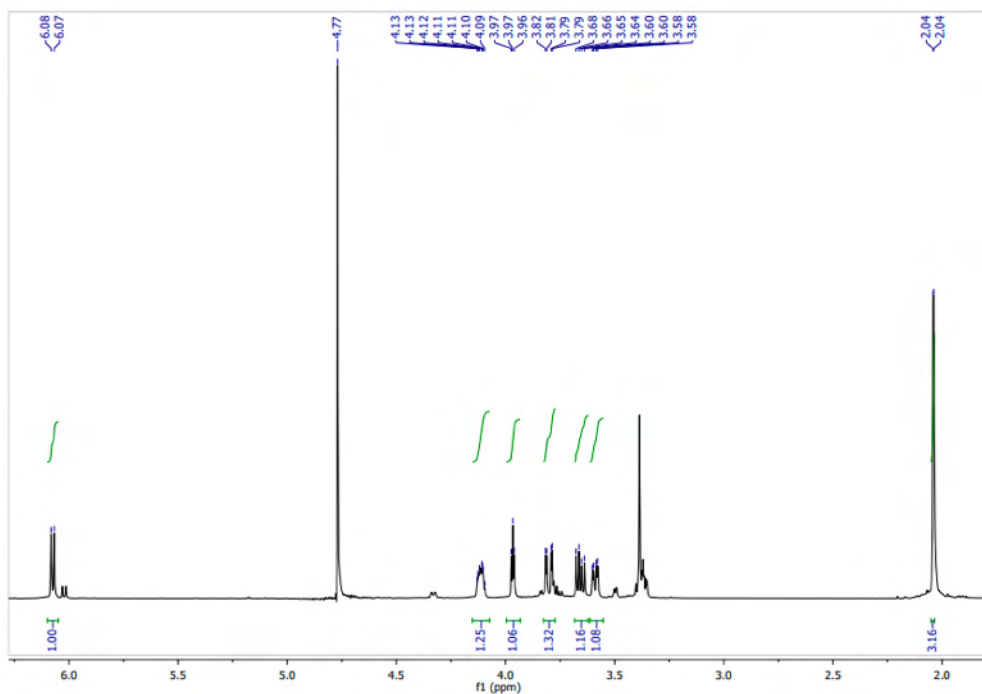


Figura 4. 9. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto GlcN-oxazolina.

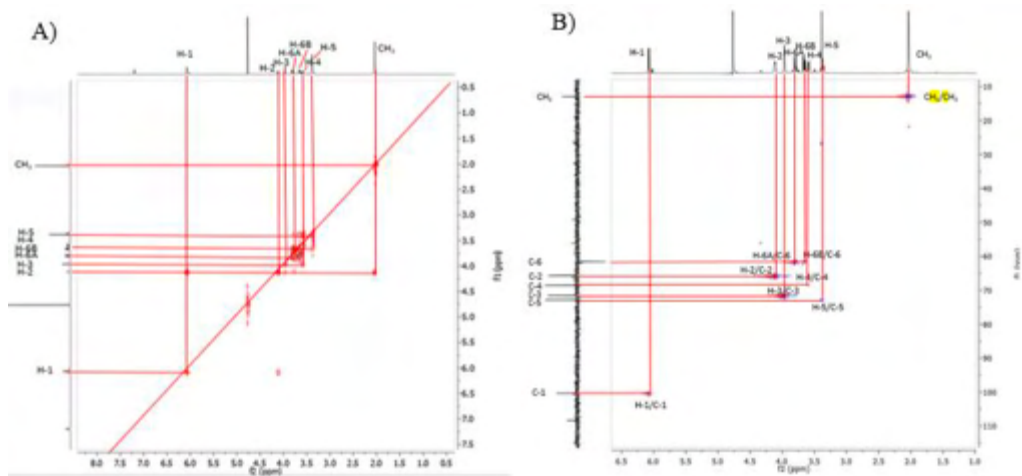


Figura 4.10. A) Espectro COSY del compuesto GlcN-oxazolina. B) Espectro HSQC del compuesto fluoruro GlcN-oxazolina.

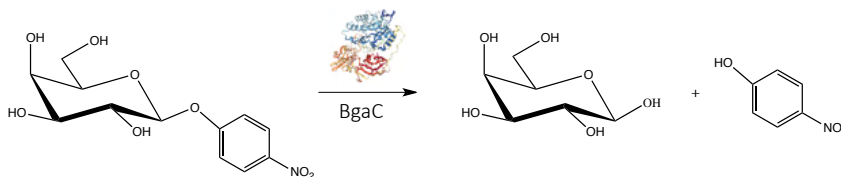
## 4.2 Exploración de la reacción glicosintasa de BgaC para la obtención del compuesto LNB-oxazolina

La primera reacción propuesta de la síntesis en cascada de LNT es la obtención del disacárido LNB-oxazolina empleando la glicosintasa BgaC E233G y los sustratos GlcN-oxazolina y  $\alpha$ -GalF . En esta sección se evaluará la actividad hidrolítica y glicosintasa de las enzimas BgaC nativa y su mutante E233G.

- **Actividad hidrolítica**

Debido a que la enzima BgaC hidroliza específicamente los enlaces Gal $\beta$ 1-3 terminales de los oligosacáridos, la actividad hidrolítica de la enzima nativa y su variante glicosintasa ha sido testada frente al sustrato Gal $\beta$ -pNP. Para la caracterización de esta actividad se han fijado las siguientes condiciones de reacción: 5 mM Gal $\beta$ -pNP, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7, 30°C, siendo la concentración de enzima variable en función de la proteína estudiada.

Concretamente BgaC hidroliza el enlace presente entre la galactosa y la molécula de pNP produciendo la liberación del cromóforo. Éste, gracias a la alcalinización del medio mediante una solución 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (método discontinuo) podrá ser cuantificado por métodos espectrofotométricos (Abs 405 nm).

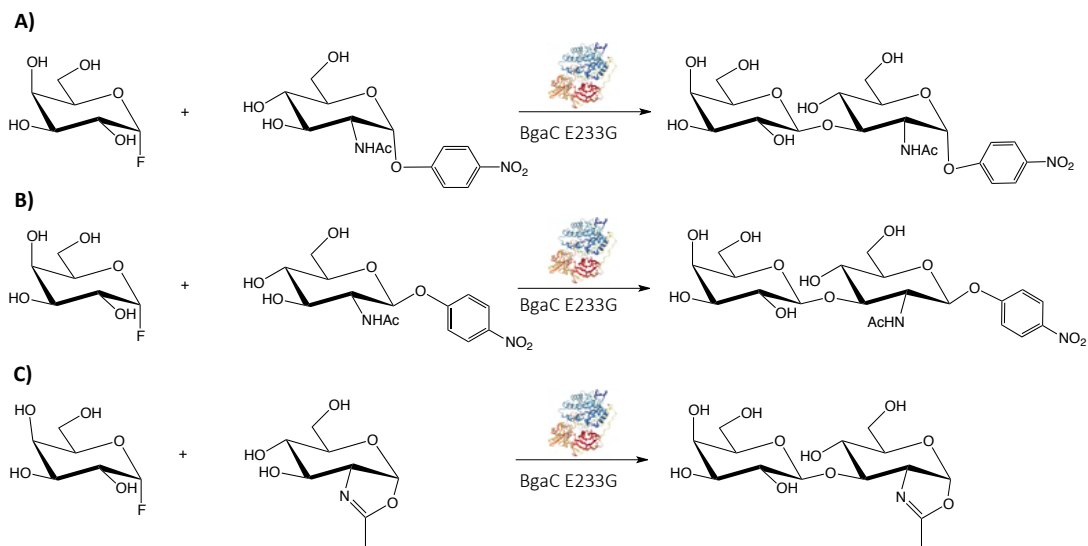


**Figura 4. 11.** Reacción de hidrólisis catalizada por la enzima BgaC, empleando como sustrato Gal $\beta$ -pNP. Las condiciones de reacción empleadas para el análisis de la actividad hidrolítica son: BgaC variable, 5 mM Gal $\beta$ -pNP, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7, 30°C.

- **Actividad glicosintasa**

Dado que la primera etapa de la reacción en cascada de LNT es la síntesis del disacárido LNB-oxazolina, se pretende caracterizar la actividad glicosintasa de BgaC E233G empleando como sustratos  $\alpha$ -GalF GlcN-oxazolina. En primer lugar, se realizarán reacciones exploratorias empleado los aceptores comerciales GlcNAc $\beta$ -pNP y GlcNAc $\alpha$ -pNP, hecho que nos permitirá confirmar la preferencia de esta enzima por sustratos con conformación  $\alpha$ <sup>120,121</sup> (**Figura 4. 12**). Confirmada la actividad glicosintasa de la enzima se testará el sustrato GlcN-oxazolina como aceptor para la síntesis del disacárido de interés.

Para el estudio de la actividad glicosintasa se fijaron las siguientes condiciones iniciales: 15  $\mu$ M BgaC Glu233Gly, 1 mM  $\alpha$ -GalF, 2 mM aceptor (GlcNAc $\beta$ -pNP/GlcNAc $\alpha$ -pNP/GlcN-oxazolina), 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7, 30°C.

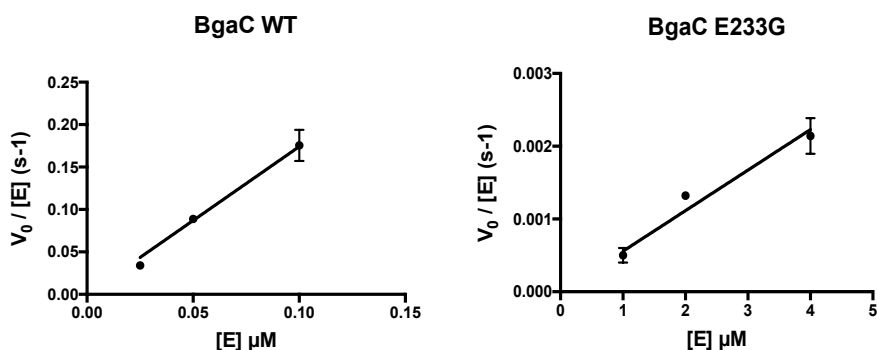


**Figura 4. 12.** Reacciones glicosintasa catalizadas por la enzima BgaC E233G exploradas en este trabajo. En éstas se testará la reacción glicosintasa empleando  $\alpha$ -GalF como dador frente a los sustratos A) GlcNAc $\alpha$ -pNP, B) GlcNAc $\beta$ -pNP y C) GlcN-oxazolina (configuración  $\alpha$ ).

La evolución de la reacción glicosintasa será analizada mediante dos métodos analíticos distintos, TLC y <sup>1</sup>H-RMN.

#### 4.2.1 Estudio de la actividad hidrolítica de BgaC

Para la caracterización de la actividad hidrolítica de las enzimas BgaC wt y su mutante glicosintasa se han realizado reacciones empleado en cada una de ellas una concentración de enzima distinta. Una vez determinada su velocidad inicial ( $V_0$ ), y con la finalidad de determinar la actividad específica ( $SA_H$ ), se representa la  $V_0$  frente a la concentración de enzima empleada obteniendo los gráficos mostrados en la **Figura 4. 13**.



**Figura 4. 13.** Determinación de la actividad específica de hidrólisis de las enzimas BgaC WT y BgaC E233G. Condiciones de reacción: BgaC variable, 5 mM Galβ-pNP, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7, 30°C

En la **Tabla 4. 1** se muestran los valores obtenidos de  $SA_H$  (s<sup>-1</sup>) para ambas proteínas, así como su actividad hidrolítica residual (%H).

**Tabla 4. 1.** Actividad hidrolítica específica de BgaC WT y su mutante glicosintasa (E233G) frente al sustrato Galβ-pNP.

Proteína	$SA_H$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	%H (mut/wt)
BgaC WT	$1.73 \pm 0.15$	100
BgaC Glu233Gly	$5.5 \cdot 10^{-4} \pm 0.7 \cdot 10^{-4}$	0.03

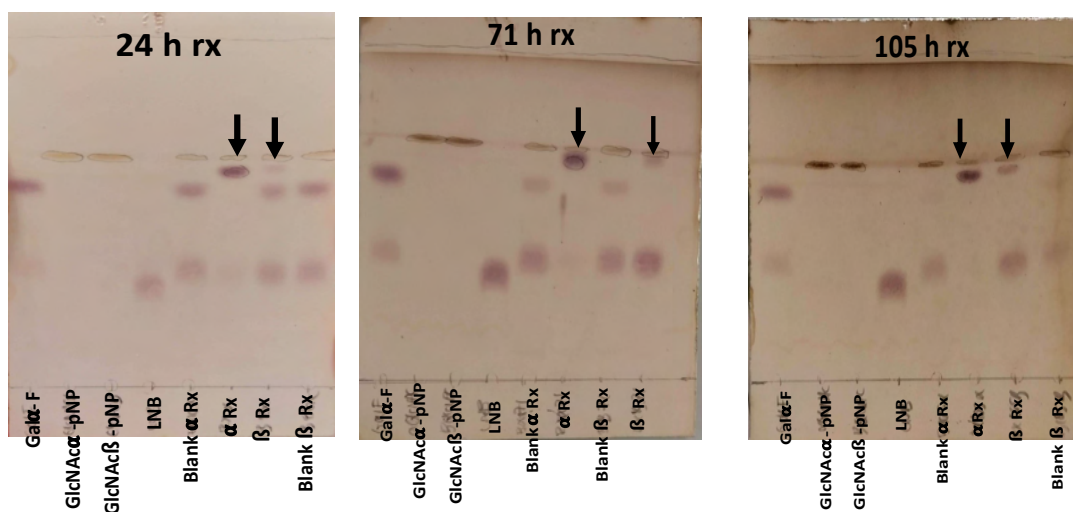
Condiciones de reacciones: BgaC variable, 5 mM Galβ-pNP, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7, 30°C.

La variante E233G muestra una pérdida notable de actividad hidrolítica respecto a la determinada para la enzima wt, presentando unos valores de  $SA_H$  de 5 ordenes de magnitud inferior. La reducción de esta actividad es importante para tener una glicosintasa eficiente, ya que así el producto formado no será hidrolizado por la enzima.

#### 4.2.2 Estudio de la actividad glicosintasa de BgaC

En primer lugar, se caracterizó la actividad glicosintasa de la enzima BgaC E233G frente a los aceptores GlcNAcβ-pNP y GlcNAcα-pNP, empleando en ambas reacciones el dador α-GalF. Se estudió la evolución de la reacción hasta transcurridos 4 días mediante su análisis por TLC (8:2 AcN:H<sub>2</sub>O), en el cual también se analizarán los patrones de reacción LNB, GlcNAcβ-pNP, GlcNAcα-pNP y α-GalF. Para esta reacción exploratoria se realizó un blanco de reacción para cada aceptor empleado, en el cual no se ha adicionado enzima.

En la **Figura 4. 14** se muestran las TLCs resultantes del análisis de las reacciones a las 24, 72 y 105 (tiempo final) horas.



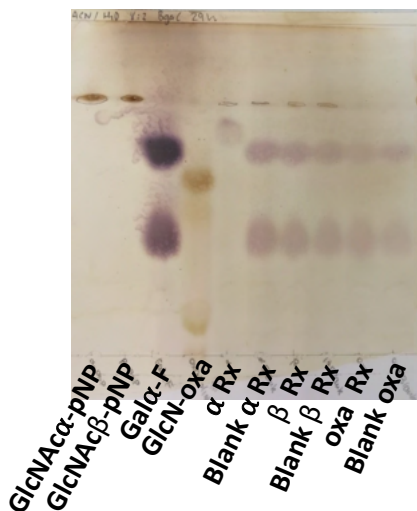
**Figura 4. 14.** Evolución de las reacciones glicosintasa de la enzima BgaC E233G, empleando como dador  $\alpha$ -GalF frente a los aceptores GlcNAc $\beta$ -pNP, GlcNAc $\alpha$ -pNP. En las TLCs se han analizado las reacciones, los patrones y los blancos realizados a tiempos 24, 72 y 105 horas. Gal $\alpha$ -F: patrón de  $\alpha$ -GalF, GlcNAc $\alpha$ -pNP: control de GlcNAc $\alpha$ -pNP, GlcNAc $\beta$ -pNP: patrón de GlcNAc $\beta$ -pNP, LNB: patrón de LNB,  $\alpha$  Rx: reacción realizada con el aceptor GlcNAc $\alpha$ -pNP, Rx  $\beta$ : reacción realizada con el aceptor GlcNAc $\beta$ -pNP, Blank Rx  $\alpha$ : blanco de reacción realizado con el aceptor GlcNAc $\alpha$ -pNP, Blank Rx  $\beta$ : blanco de reacción realizado con el aceptor GlcNAc $\beta$ -pNP. La fase móvil empleada en este análisis por capa fina ha sido 8:2 (AcN:H<sub>2</sub>O).

Analizadas las reacciones se identifica como tras 5 horas de reacción se empieza a apreciar sutilmente la formación del producto de reacción LNB $\alpha$ -pNP (TLC no mostrada), siendo a las 24 horas donde la señal del producto empieza a ser notoria (**Figura 4. 14**, izquierda). Se observa como la mancha correspondiente a LNB $\alpha$ -pNP no pierde intensidad tras 105 horas de reacción, sugiriendo que la enzima E233G presenta una baja hidrólisis secundaria.

Por otro lado, las reacciones realizadas con el aceptor GlcNAc $\beta$ -pNP tienen lugar de manera más lenta observándose la leve formación del producto de reacción trascurridas 24 horas. Estos resultados concuerdan con los reportados bibliográficamente, estableciendo la preferencia de la enzima BgaC E233G por aceptores con conformación  $\alpha$ . Si bien en los estudios realizados por Chao y colaboradores<sup>121</sup> se concluía que la enzima no era capaz de aceptar GlcNAc $\beta$ -pNP como molécula aceptor, en este trabajo se aprecia como la enzima sí presenta cierta actividad sobre este sustrato, siendo esta muy menor a la mostrada sobre el aceptor GlcNAc $\alpha$ -pNP (**Figura 4. 14**). Como resultado de esta actividad se observa como la intensidad del producto LNB $\beta$ -pNP incrementa a mayores tiempos de reacción, siendo la intensidad de la banda muy inferior comparada con la del producto LNB $\alpha$ -pNP.

Gracias a las reacciones realizadas hasta el momento se ha podido determinar que la enzima BgaC E233G es activa y es capaz de actuar como glicosintasa, sintetizando los compuestos LNB $\beta$ -pNP y LNB $\alpha$ -pNP. Dado que el interés principal de este estudio es la síntesis del disacárido LNB-oxazolina, a continuación, se evalúa si el substrato GlcN-oxazolina puede actuar como aceptor de la enzima BgaC E233G. Para ello se empleó el producto GlcN-oxazolina sintetizado y se empleó como aceptor en la reacción glicosintasa frente al dador  $\alpha$ -GalF, empleando las condiciones estándares para esta reacción.

En la **Figura 4. 15** se muestra la TLC obtenida tras 29 horas de reacción de las tres reacciones glicosintasa frente a los aceptores GlcNAc $\beta$ -pNP, GlcNAc $\alpha$ -pNP y GlcN-oxazolina.



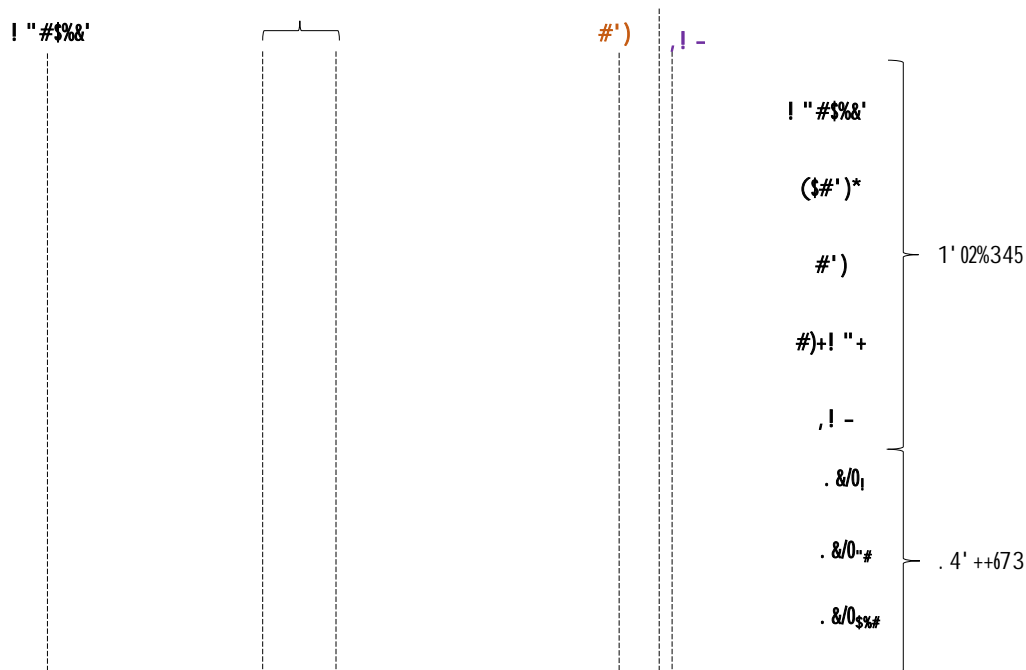
**Figura 4. 15.** Reacción glicosintasa de la enzima BgaC E233G, empleando como dador  $\alpha$ -GalF frente a los aceptores GlcNAc $\beta$ -pNP, GlcNAc $\alpha$ -pNP y GlcN-oxazolina tras 29 horas de reacción. En las TLCs se han analizado las reacciones, los patrones y los blancos realizados a tiempos 24, 72 y 105 horas. Gal $\alpha$ -F: patrón de  $\alpha$ -GalF, GlcNAc $\alpha$ -pNP: control de GlcNAc $\alpha$ -pNP, GlcNAc $\beta$ -pNP: patrón de GlcNAc $\beta$ -pNP, GlcN-oxa: patrón de GlcN-oxazolina,  $\alpha$  Rx: reacción realizada con el aceptor GlcNAc $\alpha$ -pNP, Rx  $\beta$ : reacción realizada con el aceptor GlcNAc $\beta$ -pNP, Blank  $\alpha$  Rx: blanco de reacción realizado con el aceptor GlcNAc $\alpha$ -pNP, Blank Rx  $\beta$ : blanco de reacción realizado con el aceptor GlcNAc $\beta$ -pNP, oxazolina Rx: reacción realizada con el aceptor GlcN-oxazolina, Blank oxazolina: blanco de reacción realizado con el aceptor GlcN-oxazolina. La fase móvil empleada en este análisis por capa fina ha sido 8:2 (AcN:H<sub>2</sub>O).

En la **Figura 4. 15** únicamente se aprecia la formación del producto de reacción LNB $\alpha$ -pNP, no observándose el producto de reacción LNB-oxazolina en la reacción realizada con el dador GlcN-oxazolina.

Dados los resultados obtenidos se decidió modificar las condiciones de la reacción glicosintasa objetivo, incrementando la concentración de dador y aceptor en reacción (5 mM  $\alpha$ -GalF y 5 mM GlcN-oxazolina).



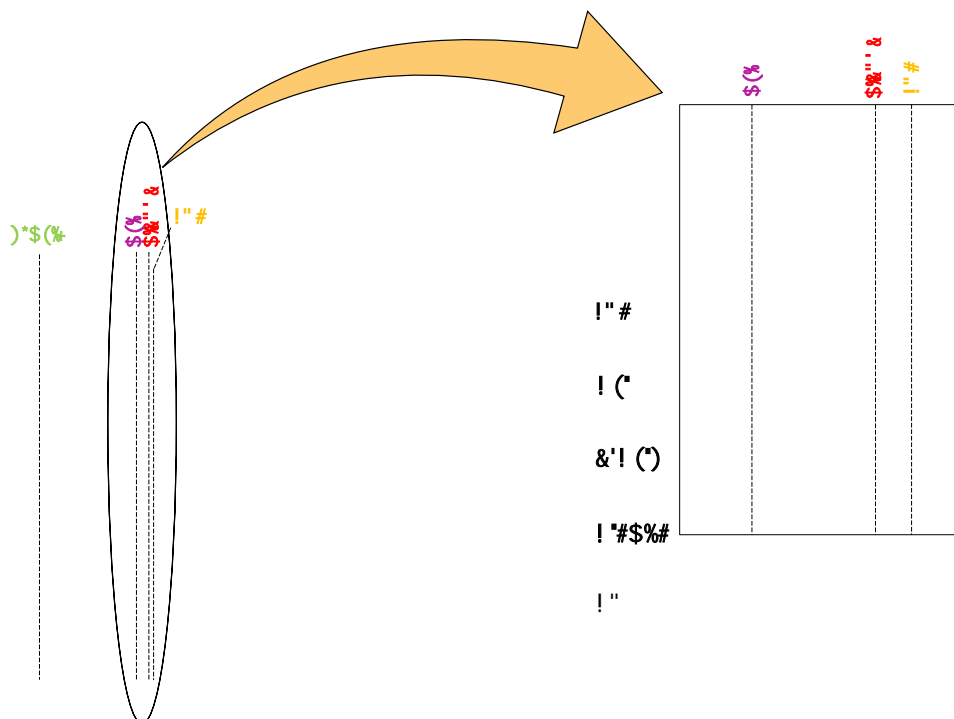
De nuevo, no se identificó el compuesto de interés LNB-oxazolina mediante TLC observando en esta ocasión la presencia del disacárido LNB. Considerando estos resultados obtenidos se plantean dos escenarios posibles i) la enzima sí sería capaz de formar el compuesto LNB-oxazolina, pero éste sería hidrolizado posteriormente, ii) el aceptor GlcN-oxazolina es hidrolizado y el GlcNAc resultante, es utilizado como aceptor en la reacción glicosintasa para formar LNB. Con la finalidad de hallar respuesta a este hecho, se monitorizó la reacción por  $^1\text{H-RMN}$  (Figura 4. 16).



**Figura 4. 16.** Zoom del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  solapado de las reacciones enzimáticas realizadas a una concentración de aceptor y dador de 5 mM. De arriba a bajo se muestran: patrón de GlcN-oxazolina (negro), patrón de  $\alpha\text{-GalF}$  (verde claro), patrón de Gal (naranja), patrón de GlcNAc (amarillo), patrón de LNB (lila), reacción a tiempo 0 (verde), reacción a las 5h (rojo), reacción a las 24 horas (azul).

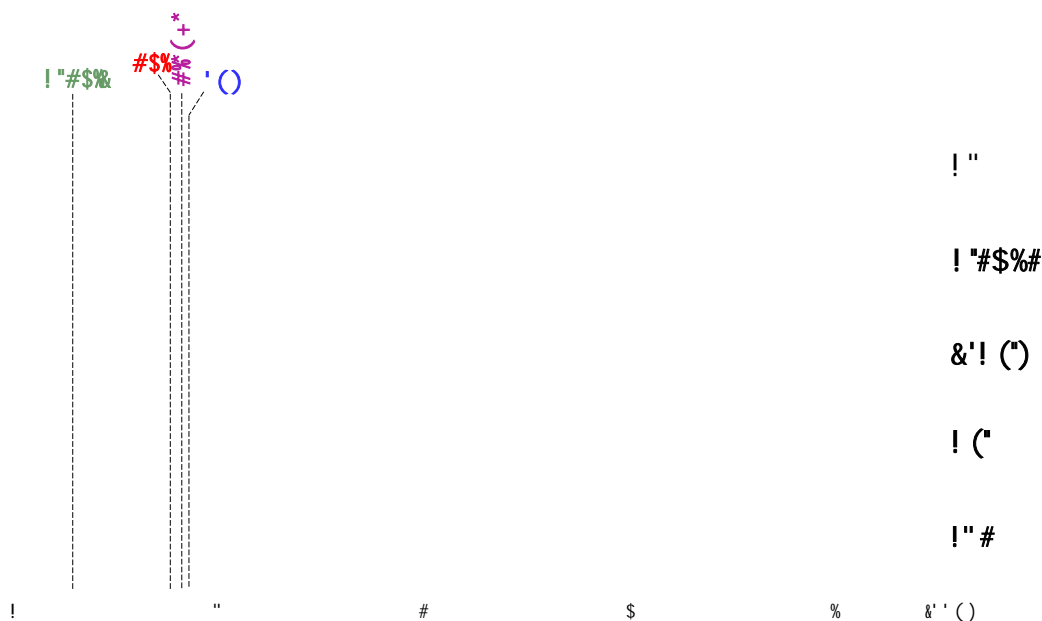
En los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  se siguen las señales características de los H anoméricos de los productos GlcN-oxazolina (6.11 ppm),  $\alpha\text{-GalF}$  (5.74 ppm), Gal (5.27 ppm), GlcNAc (5.20 ppm) y LNB (5.19 ppm). Se observa como a las 5 horas de reacción el aceptor GlcN-oxazolina sigue presente en la reacción, identificándose su señal característica a 6.11ppm. Todo y apreciar una disminución de la señal del aceptor no se observa formación de LNB-oxazolina, indicando su hidrólisis. A las 24 horas de reacción la señal correspondiente a GlcN-oxazolina ha desaparecido, identificando ahora una pequeña señal (5.19 ppm) en la región de LNB. A este tiempo de reacción también se observa una hidrólisis considerable de los sustratos  $\alpha\text{-GalF}$  y GlcN-oxazolina, identificando sus productos de hidrólisis Gal y GlcNAc. Los resultados obtenidos sugieren que el aceptor GlcN-oxazolina es hidrolizado y el producto generado GlcNAc podría actuar como aceptor par la enzima BgaC E233G.

Para corroborar esta hipótesis se realizó la reacción enzimática empleando GlcNAc como aceptor (5 mM  $\alpha$ -GalF y 5 mM GlcNAc); tras 48 horas de reacción se identifica por  $^1\text{H}$ -RMN el producto LNB (0.7 mM, 14% de rendimiento de LNB), confirmando así, que GlcNAc puede ser empleado como aceptor por la glicosintasa (**Figura 4. 17**).



**Figura 4. 17.** Estudio de GlcNAc como aceptor: espectro solapado de la reacción 5 mM  $\alpha$ -GalF y 5 mM GlcNAc. De arriba a bajo se muestran: patrón de LNB (amarillo), patrón de Gal (lila), patrón de  $\alpha$ -GalF (verde), patrón de GlcNAc (rojo), reacción a las 48 horas (azul). También se muestra el zoom de la zona de interés, donde se identifican las señales características de LNB y GlcNAc.

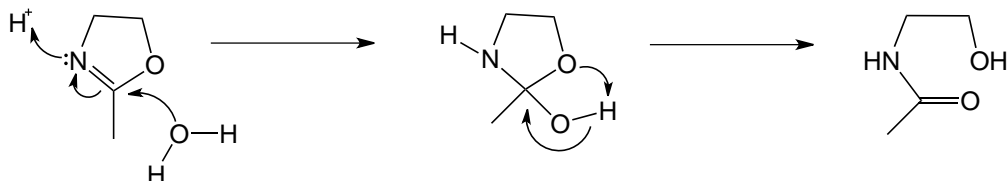
Para confirmar que la enzima no es capaz de realizar la reacción de auto-condensación del dador  $\alpha$ -GalF, se realizaron reacciones exclusivamente en presencia de este compuesto (5 mM  $\alpha$ -GalF). Tras su monitorización por  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 4. 18**) no se identificó la formación de ningún producto de reacción, detectando únicamente la señal de  $\alpha$ -GalF, descartando así que la enzima BgaC E233G pueda emplear este sustrato como aceptor.



**Figura 4. 18.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la reacción de autocondensación del sustrato de  $\alpha$ -GalF. En éste se muestran solapados los espectros: Reacción de autocondensación (amarillo), patrón de GlcNAc (lila), patrón de  $\alpha$ -GalF (verde), patrón de Gal (rojo), patrón LNB (azul).

### 4.2.3 Estudio de la hidrólisis del aceptor GlcN-oxazolina

En la sección anterior se concluyó que el aceptor GlcN-oxazolina era hidrolizado durante las primeras 24 horas de reacción, dando lugar al compuesto GlcNAc. Los anillos oxazolina son compuestos inestables en medio ácido ya que en estas condiciones se origina su hidrólisis. Esta reacción está mediada por el ataque nucleofílico de la molécula de agua al C2 del anillo a la vez que el N capta un  $\text{H}^+$  del medio, originando así la abertura del anillo oxazolina<sup>131</sup> (**Figura 4. 19**).

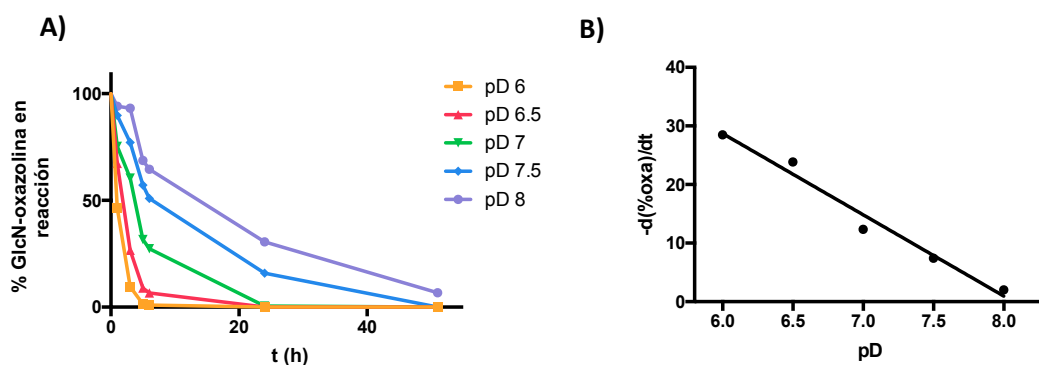


**Figura 4. 19.** Mecanismo de hidrólisis del grupo oxazolina en condiciones ácidas.

Dado que la hidrólisis del anillo oxazolina se ve altamente influenciada por el pH del medio, se evaluó el comportamiento del dador GlcN-oxazolina frente a diferentes pD (pD: pH en presencia de disolventes deuterados). Concretamente se estudió la velocidad de hidrólisis de GlcN-oxazolina (16 mM) a pD 6, 6.5, 7, 7.5 y 8, monitorizando la reacción mediante  $^1\text{H}$ -RMN. Cabe destacar que en este

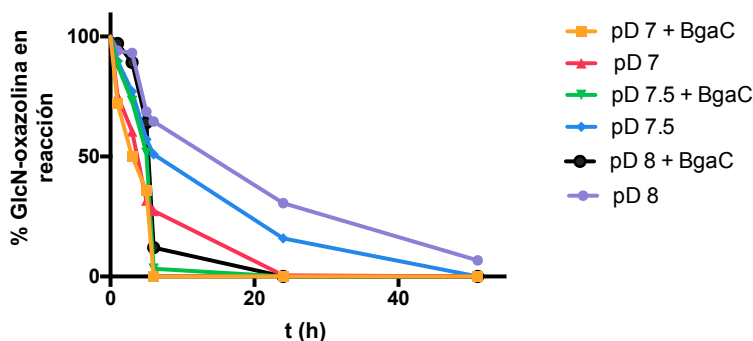
estudio solamente se evalúa la hidrólisis espontánea del producto, por lo que no se introducirá enzima en la reacción.

En la **Figura 4. 20** se observa como la hidrólisis del sustrato GlcN-oxazolina presenta una gran dependencia con el pD. Concretamente en el rango de pDs estudiados se identifica una relación lineal entre este parámetro y la  $V_0$  de hidrólisis del sustrato GlcN-oxazolina (**Figura 4. 20, B**), obteniendo una mayor velocidad de hidrólisis en las reacciones realizadas a pD 6 y 6.5. Trascurridas 24 horas se puede apreciar como en las reacciones realizadas a pDs 7.5 y 8 el aceptor GlcN-oxazolina no ha sido totalmente hidrolizado, mientras que a las realizadas a pD 6, 6.5 y 7 sí.



**Figura 4. 20.** A) Monitorización de la hidrólisis de GlcN-oxazolina (16 mM) a diferentes pD de reacción en ausencia de enzima. B) Representación de la velocidad de hidrólisis inicial (calculada durante las 3 primeras horas de reacción) vs los diferentes pD de estudio.

Una vez determinada la existencia de hidrólisis espontánea del aceptor GlcN-oxazolina se estudiará si esta reacción también estar catalizada por la enzima BgaC E233G, para ello se realizaron reacciones con GlcN-oxazolina (16 mM) en presencia y ausencia de enzima a pD 7, 7.5 y 8.

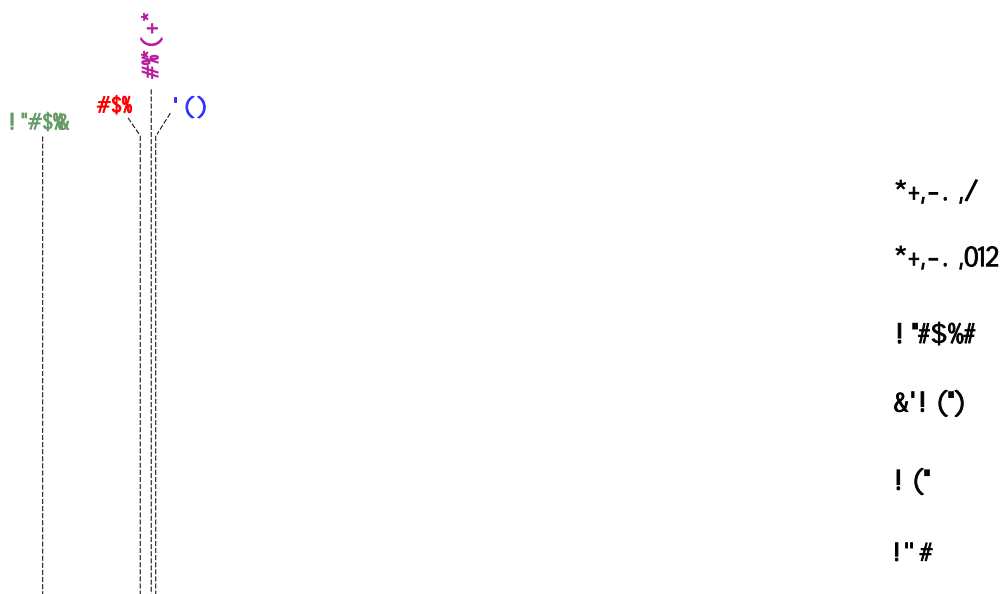


**Figura 4. 21.** Monitorización mediante H-RMN de la hidrólisis del sustrato GlcN-oxazolina a diferentes pD y en presencia y ausencia de BgaC E233G.

En la **Figura 4. 21** se aprecia como a tiempos cortos de reacción (hasta 3 horas) el grado de hidrólisis del sustrato GlcN-oxazolina no se ve afectado por la presencia de Bga. No obstante, a tiempos largos de reacción se identifica que el grado de hidrólisis es notablemente superior en aquellas reacciones en presencia de enzima, sugiriendo que ésta podría hidrolizar el aceptor GlcN-oxazolina.

#### 4.2.4 Exploración de la reacción glicosintasa a pD alcalinos

A lo largo de este capítulo se ha explorado la reacción glicosintasa de BgaC a pH 7, determinando que la enzima no reconoce el sustrato GlcN-oxazolina como aceptor. Como se ha determinado anteriormente, el sustrato GlcN-oxazolina presenta una mayor estabilidad a pDs alcalinos. Considerando estos resultados, se han realizado nuevas reacciones glicosintasa a pD 7.5 y 8 empleando las siguientes condiciones de reacción: 5 mM  $\alpha$ -GalF y 5 mM GlcN-oxazolina, 15 mM BgaC E233G 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pD según reacción) y 30°C. Además, se realizaron reacciones como control positivo empleando el aceptor GlcNAc $\alpha$ -pNP. Las condiciones empleadas para el control positivo fueron 1 mM  $\alpha$ -GalF y GlcNAc $\alpha$ -pNP, 15 mM BgaC E233G 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pD 8 y 30°C. La actividad de la enzima fue monitorizada mediante  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 4. 22**).



**Figura 4. 22.** Espectro de la reacción de glicosintasa a pDs 7.5 y 8. En éste se muestran solapados los espectros: reacción a pH 8 (naranja), reacción a pH 7.5 (amarillo), patrón GlcNAc (lila), patrón de  $\alpha$ -GalF (verde), patrón Gal (rojo) y patrón LNB (azul).

Los espectros obtenidos revelaron que la enzima BgaC E233G sí es activa hasta pDs de 8, ya que en la reacción del control positivo se identificó la formación del compuesto LNB $\alpha$ -pNP a las 24 horas de reacción. Aunque a pDs de 7.5 y 8 se observa como el aceptor GlcN-oxazolina permanece estable en reacción durante más de 24 horas no se aprecia la formación del disacárido LNB-oxazolina, concluyendo que GlcN-oxazolina no es sustrato para la enzima BgaC E233G. No obstante, en las reacciones realizadas se identifica de nuevo la formación del disacárido LNB, confirmando así que el producto resultante de la hidrólisis del aceptor (GlcNAc), puede ser empleado como aceptor por BgaC.

En este capítulo se ha evaluado el mutante E233G de BgaC como potencial biocatalizador para la síntesis del disacárido LNB-oxazolina mediante la estrategia glicosintasa, empleando los sustratos  $\alpha$ -GalF y GlcN-oxazolina. Dado que esta reacción no ha sido reportada, en primer lugar, se ha estudiado la especificidad de la enzima frente a los aceptores GlcNAc $\alpha$ -pNP, GlcNAc $\beta$ -pNP, concluyendo que ésta presenta mayor afinidad por carbohidratos con conformación  $\alpha$ . Considerando los resultados obtenidos se testó GlcN-oxazolina como aceptor, ya que éste presenta la conformación preferencial de la enzima, con la finalidad de sintetizar el compuesto LNB-oxazolina. Tras evaluar la reacción glicosintasa del mutante E233G frente a los sustratos  $\alpha$ -GalF y GlcN-oxazolina se concluye que la enzima no puede aceptar GlcN-oxazolina como aceptor, imposibilitando así la formación del disacárido LNB-oxazolina, y por lo tanto la reacción secuencial propuesta en este capítulo.

Considerando los resultados obtenidos se abren nuevas vías de estudio. Por un lado, se podría realizar el rediseño de los subsitios positivos de BgaC con el objetivo de modificar su especificidad, e intentar que ésta acepte GlcN-oxazolina como aceptor. Y, por otro lado, dado que el mutante D320E\_W394F no ha sido caracterizado en esta tesis, será interesante estudiar en un futuro su actividad glicosintasa frente a los sustratos LNB-oxazolina y lactosa, para evaluar si éste puede sintetizar el compuesto LNT.

### 4.3 Conclusiones del capítulo

En este capítulo se ha explorado la primera etapa de la síntesis secuencial de LNT propuesta en este proyecto, siendo su objetivo la formación del disacárido LNB-oxazolina mediante la utilización de la glicosintasa de BgaC E233G empleando como dador  $\alpha$ -GalF y aceptor GlcN-oxazolina.

Clonado y expresado el mutante E233G de BgaC se ha corroborado que dicha variante presenta actividad glicosintasa la cual ha sido testada frente al dador  $\alpha$ -GalF y los aceptores GlcNAc $\alpha$ -pNP, GlcNAc $\beta$ -pNP y GlcN-oxazolina. Realizada la exploración de la actividad frente a los diferentes aceptores se ha confirmado que la enzima presenta una mayor afinidad por oligosacáridos con

conformación  $\alpha$  (GlcNAc $\alpha$ -pNP) dando lugar al producto de reacción LNB $\alpha$ -pNP. Por el contrario, se ha determinado que la enzima no acepta el aceptor GlcN-oxazolina como sustrato.

Durante la exploración de la reacción glicosintasa con los sustratos GlcN-oxazolina y  $\alpha$ -GalF y se ha identificado la formación del disacárido LNB. Tras estudiar la estabilidad del aceptor, se ha observado que a las 24 horas de reacción éste ha sido completamente hidrolizado generando GlcNAc, el cual es empleado como aceptor en la síntesis de LNB.

Durante el estudio de la estabilidad del aceptor GlcN-oxazolina se ha concluido que éste presenta menor grado de hidrólisis a pDs alcalinos (7.5 y 8), perdurando en reacción hasta 48 horas. Dados estos resultados se ha explorado la actividad glicosintasa de la enzima a pDs 7.5 y 8 determinando que la enzima es activa y capaz de catalizar la reacción glicosintasa, ya que se da la síntesis de LNB $\alpha$ -pNP, siendo ésta inactiva frente al aceptor GlcN-oxazolina.

Evaluada la actividad glicosintasa de la enzima BgaC E233G, se concluye que esta no es capaz de emplear el sustrato GlcN-oxazolina como aceptor bajo las condiciones de reacción propuestas en este trabajo. Dado que no se ha caracterizado el mutante D320E\_W394F, se considera de especial interés para el proyecto estudiar en un futuro su actividad glicosintasa

## Conclusiones

---





## Conclusiones

1. Realizado el estudio racional y estructural de los subsitios negativos de la enzima LnbB se identificaron 13 posiciones involucradas en la unión del dador LNB. La relevancia de estos residuos se evaluó mediante la creación de 19 mutantes, de los cuales se caracterizó su actividad hidrolítica y de transglicosidación, obteniendo 5 mutantes (W394F, Q190L, N259Q, H263R y H263A) capaces de sintetizar el compuesto de interés, LNT, en unos rendimientos superiores al 15%.
2. Combinando los mejores mutantes simples entre ellos y con el mutante Y419F se diseñaron y crearon 7 dobles mutantes. Realizada su caracterización cinética se determinó que las dobles mutaciones no permitían incrementar los rendimientos sintéticos obtenidos con los mutantes simples.
3. Caracterizada la actividad de transglicosidación de los mutantes de los subsitios negativos de la enzima LnbB, se concluye que el mutante W394F es el biocatalizador más eficiente sintetizando el tetrasacárido de interés con un rendimiento del 32% y con una ratio aparente T/H del mutante de 1.4, permitiendo un mayor desbalanceo hacia la actividad sintética. Se confirma que el enlace glicosídico formado entre el dador LNB y el aceptor lactosa presenta una conformación  $\beta$ 1,3, confirmando que el producto de transglicosidación es el tetrasacárido LNT.
4. Tras analizar la relación entre la actividad de hidrólisis y TG de los diferentes mutantes se identificó que las variantes más transglicosídicas retienen entre un 0.07 - 1.6% la actividad hidrolítica de la enzima nativa, siendo este dato de gran utilidad para estudios de HTS (high throughput screening).
5. Dado que LnbB no presenta subsitios positivos definidos, el rediseño de esta región se realizó mediante la utilización del software BINDSCAN, seleccionando las posiciones Ile324 y Val426. Éstas fueron mutadas individualmente, combinadas y en combinación con el mejor mutante de los subsitios negativos (W394F), generando y caracterizando 6 nuevos. Los mutantes I324W, V426W y I324W\_V426W presentaron un gran carácter hidrolítico, el cual se ve reducido con la incorporación de la mutación W394F. Aun así, estas variantes en ninguna ocasión presentaron rendimientos de síntesis de LNT superiores a los obtenidos con el mutante simple W394F.

6. El incremento de la afinidad enzima-aceptor medido computacionalmente por BINDSCAN de los mutantes seleccionados no se ha traducido en una mejora de la reacción TG. Estos resultados podrían indicar que el modelo estructural escogido para los cálculos no es el correcto, o bien que la lactosa se une con un posicionamiento no catalítico o mediante un modo de unión no productivo.
7. Se ha clonado y caracterizado la actividad glicosintasa de la enzima BgaC E233G frente a diversos sustratos, determinando que todo y presentar una mayor afinidad por aceptores con conformación  $\alpha$  la enzima no es capaz de aceptar el dador GlcN-oxazolina bajo las condiciones de reacción testadas. Dados estos resultados no se ha podido sintetizar el dador LNB-oxazolina vía reacción glicosintasa con BgaC.
8. Durante el estudio de la estabilidad del sustrato GlcN-oxazolina a distintos pHs, se ha identificado cómo éste presenta menor hidrólisis química (espontánea) a pDs alcalinos (7.5 y 8).
9. En un futuro, se aplicará el mismo procedimiento de síntesis química de obtención de GlcN-oxazolina para obtener LNB-oxazolina y así, ensayarlo como sustrato para el biocatalizador de LnbB W394F\_D320E que combina el mejor biocatalizador de esta tesis con la tecnología glicosintasa.

## Capítulo 5      Materiales y métodos

---



En este capítulo se recopilan todos los protocolos que han sido necesarios para realizar este proyecto.

## 5.1 Generación de mutantes

Todos los mutantes realizados en este proyecto han sido generados mediante el método de mutagénesis dirigida Quick Change PCR (QC-PCR).

### 5.1.1 Primera generación de mutantes de LnbB

Para cada una de las mutaciones seleccionadas se ha diseñado una pareja de cebadores directo(Fw)/reverso (Rv), los cuales contienen una región no solapante en su extremo 3' y una región totalmente complementaria en su extremo 5'. En el centro de la región solapante se localizan los nucleótidos responsables de generar la mutación para ello se usará el menor número de nucleótidos no complementarios a la cadena molde para generar la mutación, la secuencia del nuevo aminoácido se diseñará considerando el codón *usage* de *E. coli*. En la **Tabla 5. 1** se muestran los cebadores diseñados.

**Tabla 5. 1.** Cebadores empleados para la obtención de la primera generación de mutantes de LnbB. En ésta se indica la mutación y la secuencia correspondiente al cebador directo y reverso.

Mutación	Cebador	Secuencia
Q190L	Fw	GTGCGCCTGTCTGATTAATATCTCTACGGATTGG
	Rv	GAGATATTAATCAGACAGGCCGACAGGGTTCGCAC
Q190H	Fw	GTGCGCCTGTCACATTAATATCTCTACGGATTGG
	Rv	GATATTAATGTGACAGGCCGACAGGGTTCGC
E216A	Fw	GCTGCTGGCGATGAAACTGAAACCGG
	Rv	GTTTCATCGCCAGCAGCACGTAGTTC
E216D	Fw	GCTGCTGGATATGAAACTGAAACCGG
	Rv	GTTTCATATCCAGCAGCACGTAGTTC
N259A	Fw	CGGAAATTGCCAGTCCGGGTACATGAACG
	Rv	CCCGGACTGGCAATTTCCGGGATCACATC
N259Q	Fw	CGGAAATTCAGAGTCCGGGTACATGAACG
	Rv	CCCGGACTCTGAATTTCCGGGATCACATC
H263A	Fw	GTCCGGGTGCGATGAACGTTTGGCTGGAAAATTATCC
	Rv	CGTTCATCGCACCCGGACTFTTAATTTCCGGG
H263R	Fw	CGGGTTCGCATGAACGTTTGGCTGGAAAATTATCC

	Rv	CGTTCATGCGACCCGGACTGTTAATTTCCGGG
<b>D320A</b>	Fw	TGGGCGCGGCGAATACATGATTGGTACC
	Rv	CATGTATTCCGCCGCGCCCATGTGCCAATATTTCCG
<b>D320E</b>	Fw	TGGGCGCGGGTGAATACATGATTGGTACC
	Rv	CATGTATTCTTCCGCCGCCCATGTGCCAATATTTCCG
<b>E321A</b>	Fw	GCGCGGATGCGTACATGATTGGTACCTCG
	Rv	AATCATGTACGCATCCGCGCCCATGTGCCAATATTTCCG
<b>W373F</b>	Fw	GCGCATCTTCAACGATGGTATTGTTAATACC
	Rv	CATCGTTGAAGATGCGCAGTTGTTTGC
<b>W394F</b>	Fw	GAATACTTCTACGGCGCCGGTCGTAAACCG
	Rv	GCGCCGTAGAAGTATTCGATAACGATGTCTTTG
<b>W394A</b>	Fw	CGAATACGCGTACGGCGCCGGTCGTAAACC
	Rv	GCGCCGTACGCGTATTCGATAACGATGTCTTTG
<b>W394K</b>	Fw	TTATCGAATACAAATACGGCGCCGGTCGTAAACC
	Rv	GCGCCGTATTTGATTCGATAACGATGTCTTTG
<b>W394E</b>	Fw	TCGAATACGAATACGGCGCCGGTCGTAAACC
	Rv	GCGCCGTATTCGATTCGATAACGATGTCTTTG
<b>W394Q</b>	Fw	CGAATACCAGTACGGCGCCGGTCGTAAACC
	Rv	GGCGCCGTACTGGTATTCGATAACGATGTCTTTG
<b>Y419F</b>	Fw	AGGCTCTGTTCTGGTCACGTTCCGGCACAAG
	Rv	ACGTGACCAGAACAGAGCCTGCGTTGCATTATCAGG
<b>Y427F</b>	Fw	GCACAAGTGTTCAAAGTTAACGCAGCTCG
	Rv	GTTAACTTTGAACACTTGTGCCGAACG
<b>W465F</b>	Fw	GTTTCGATTTTCCCGGATAGTTCCTATTTC
	Rv	CTATCCGGGAAAATCGAACTTTCGCAC
<b>D467A</b>	Fw	TTGGCCGGCGAGTTCCTATTTCAGACC
	Rv	ATAGGAACTCGCCGCCAAATCGAACTTTCCG
<b>D467E</b>	Fw	GATTTGGCCGGAAAGTTCCTATTTCC
	Rv	GAAATAGGAACTTTCGCGCCAAATCGAAAC
<b>L574V</b>	Fw	CAAAACATGTGGATGTCGTTACCC
	Rv	ACGACATCCACATGTTTTGAACCGG

Las reacciones de PCR se realizan con la polimerasa iProof High-Fidelity Master Mix 2x (0,04 U/ $\mu$ L, Bio-  
ra) mediante el termociclador Gene Pro Thermal Cycler (Bioer). Cada amplificación se realiza en  
volumen final de reacción de 40  $\mu$ L los cuales contienen 5 ng de ADN pET24b(+)-LnbB-FL-Cterm, 0,5

μM de cada uno de los cebadores y 20 μL de iProof High-Fidelity Master Mix 2x. Las condiciones de PCR usadas se detallan en la **Tabla 5. 2**.

**Tabla 5. 2.** Programa de PCR empleado para mutagénesis dirigida mediante PCR (QC-PCR) para la obtención de los mutantes de LnbB.

ETAPA	T (°C)	DURACIÓN	nº DE CICLOS
Desnaturalización inicial	98	3 min	
Desnaturalización	98	30 sec	
Hibridación	T <sub>m</sub> – 3	30 sec	30 x
Extensión	72	4 min	
Extensión final	72	3 min	
Conservación	4	∞	

Una vez finalizada la reacción se purifica el producto de PCR mediante el kit GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich), a continuación, se digieren las muestras con DpnI durante 3 horas a 37°C. Después de la inactivación de DpnI (20 min, 80 °C) se transforman las células de *E.coli* DH5α con el producto resultante. La presencia de la mutación deseada se comprueba mediante el método de secuenciación Sanger y se transforman células *E.coli* BL21 (DE3) star con los plásmidos obtenidos.

### 5.1.2 Segunda generación de mutantes de LnbB

Para la obtención de los mutantes de segunda generación se sigue el mismo protocolo descrito para los mutantes de primera generación. A diferencia de los mutantes de primera generación, en esta ocasión se emplean como ADN molde los plásmidos pET24b(+)-LnbB-FL-Cterm-Y419F y pET24b(+)-LnbB-FL-Cterm-W394F dependiendo de la mutación deseada. En la **Tabla 5. 3** se muestran los cebadores diseñados y el ADN molde usado.

**Tabla 5. 3.** Cebadores empleados para la obtención de la segunda generación de mutantes de LnbB. En ésta se indica la mutación, el ADN molde empleado y la secuencia correspondiente al cebador directo y reverso.

Mutación	ADN molde	Cebador	Secuencia
<b>Q190L_Y419F</b>	pET24b(+)-	Fw	GTGCGCCTGTCTGATTAATATCTCTACGGATTGG
	LnbB-FL-Cterm-Y419F	Rv	GAGATATTAATCAGACAGGCGCACAGGGTCCGAC
<b>H263A_Y419F</b>	pET24b(+)-	Fw	GTCCGGGTGCGATGAACGTTTGGCTGGAAAATTATCC
	LnbB-FL-Cterm-Y419F	Rv	CGTTCATCGCACCCGGACTFTTAATTTCCGGG



<b>H263R_Y419F</b>	pET24b(+)-	Fw	CGGGTCGCATGAACGTTTGGCTGGAAAATTATCC
	LnbB-FL-Cterm- Y419F	Rv	CGTTCATGCGACCCGGACTGTTAATTTCCGGG
<b>W394F_H263A</b>	pET24b(+)-	Fw	GTCCGGGTGCGATGAACGTTTGGCTGGAAAATTATCC
	LnbB-FL-Cterm- W394F	Rv	CGTTCATGCGACCCGGACTFTTAATTTCCGGG
<b>W394F_Y419F</b>	pET24b(+)-	Fw	GAATACTTCTACGGCGCCGGTCGTAAACCG
	LnbB-FL-Cterm- W394F	Rv	GCGCCGTAGAAGTATTCGATAACGATGTCTTTG
<b>W394F_N259A</b>	pET24b(+)-	Fw	CGGAAATTGCCAGTCCGGGTCACATGAACG
	LnbB-FL-Cterm- W394F	Rv	CCCGGACTGGCAATTTCCGGGATCACATC
<b>W394F_N259Q</b>	pET24b(+)-	Fw	CGGAAATTCAGAGTCCGGGTCACATGAACG
	LnbB-FL-Cterm- W394F	Rv	CCCGGACTCTGAATTTCCGGGATCACATC

### 5.1.3 Mutantes de los subsitios positivos

Para la obtención de los mutantes de los subsitios positivos se sigue el mismo protocolo descrito para los mutantes de primera generación, empleando como ADN molde el plásmido pET24b(+)-LnbB-FL-Cterm y pET24b(+)-LnbB-FL-Cterm-W394F dependiendo de la mutación deseada. En la **Tabla 5. 3** se muestran los cebadores diseñados.

**Tabla 5. 4.** Cebadores empleados para la obtención de los mutantes de los subsitios positivos de LnbB. En ésta se indica la secuencia correspondiente al cebador directo y reverso empleada para cada una de las mutaciones.

Mutación	Cebador	Secuencia
<b>I324W</b>	Fw	CGCGGATGAATACATGTGGGGTACCTCGTTG
	Rv	TAGTTGTCAAACGAGGTACCCACATGTATTCATCCG
<b>V426W</b>	Fw	TGGTCACGTTCCGGCACAATGGTACAAAGTTAACGC
	Rv	GCTGCGTAACTTTGTACCATTGTGCCGAACG

### 5.1.4 Creación de la glicosintasa de BgaC

Para la generación de la glicosintasa BgaC Glu233Gly, se ha diseñado una pareja de cebadores directo (Fw)/reverso (Rv), los cuales contienen una región no solapante en su extremo 3' y una región totalmente complementaria en su extremo 5'. En el centro de la región solapante se localizan los

nucleótidos responsables de generar la mutación para ello se usará el menor número de nucleótidos no complementarios a la cadena molde para generar la mutación, la secuencia del nuevo aminoácido se diseñará considerando el codón *usage* de *E. coli*. En la **Tabla 5. 5** se muestran los cebadores diseñados.

**Tabla 5. 5.** Cebadores empleados para la obtención de la glicosintasa BgaC Glu233Gly. En ésta se indica la mutación y la secuencia correspondiente al cebador directo y reverso.

Mutación	Cebador	Secuencia
E233G	Fw	GTGCATGGGCTTTTGGCATGGTTGG
	Rv	CCAAAAGCCCATGCACATTAGAGGAGC

La reacción de PCR se realiza con la polimerasa Phusion High-Fidelity Master Mix 2x, (ThermoFisher) mediante el termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Se realizó la reacción con volumen final de 20 µL los cuales contienen 5 ng de ADN molde pET29a-LnBb, 0,5 µM de cada uno de los cebadores y 10 µL de Phusion High-Fidelity Master Mix 2x. Las condiciones de PCR usadas se detallan en la **Tabla 5. 6**.

**Tabla 5. 6.** Programa de PCR empleado para mutagénesis dirigida mediante PCR (QC-PCR) para la obtención del mutante Glu233Gly de BgaC

ETAPA	T (°C)	DURACIÓN	nº DE CICLOS
Desnaturalización inicial	98	30 sec	
Desnaturalización	98	10 sec	
Hibridación	58	30 sec	35 x
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	10 min	
Conservación	4	∞	

Una vez finalizada la reacción se purifica el producto de PCR mediante el kit GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich), a continuación, se digieren las muestras con DpnI durante 3 horas a 37 °C. Después de la inactivación de DpnI (20 min, 80°C) se transforman las células de Stellar™ competent cells (ClonThec) con el producto resultante. La presencia de la mutación deseada se comprueba mediante el método de secuenciación Sanger y se transforman células *E. coli* BL21 (DE3) star los plásmidos finales.

### 5.1.5 Creación de la “glicosintasa” de LnbB

Para la generación de la “glicosintasa” de LnbB Asp320Glu\_Trp394Phe se ha empleado como ADN molde el vector pET22b-LnbB-W394F. Para la obtención del mutante se sigue el mismo protocolo descrito para la obtención de los mutantes de primera y segunda generación de LnbB. En la **Tabla 5. 7** se muestran los cebadores diseñados en esta ocasión.

**Tabla 5. 7.** Cebadores empleados para la obtención de la glicosintasa LnbB Asp320Glu\_Trp394Phe. En ésta se indica la mutación y la secuencia correspondiente al cebador directo y reverso.

Mutación	Cebador	Secuencia
D320E_W394F	Fw	CATGTATTCTCCGCGCCCATGTGCCAATATTTTCG
	Rv	TGGGCGCGGAAGAATACATGATTGGTACC

## 5.2 Expresión y purificación de proteínas

### 5.2.1 Expresión de los diferentes mutantes de LnbB mediante medio de autoinducción

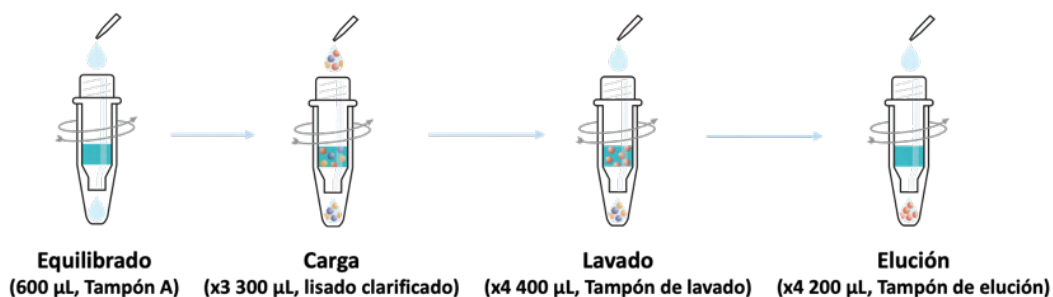
Todos los mutantes de LnbB citados en este trabajo han sido expresados mediante el método de autoinducción. Para ello se inoculan células de *E. coli* BL21 (DE3)star recién transformadas con el plásmido de interés en 3 mL de medio LB suplementado con kanamicina (30 µg/mL) y se dejan crecer a 37 °C y 250 rpm durante 16 horas. Se realiza una dilución 1:100 de estas células en 30 mL de medio de autoinducción (LB (10 g/L), 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5% (p/v) glicerol, 0.05 % (p/v) glucosa y 0.2 % (p/v) lactosa) suplementado con kanamicina (30 µg/mL) y se deja crecer el cultivo a 30 °C y 200 rpm durante 24 horas. A continuación, se centrifuga el cultivo (4 °C, 4000 rpm, 15 min) y se descarta el sobrenadante. Se realiza un lavado de las células con 5 mL de una solución de NaCl (0,9 % p/v) y se centrifuga la suspensión resultante (4 °C, 4000 rpm, 15 min); el *pellet* obtenido se almacena a -20°C hasta su utilización.

En esta sección se ha detallado el procedimiento de expresión de proteína partiendo de un cultivo de 30 mL ya que ha sido el volumen más empleado. Para aquellos experimentos que requieran un mayor volumen de proteína purificada se realizará la expresión de proteína partiendo de cultivos de 300 mL.

## 5.2.2 Purificación mediante cromatografía de afinidad His SpinTrap de LnbB y sus mutantes

Todas las proteínas expresadas en este trabajo presentan en su extremo C-terminal una cola de histidinas, permitiendo su purificación mediante cromatografía de afinidad.

Para la purificación se disuelven las células en 800  $\mu\text{L}$  de tampón A (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.5) suplementado con fluoruro de metilsulfonio (PMSF) 1 mM y se procede al lisado celular por sonicación. La sonicación se realiza a 4 $^\circ\text{C}$  durante 7 minutos (10 segundos ON/ 20 segundos OFF, 50% de amplitud) utilizando la sonda de 2 mm. Par obtener la fracción soluble se centrifuga el lisado a 14000 rpm durante 30 minutos a 4  $^\circ\text{C}$ . La purificación se realiza mediante las columnas comerciales de 100  $\mu\text{L}$  His SpinTrap<sup>TM</sup> (GE Helthcare). En primer lugar, se elimina por centrifugación (100 g, 1 min, 4  $^\circ\text{C}$ ) la solución de almacenaje y se procede a realizar el equilibrado de la columna. Para ello se introducen 600  $\mu\text{L}$  del tampón A en la columna y se elimina posteriormente por centrifugación (100 g, 1 min, 4 $^\circ\text{C}$ ). La carga proteica se realizará en tres etapas, en las cuales se cargarán 300  $\mu\text{L}$  de lisado clarificado, las proteínas no unidas serán eliminadas por centrifugación (100 g, 1 min, 4  $^\circ\text{C}$ ). Para eliminar las proteínas no deseadas que puedan presentar cierta afinidad con la resina de  $\text{Ni}^{2+}$  se realizaran 4 lavados de 600  $\mu\text{L}$  con el tampón de lavado (5 mM imidazol, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.5) el cual será eliminado por centrifugación (100 g, 1 min, 4  $^\circ\text{C}$ ). La proteína de estudio se obtendrá mediante 4 etapas de elución de 200  $\mu\text{L}$  cada una de ellas utilizando el tampón de elución (50 mM imidazol, 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7.5).



**Figura 5. 1.** Protocolo seguido en la purificación de proteínas empleando las columnas His SpinTrap<sup>TM</sup> (GE Helthcare).

Todas las fracciones resultantes de la etapa de purificación se analizan mediante un gel de acrilamida al 8% SDS-PAGE y se combinan las fracciones que contienen la proteína de interés. Finalmente, mediante el filtro Amicon<sup>®</sup> Ultra de 0,5 mL (cutoff 30 kDa), se realiza el intercambio del tampón de elución por el tampón A (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl at pH 7.5) a la vez que concentramos la

proteína hasta un volumen final de unos 300  $\mu\text{L}$  aproximadamente. La concentración de proteína se determina mediante el kit BCA Potein Assay Kit (ThermoFisher).

### 5.2.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad HisTrap Column de LnbB y sus mutantes

En aquellos experimentos donde se haya usado un volumen de cultivo de 300 mL el proceso de purificación se realizará mediante cromatografía de afinidad usando columnas HisTrap 1 mL (GE Helthcare).

Finalizada la etapa de expresión, se resuspende el *pellet* obtenido con 30 mL de tampón A (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl pH 7,5) suplementado con 1 mM d PMSF y se procede a realizar la disrupción celular mediante el método de sonicación. La sonicación se realiza a 4°C durante 7 minutos con la sonda de 6 mm (10 segundos ON/20 segundos OFF, amplitud 50%). El lisado se centrifuga a 12000 rpm durante 1 hora a 4°C, mientras, se acondiciona la columna HisTrap 1 mL GE Helthcare) usando una bomba peristáltica previamente calibrada a un flujo de 1 mL/min:

- Se pasan 10 volúmenes de columna de  $\text{H}_2\text{O}$ -MQ.
- Se pasan 10 volúmenes de columna del Tampón A, este ha sido filtrado previamente usando filtros de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Una vez finalizada la centrifugación se filtra el lisado clarificado empleando filtros con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . A continuación, se carga en la columna todo el lisado clarificado. A partir de este momento todo el proceso será monitorizado mediante Äkta (Äkta FPLC, Abersham Biosciences).

Simultáneamente se ha realizado el lavado y equilibrado del Äkta (todos los tampones empleados han sido filtrados previamente usando filtros de un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ); para ello:

- Se realiza el lavado de las bombas A y B con  $\text{H}_2\text{O}$ -MQ. Finalizada esta etapa se realiza el lavado de la bomba A con el tampón A (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl pH 7,5) y posteriormente lavado de la bomba B con el tampón B (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, 500 mM imidazol pH 7,5).
- Se realiza el lavado de las líneas del equipo, en primer lugar, se lavan las líneas A y B durante 10 minutos con  $\text{H}_2\text{O}$ . En primer lugar, se acondiciona la línea B con tampón B hasta que se observa que la absorbancia ha incrementado y mantiene un valor constante. Para el acondicionamiento de la línea A se hace circular tampón A hasta que se observa que los valores de absorbancia regresan a la línea base. Cuando no se tenga la columna conectada al equipo, se trabajará con un flujo de 3 mL/min.

Una vez se tiene el Äkta preparada y la proteína cargada en la columna HisTrap 1 mL, se procede a conectar la columna al Äkta donde se monitorizará todo el proceso mediante un detector en línea de absorbancia UV. A partir de este momento se trabajará en todo momento a un flujo de 1 mL/min.

Se realiza un lavado de la columna con PBS para eliminar aquellas proteínas que se encuentren en la columna pero que no presentan afinidad por la reina usada. Esta etapa se realizará hasta que los valores de absorbancia disminuyan y se mantengan constantes. La elución de la proteína se realiza mediante un gradiente lineal de imidazol (0-100% tampón B). La etapa de elución se recolectará en fracciones de 1 mL. Cuando las proteínas estén caracterizadas y se conozca a que porcentaje de imidazol son obtenidas, el método de elución empleado será mediante *steps* de imidazol. Para asegurar la eliminación total de proteínas en el interior de la columna se pasa durante unos minutos tampón B 100%.

Finalizado el proceso se realiza la limpieza del equipo y de la columna empleando en primer lugar H<sub>2</sub>O hasta que se recupera la línea base de absorbancia. Finalmente se pasa durante unos minutos la solución de almacenaje (EtOH 20%).

Las fracciones seleccionadas se analizan mediante un gel de acrilamida SDS-PAGE al 8%, aquellas fracciones donde se identifique la proteína de interés con la pureza deseada serán unificadas.

#### 5.2.4 Expresión de BgaC y su mutante Glu233Gly

La expresión de la proteína BgaC y su mutante glicosintasa, Glu233Gly, se ha realizado mediante el inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). Una vez transformadas las células *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido de interés, se toma una colonia aislada y se realiza un inóculo de 3 mL en medio LB suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/mL) y se incuba durante 16 horas a 37°C y 250 rpm. Se prepara un cultivo de 300 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50  $\mu$ g/mL) y se inocula con los 3 mL de inóculo, se deja crecer el cultivo a 160 rpm y 37°C hasta que este alcance una OD<sub>600</sub> de 0.8. A continuación se realiza la inducción proteica mediante la adición de IPTG a una concentración final de cultivo de 1 mM, a partir de este momento el cultivo se incuba a 25°C y 160 rpm durante 16 horas.

Con la finalidad de estudiar el proceso de expresión proteico se toman muestras de 1 mL tras 3:30 horas de cultivo (pre-inducción), 5:30 horas (2 horas después de inducir) y 8:30 horas (5 horas después de inducir). Éstas se centrifugan durante 10 minutos a 4000 rpm, se descarta la fracción soluble, y el *pellet* obtenido se resuspende con 300  $\mu$ L de PBS (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a pH 8, las muestras serán analizadas mediante el método SDS-PAGE empleando (12% acrylamide Stain-Free™ precast gel).

Finalizado el cultivo éste se centrifuga (4°C, 5000 rpm, 20 min) y se realiza un lavado de las células con 30 mL de una solución de NaCl (0,9% p/v) y se centrifuga la suspensión resultante (4°C, 4000 rpm, 15 min).

## 5.2.5 Purificación de BgaC y su mutante Glu233Gly

Finalizada la etapa de expresión, se resuspende el *pellet* con 20 mL de PBS (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8) suplementado con 1 mM de PMSF y se realiza la disrupción celular mediante el método de sonicación (Fisherbrand™ Model FB705 Dismembrator). Para la lisis celular se han realizado dos ciclos de sonicación manteniendo la suspensión a 4°C (1 min ON/30 s OFF, amplitud 25% y 30 s ON/30 s OFF, amplitud 25 %), el lisado resultante se centrifuga a 50000 g y 4°C durante 30 min.

La purificación de la proteína se realizará mediante una resina de cobalto (TALON® Metal Affinity Resin solution, Clontech), la cual se encuentra almacenada con una solución al 50% de EtOH. Se desea preparar una columna de 2 mL, por lo que será necesario tomar 4 mL de la suspensión y se introducen en una columna de plástico (Bio-Rad). Mediante presión se eluye el EtOH presente en la resina y se adicionan 5 Vcol (volumen de columna) de H<sub>2</sub>O y se equilibra la columna mediante el uso de 5 Vcol de PBS (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8). A continuación, se cargan los 20 mL de lisado clarificado, se cierra la columna, y se deja que la proteína y la resina interactúen durante 10 minutos, se abre de nuevo la columna y se eluye el FT. Seguidamente se realizan dos lavados de columna de 10 Vcol de PBS (300 mM NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8) cada uno de ellos, obteniendo así, las fracciones wash 1 y wash 2. Finalmente se procede a la elución manual de la proteína, empleando para ello soluciones con una concentración ascendente de imidazol:

- Se cargan 2 Vcol de una solución 5 mM imidazol, 300 mM NaCl y 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8; y se realiza su elución obteniendo la fracción E1/5.
- Se cargan 2 Vcol de una solución 20 mM imidazol, 300 mM NaCl y 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8; y se realiza su elución obteniendo la fracción E1/20.
- Se cargan 2 Vcol de una solución 100 mM imidazol, 300 mM NaCl y 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8; y se realiza su elución obteniendo la fracción E1/100.
- Se cargan 2 Vcol de una solución 250 mM imidazol, 300 mM NaCl y 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8; y se realiza su elución obteniendo la fracción E1/250. Se repite este paso obteniendo ahora la fracción E2/250.
- Se cargan 2 Vcol de una solución 500 mM imidazol, 300 mM NaCl y 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 8; y se realiza su elución obteniendo la fracción E1/500.

Finalizada la elución, se extrae la resina y se reserva para su futura regeneración.

A continuación, se toman 12  $\mu\text{L}$  de las muestras obtenidas durante los procesos de expresión y purificación de la proteína y se mezclan con 3  $\mu\text{L}$  de charge buffer 4x. Una vez hervidas las muestras durante 10 minutos éstas se analizan mediante un SDS-PAGE (12% acrylamide Stain-Free Precast Protein Gels (Bio-Rad)). El gel se corre a 200 V durante 30 minutos, realizando su revelado mediante el equipo Bio-Rad stain-free imaging systems (Bio-Rad).

## 5.2.6 Eliminación de imidazol mediante diálisis

Una vez unidas todas las fracciones que contienen la proteína de interés se procede a la eliminación de imidazol de la muestra. Para ello se introduce la solución proteica en la membrana de diálisis, previamente hidratada, (Cellu Sep 6000 -8000) la cual presenta un tamaño de poro de entre 6 y 8 kDa. Se dializa la muestra frente al tampón A (150 mM NaCl, 20 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5) en el caso de la proteína LnbB y sus mutantes, empleando PBS a pH 8 (300 mM NaCl, 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) para la proteína BgaC y su mutante.

Para eliminar la totalidad de imidazol se realizarán 3 cambios de tampón, uno de 30 minutos, uno overnight y otro de 3 horas empleando en cada uno de ellos un volumen de 2 L. Finalizada esta etapa se cuantificará la proteína total obtenida mediante el método de BCA. En el caso de la proteína BgaC su cuantificación se realizó empleando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

## 5.3 Caracterización enzimática de LnbB y sus mutantes

### 5.3.1 Actividad hidrolítica de los diferentes constructos de LnbB

#### 5.3.1.1 Determinación de la actividad específica

La actividad hidrolítica de las diferentes proteínas estudiadas en este proyecto se determina mediante un ensayo colorimétrico en el cual se usa como sustrato LNB-pNP (Carbosynth). Para la determinación de la actividad específica de los mutantes, se ha explorado un rango de concentraciones diferentes en cada una de las proteínas ensayadas.

Para poder realizar las reacciones de hidrólisis, previamente se preparan las siguientes soluciones:

- Se prepara, en caso necesario, una dilución de la solución *stock* de enzima para así poder obtener la concentración de proteína en reacción deseada. Se prepara una solución *stock* de



sustrato LNB-pNP a una concentración de 10 mM en H<sub>2</sub>O MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a -20°C.

- Se prepara un tampón 2x (100 mM citrato-fosfato pH 4,5).
- Se prepara una solución STOP (500 mM glicina pH 11).

Este ensayo se realiza mediante la plataforma robótica Bravo (Agilent), realizando las reacciones en microplacas de 96 pocillos. Concretamente para cada proteína se realizarán 6 reacciones testando 3 concentraciones de enzima diferentes. Para cada ensayo se realizará un blanco de reacción para así descartar la hidrólisis espontánea del sustrato. En el blanco se incorporarán todos los elementos de reacción a excepción de la proteína, la cual será sustituida por H<sub>2</sub>O MilliQ. Las reacciones se preparan a una concentración final de sustrato de 250 μM, 50 mM citrato-fosfato pH 4,5 y una concentración de enzima variable en un volumen final de 250 μL. A continuación, se detalla procedimiento seguido para la preparación y la realización de la reacción.

Se preparan dos **placas de parada**, para ello se introducen 150 μL de la solución STOP de cada uno de los pocillos.

En la **placa de reacción** se añaden 125 μL de tampón 2x, el volumen de enzima necesario para cada una de las concentraciones testadas y el volumen de H<sub>2</sub>O MilliQ necesario en la fila A. En el pocillo A1 el volumen de enzima será reemplazado por H<sub>2</sub>O MilliQ, ya que en este se realiza el blanco de reacción. En la fila H de la placa de reacción se añaden 10 μL de sustrato a excepción del pocillo H1 correspondiente al blanco de reacción, donde se incorporarán 10 μL.

Cuando se tiene la placa de reacción preparada esta se incuba a 30°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se inicia la reacción con la adición del volumen correspondiente de sustrato (fila H) a la reacción (Fila A), y se mezcla el contenido de la reacción por pipeteo.

Se toman 11 muestras a diferentes tiempos de reacción. Para ello se toman 20 μL de cada una de las reacciones y se introducen en los pocillos correspondientes de la placa de parada.

Para cuantificar la concentración de pNP liberado en las reacciones se prepara una recta patrón de pNP (1,3-300 μM) en tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5. Se incorporan 20 μL de cada patrón a los pocillos sobrantes de una de las placas de parada y se mide la absorbancia a 405 nm.

La determinación de la actividad específica ( $V_0/[E]$ ) se calcula mediante la pendiente de la velocidad inicial de cada una de las reacciones (μM pNP liberado/min) vs la concentración de enzima utilizada.

## 5.3.2 Estudio de la actividad de transglucosidación de los diferentes constructos de LnbB

Para el estudio de la actividad sintética de las enzimas expresadas en este proyecto se ha diseñado un método cromatográfico. Concretamente las muestras serán analizadas mediante un HPLC-MS.

### 5.3.2.1 Preparación de los patrones analíticos para HPLC-MS

La cuantificación de los productos de reacción se realizará mediante el uso de una recta patrón. Concretamente se preparan 7 patrones de distintas concentraciones los cuales están formados por la misma concentración de LNT, LNB y LNB-pNP. La concentración de lactosa en reacción no se monitorizará ya que esta se encuentra en gran exceso.

La preparación de patrones se realiza a partir de las soluciones stocks de los productos LNB-pNP, LNT y LNB en H<sub>2</sub>O-MQ.

- Se prepara una solución stock 30 mM de LNT de la cual se realiza una dilución 1:10 para obtener la solución stock 3 mM.
- Se prepara una solución stock 10 mM de LNB de la cual se realiza una dilución 1:10 para obtener la solución stock 1 mM.
- Se prepara una solución stock 10 mM de LNB-pNP de la cual se realiza una dilución 1:10 para obtener la solución stock 1 mM.

A partir de las soluciones stocks citadas anteriormente se preparan las siguientes soluciones patrón. Concretamente se preparan 7 patrones de 200 µL a distintas concentraciones los cuales están formados por la misma concentración de LNT, LNB y LNB-pNP (**Tabla 5. 8**) las cuales se conservarán a -20°C hasta su uso. La concentración de lactosa en reacción no se monitorizará ya que esta se encuentra en gran exceso.

**Tabla 5. 8.** Concentraciones de LNT, LNB-pNP y LNB de los distintos patrones analizados por HPLC-MS.

Patrón	LNT (µM)	LNB-pNP (µM)	LNB (µM)
1	1500	1500	1500
2	1000	1000	1000
3	750	750	750
4	500	500	500
5	300	300	300
6	250	250	250

7	125	125	125
8	50	50	50
9	25	25	25

Para poder usar las soluciones patrón como patrones analíticos es necesario procesarlas de igual manera que las muestras a analizar. Para ello se mezclarán 20  $\mu\text{L}$  de cada patrón con 60  $\mu\text{L}$  de la solución de parada (1:1 1-propanol/ $\text{H}_2\text{O}$ , conservada a  $4^\circ\text{C}$ ), este proceso se realiza en el interior de un inserto. Finalizado el análisis de los patrones, estos se conservarán a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 5.3.2.2 Protocolo para la reacción de transglicosidación

Para el estudio de la actividad TG de las enzimas de este proyecto se requiere en primer lugar la preparación de las siguientes soluciones *stock*:

- Se prepara, en caso necesario, una dilución de la solución *stock* de enzima para así poder obtener la concentración de proteína en reacción deseada.
- Se prepara una solución *stock* de sustrato LNB-pNP a una concentración 10 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a  $-20^\circ\text{C}$ .
- Se prepara una solución *stock* de lactosa a una concentración 1M en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.
- Se prepara un tampón 2x (100 mM citrato-fosfato pH 4,5).
- Se prepara una solución de parada (1:1; 1-propanol/ $\text{H}_2\text{O}$ ), la solución se conserva a  $4^\circ\text{C}$ .

Para el ensayo de la actividad de transglicosidación se realizan reacciones de 250  $\mu\text{L}$  a una concentración de 2,5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa y 1  $\mu\text{M}$  de enzima en tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5. Se introducen en un tubo eppendorf los volúmenes necesarios de LNB-pNP, lactosa, tampón,  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ y se incuba la reacción durante 5 minutos a  $30^\circ\text{C}$  en un baño termostático. Transcurrido este tiempo, y para iniciar la reacción se adiciona el volumen de enzima calculado. La reacción se analizará a diferentes tiempos, para ello se toman 20  $\mu\text{L}$  de la reacción y se mezcla dentro de un inserto con 30  $\mu\text{L}$  de la solución de parada (1:1; 1-propanol/ $\text{H}_2\text{O}$ , conservada a  $4^\circ\text{C}$ ).

### 5.3.2.3 Metodología HPLC-MS

A continuación, se detallan todos los parámetros empleados para la monitorización de los productos de la reacción de transglicosidación.

## Instrumentación

Para este ensayo se han usado los siguientes materiales/equipos:

- HPLC-MS (Agilent 1200, Agilent Technologies).
- Detector MS de cuadrupolo simple, equipado con ESI (electrospray) para la ionización (ESI-MS series SQ, Agilent Technologies).
- VWD detector de absorbancia (Agilent, 1260), las muestras se siguen a una longitud de onda de 214 nm.
- Columna: ACQUITY UPLC® BEH column, 130 Å, 1.7µm 2.1x100 mm (waters).
- Precolumna: ACQUITY UPLC® BEH Amide VanGuard Pre-column 130 Å, 1.7 µm 2.1x5mm (Waters).

## Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas empleadas para la separación de los productos de reacción son las siguientes:

- Fase móvil: Acetonitrilo + 1% ácido fórmico: H<sub>2</sub>O + 1% ácido fórmico 65:35.
- Flujo: 0,2 mL/min.
- Volumen de inyección: 3 µL.
- Temperatura de la columna: 40°C.
- Duración del cromatograma: 8 minutos.

## Condiciones del detector MS

- Fuente de ionización: electrospray (ESI).
- Modo: positivo
- Gas de desolvatación: nitrógeno.
- *Capillary voltage*: 4000 V.
- *Drying gas flow*: 11 L/min.
- *Drying gas temperature*: 325 °C.
- *Nebulizer pressure*: 30 psi.
- Metodo de detección: SIM
- Adduct: M+H<sup>+</sup>, M+Na<sup>+</sup> y M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dependiendo del compuesto analizado (Tabla 5. 9).
- 

Tabla 5. 9 Masas seguidas en cada uno de los canales empleados del HPLC-MS

Canal	Compuesto	SIM ion
1	LNB-pNP	522 m/z [M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]; 527 m/z [M+Na <sup>+</sup> ]
2	LNB	384 m/z [M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]; 406 m/z [M+Na <sup>+</sup> ]
4	LNT	708 m/z [M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]; 730 m/z [M+Na <sup>+</sup> ]

Para cada canal se siguen las masas de los dos aductos mostrados en la **Tabla 5. 9**, las cuales serán empleadas para la determinación del área del producto.

### 5.3.3 Determinación de la ratio $SA_T/SA_H$

Con la finalidad de determinar la ratio entre la actividad TG y la actividad hidrolítica, se determinan las actividades específicas de ambas reacciones. Para determinar la actividad específica de hidrólisis se realizará la reacción únicamente en presencia de dador, mientras que para determinar la actividad específica de TG se utilizarán 4 concentraciones de lactosa distintas, para así poder encontrar la actividad óptima.

Para la realización de este experimento se requieren las siguientes soluciones *stock*:

- Se prepara, en caso necesario, una dilución de la solución *stock* de enzima para así poder obtener la concentración de proteína en reacción deseada.
- Se prepara una solución *stock* de sustrato LNB-pNP a una concentración 10 mM en H<sub>2</sub>O MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a -20°C.
- Se prepara una solución *stock* de lactosa a una concentración 1M en tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.
- Se prepara un tampón 2x (100 mM citrato-fosfato pH 4,5).
- Se prepara una solución STOP (500 mM glicina a pH 11).

Este ensayo se realiza mediante el uso de la plataforma robótica Bravo (Agilent) siguiendo el procedimiento general descrito en la sección (5.3.1.1 Determinación de la actividad específica). Pero en esta ocasión se trabajará con una concentración de enzima fija, la cual será seleccionada en función de los resultados obtenidos en la determinación de su actividad específica. A continuación, se describe la metodología seguida para la preparación de la placa de reacción, ya que es el único proceso modificado de la sección (5.3.1.1 Determinación de la actividad específica).

En la fila A de la placa de reacción se adicionan los volúmenes necesarios par obtener las siguientes concentraciones en 250  $\mu$ L de reacción: 250  $\mu$ M LNB-pNP, lactosa (0, 100, 200, 400 y 600 mM), tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 4,5 y H<sub>2</sub>O MilliQ. Cada una de las reacciones se realizará por duplicado.

En la fila H de la placa de reacción se adicionará la enzima, concretamente se incorporará un volumen superior al requerido para la reacción para así asegurar que el robot aspira la cantidad deseada. En el pocillo H1 se incorporará H<sub>2</sub>O MilliQ ya que en el pocillo de reacción A1 se realizará el blanco de reacción.

### 5.3.4 Determinación de los parámetros de Michaelis-Menten para la reacción de hidrólisis

Con la finalidad de caracterizar más acuradamente los mutantes más interesantes y la enzima wt, se procede a la determinación de sus parámetros cinéticos  $k_{cat}$  y  $K_M$ . Para ello se realizarán 8 reacciones en las cuales se testará una concentración de dador (LNB-pNP) distinta en cada una de ellas (15-1000 $\mu$ M).

Para la realización de este experimento:

- Se prepara, en caso necesario, una dilución de la solución *stock* de enzima para así poder obtener la concentración de proteína en reacción deseada.
- Se prepara una solución *stock* de sustrato LNB-pNP a una concentración 10 mM. A partir de esta se va a realizar una dilución 1/10 para así obtener una solución *stock* de LNB-pNP 1mM. A partir de la nueva solución *stock* se vuelve a prepara una dilución 1/10 para obtener una solución *stock* de LNB-pNP a 100  $\mu$ M. Todas las diluciones se realizan en H<sub>2</sub>O MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a -20°C. A
- Se prepara un tampón 2x (100 mM citrato-fosfato pH 4.5).
- Se prepara una solución STOP (500 mM glicina a pH 11).

Este experimento se realiza con la plataforma robótica Bravo (Agilent) siguiendo el protocolo general descrito en la sección (5.3.1.1Determinación de la actividad específica). Para la realización de esta cinética se trabajará con una única concentración de enzima, determinada a partir de su actividad específica. En esta sección únicamente se va a detallar la preparación de la placa de reacción ya que la única etapa modificada de la sección 5.3.1.1.

Las distintas reacciones se preparan en la fila A de la placa de reacción, ocupando desde el pocillo A1 - A9. Se realizan reacciones de 250  $\mu$ L, en las cuales se incorpora el volumen necesario de tampón 2x para obtener una concentración final de 50 mM citrato-fosfato pH 4.5 y H<sub>2</sub>O MilliQ. Al realizar reacciones comprendidas entre 15 -1000 mM de dador, se han requerido soluciones *stock* distintas:

**Reacción 15  $\mu$ M LNB-pNP:** Para obtener la concentración deseada, en el pocillo A2 se incorpora el volumen necesario de la solución *stock* 100  $\mu$ M LNB-pNP.

**Reacciones 25, 50, 100  $\mu$ M LNB-pNP:** Para obtener las concentraciones deseadas, en los pocillos A3, A4 y A5 se adicionan los volúmenes necesarios de la solución *stock* 1 mM LNB-pNP.

**Reacciones 250, 500,750 1000  $\mu$ M LNB-pNP:** Para obtener las concentraciones deseadas en los pocillos A6, A7, A8 y A9 se adicionan los volúmenes necesarios de la solución *stock* 10 mM LNB-pNP.

En la fila H se incorpora un volumen de enzima superior al requerido en reacción; d nuevo en la fila H1 la enzima será substituida por H<sub>2</sub>O MilliQ ya que en el pocillo de reacción A1 se realizará el blanco de reacción. Este se realiza a una concentración de LNB-pNP de 250  $\mu$ M.

Una vez medida la absorbancia de las placas a 405 nm, se calculan las velocidades iniciales mediante regresión lineal empleando una recta patrón de pNP de concentraciones 0-1200  $\mu$ M. Los parámetros  $K_{cat}$  y  $K_M$  se determinan por regresión no lineal [ $v_o/[E]$  vs [LNB-pNP] empleando la ecuación de Michaelis-Menten del *software* Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA).

### 5.3.5 Determinación de los parámetros de Michaelis-Menten para la reacción TG

Para la determinación de los parámetros cinéticos  $K_{cat}$  y  $K_M$  de la reacción de transglicosidación se ha seguido el mismo protocolo que el detallado en la sección 3.2 pero incorporando en las reacciones una concentración de lactosa fijada. La concentración de enzima para este experimento será la misma que la utilizada para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la reacción de hidrólisis.

Se ha preparado una solución stock de lactosa 1 M en tampón 50 mM citrato-fosfato y se ha calculado el volumen necesario para obtener en 250  $\mu$ L de reacción una concentración de lactosa de 200 mM. El volumen introducido de la solución *stock* de lactosa ha sido restado al volumen de tampón 2x, ya que al incorporar dicha solución ya se está incorporando tampón en la reacción. En resumen, las condiciones para las reacciones realizadas en este experimento son las siguientes:

Blanco de reacción (A1): 250  $\mu$ M de LNB-pNP y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 1 (A2): 15  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 2 (A3): 25  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 3 (A4): 50  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 4 (A5): 100  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 5 (A6): 250  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 6 (A7): 500  $\mu$ M LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 7 (A8): 750  $\mu\text{M}$  LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Reacción 8 (A9): 1000  $\mu\text{M}$  LNB-pNP, 200 mM lactosa, el volumen fijado de enzima y tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

### 5.3.6 Determinación de la regioselectividad del tetrasacárido sintetizado por el mutante LnbB W394F mediante la enzima WT

Para determinar la regioselectividad del producto sintetizado por el mutante W394F se ha planteado el siguiente experimento. Se realiza una reacción de transglicosidación de 150  $\mu\text{L}$  a 2,5 mM LNB-pNP, 200 mM lactosa y 1  $\mu\text{M}$  de enzima en tampón 50 mM citrato-fosfato a pH 4,5.

Para seguir la evolución de la reacción se toman muestras a diferentes tiempos (1, 30, 60 y 90 minutos). Para ello se toman 10  $\mu\text{L}$  de reacción y se mezclan con 30  $\mu\text{L}$  de solución de parada (1:1; 1-propanol/ $\text{H}_2\text{O}$ , 4°C) en el interior de un inserto y se analizan las muestras mediante HPLC-MS (ver sección 3.2.3). Transcurridos 90 minutos de reacción se procede a inactivar la enzima, para ello la totalidad de la reacción se introduce en un baño termostático a 100°C durante 10 minutos.

Una vez se ha inactivado la reacción se realizan las siguientes pruebas:

Se toman 10  $\mu\text{L}$  de la reacción inactivada, se mezclan con 30  $\mu\text{L}$  de solución de parada y se analizan mediante HPLC-MS.

Se toman 10  $\mu\text{L}$  de la reacción inactivada y se mezclan con 10  $\mu\text{L}$  de una solución *stock* 500  $\mu\text{M}$  de LNT. Se toman 10  $\mu\text{L}$  de la solución resultante, se mezclan con 30  $\mu\text{L}$  de solución de parada y se analiza la muestra mediante HPLC-MS.

Se toman 30  $\mu\text{L}$  de la reacción inactivada y se incuban 5 minutos a 30°C. A continuación, se introducen 2  $\mu\text{L}$  de una solución 71,8  $\mu\text{M}$  de la enzima LnbB WT. Transcurridos 5 y 15 minutos de reacción, se toman 10  $\mu\text{L}$  de reacción, se mezclan con 30  $\mu\text{L}$  de solución de parada y se analizan las muestras mediante HPLC-MS.

## 5.4 Caracterización enzimática de BgaC y su mutante glicosintasa E233G

### 5.4.1 Síntesis de los sustratos $\alpha$ -GalF y 5 mM GlcN-oxazolina



### 5.4.1.1 Síntesis del dador $\alpha$ -GalF

#### Síntesis del compuesto fluoruro de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosil

Se mezclan las soluciones 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-galactopiranososa (5,004g, 12.8 mmol) y HF/piridina (7:3 v/v, 20 mL) a 0°C durante 2 horas en un matraz de plástico. A continuación, se transfiere cuidadosamente el contenido de la reacción a un embudo de separación en el cual se han introducido previamente 100 mL de una solución de NH<sub>3</sub> 3M en H<sub>2</sub>O para naturalizar el exceso de HF. La solución se diluye en diclorometano y se trasvasa el contenido a una solución 3M de NH<sub>3</sub> enfriada en un baño de hielo. Se lava la fase orgánica con una solución de hidrogeno carbonato de sodio saturado enfriada en hielo (se repite 3 veces), se elimina la presencia de fase acuosa con MgSO<sub>4</sub> y se concentra la solución a presión reducida. Se purifica la reacción por cromatografía flash realizando un gradiente de acetato de etilo en éter de petróleo comprendido entre el 10 y el 40%, obteniendo así el fluoruro deseado (3,625 g, 10 mmol) con un rendimiento del 81%. La caracterización del producto se realiza mediante RMN.

<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, CD<sub>3</sub>Cl):  $\delta$  5.79 ppm (1H, dd,  $J_{1,2} = 2.8$  Hz,  $J_{1,F} = 53.5$  Hz, H-1), 5.51 ppm (1H, dd,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz,  $J_{4,5} = 1.3$  Hz, H-4), 5.35 ppm (1H, dd,  $J_{2,3} = 10.9$  Hz,  $J_{3,4} = 3.3$  Hz, H-3), 5.17 ppm (1H, ddd,  $J_{1,2} = 2.8$  Hz,  $J_{2,3} = 10.9$  Hz,  $J_{2,F} = 23.8$  Hz, H-2), 4.39 ppm (1H, br t, H-5), 4.14 ppm (1H, dd,  $J_{5,6a} = 6.3$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.3$  Hz, H-6a), 4.10 ppm (1H, dd,  $J_{5,6b} = 6.9$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11.3$  Hz, H-6b) 2.14-1.99 ppm (12H, m, CH<sub>3</sub> of acetyl); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>Cl):  $\delta$  170.1 ppm, 170.2 ppm, 169.9 ppm i169.8 ppm (C=O of acetyl), 104.3 ppm(d,  $J_{1,F} = 228.5$  Hz, C-1), 68.8 ppm (d,  $J_{5,F} = 3.5$  Hz, C-5), 67.4 ppm (d,  $J_{2,F} = 23.9$  Hz, C-2), 67.3 ppm (s, C-4), 66.9 ppm (s, C-3), 61.2 ppm (s, C-6), 20.6 ppm, 20.6 ppm, 20.5 ppm and 20.5 ppm (CH<sub>3</sub> del acetilo).

#### Síntesis del fluoruro de $\alpha$ -D-galactopiranosilo

Se trata la solución de 2,3,4,6-penta-O-acetil-D-galactopiranosil (2,368 g, 6,8 mmol, 1 equiv.) con una solución de amoniaco 7 N en metanol (19 mL, 132,6mmol (20 equiv.)) durante 2 horas. Tras realizar la evaporación del disolvente a presión reducida, se obtiene el fluoruro desacetilado sin necesidad de realizar purificaciones adicionales. Se obtiene el producto en forma de sólido incoloro con un rendimiento cuantitativo (1,231 g, 6,8 mmol). La caracterización del producto se realiza mediante RMN: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  5.56 ppm (1H, dd,  $J_{1,2} = 2.5$  Hz,  $J_{1,F} = 54.6$  Hz, H-1), 3.95-3.93 ppm (2H, m), 3.83-3.68 ppm (4H, m).

### 5.4.1.2 Síntesis del aceptor GlcN-oxazolina

Para realizar la reacción deseada se mezclan los productos N-acetil-D-glucosamina (0,021 g, 94,6  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.), trietilamina (100  $\mu\text{L}$ , 709,5  $\mu\text{mol}$ , 7,5 equiv.) en agua a 0°C (630  $\mu\text{L}$ ), a continuación, se adiciona el compuesto CDMBI (0,063 g, 284  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv.) y se deja la reacción en agitación durante 1 hora. Se observa la aparición de un producto blanco en cual será eliminado por filtración, la solución resultante se liofiliza durante una noche. El residuo liofilizado se resuspende en agua deuterada y se analiza mediante  $^1\text{H}$ -RMN, observando las señales características del producto GlcN-oxazolina. De nuevo la solución se liofiliza y se analiza de nuevo por  $^1\text{H}$ -RMN, obteniendo un total de 0.051 g de sólido blanco.

Se realiza un desalado del sólido obtenido con 5 mL de acetonitrilo, agitando la suspensión durante 1 hora a temperatura ambiente, se concentra la solución obtenida a presión reducida y se analiza de nuevo el producto por  $^1\text{H}$ -RMN apreciando aún la señal del reactivo trietilamina.

Por este motivo se realizó la reacción de nuevo empleando en este caso  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  como base. Finalizada la reacción se filtra su contenido para eliminar el precipitado blanco obtenido, y se analiza la disolución resultante mediante  $^1\text{H}$ -RMN observando las señales características del producto deseado. El filtrado se liofiliza durante la noche y se analiza nuevamente por  $^1\text{H}$ -RMN para monitorizar su estabilidad. La desalación del producto se realizó con 5 mL de acetonitrilo agitando 1 hora a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida y se liofilizó, obteniendo GlcN-oxazolina puro (0.003 g, 14.8  $\mu\text{mol}$ ) con un rendimiento del 17%.

Se realizó el escalado de la reacción empleando GlcNAc (0,056 g, 0,25  $\mu\text{mol}$ , 1 equiv.),  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (0.32 g, 1.88  $\mu\text{mol}$ , 7.5 equiv.) en 3 mL de agua a 0°C, y se adiciona el CDMBI (0,163 g, 758  $\mu\text{mol}$ , 3 equiv.). Se realiza el mismo procedimiento descrito anteriormente obteniendo 0.091 g de GlcN-oxazolina. Se confirma la obtención del producto deseado por  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  6.08 ppm (1H, d,  $J$  = 7.3 Hz, H-1), 4.13-4.11 ppm (1H, m, H-2), 3.97 ppm (1H, t,  $J$  = 3.5 Hz, H-3), 3.80 ppm (1H, dd,  $J$  = 2.6 Hz y 12.4 Hz, H-6a), 3.66 ppm (1H, dd,  $J$  = 6.6 Hz y 12.4 Hz, H-6b), 3.59 ppm (1H, ddd,  $J$  = 0.9 Hz, 3.2 Hz y 9.0 Hz, H-4), 3.40-3.35 ppm (1H, m, H-4), 2.04 ppm (1H, d,  $J$  = 1.8 Hz,  $\text{CH}_3$  de NAc).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  170.8 ppm (C of oxazoline), 103.1 ppm (C-1), 75.6 ppm (C-5), 74.4 ppm (C-3), 71.4 ppm (C-4), 68.5 ppm (C-2), 64.4 ppm (C-6), 15.7 ppm ( $\text{CH}_3$  de la oxazolina).

## 5.4.2 Actividad hidrolítica de BgaC wt y su mutante E233G

### 5.4.2.1 Determinación de la actividad específica

La actividad hidrolítica de BgaC WT y su mutante glicosintasa ha sido evaluada frente al sustrato Gal $\beta$ -pNP. Para la determinación de la actividad específica de las proteínas se ha explorado un rango de concentraciones diferentes en cada una de las proteínas ensayadas.

Para poder realizar las reacciones de hidrólisis, previamente se preparan las siguientes soluciones:

- Se prepara, en caso necesario, una dilución de la solución *stock* de enzima para así poder obtener la concentración de proteína en reacción deseada.
- Se prepara una solución *stock* de sustrato Gal $\beta$ -pNP a una concentración de 50 mM en H<sub>2</sub>O MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a -20°C.
- Se prepara un tampón 2x (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7).
- Se prepara una solución STOP (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 12).

Este ensayo se realiza manualmente, concretamente para cada proteína se realizarán 3 reacciones empleando en cada una de ellas una concentración de proteína distinta. Para cada ensayo se realizará un blanco de reacción para así descartar la hidrólisis espontánea del sustrato. En el blanco se incorporarán todos los elementos de reacción a excepción de la proteína, la cual será sustituida por H<sub>2</sub>O MilliQ. Las reacciones se preparan a una concentración final de sustrato de 5 mM, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 7 y una concentración de enzima variable en un volumen final de 250  $\mu$ L.

Se realiza el seguimiento de la reacción durante 90 minutos (1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 y 90 min), a cada tiempo estudiado se toman 20  $\mu$ L de reacción y se adicionan 200  $\mu$ L de la solución STOP. Ya que las cinéticas se realizan manualmente, se inicia cada una de las reacciones con un margen de tiempo prudencial entre ellas.

Para cuantificar la concentración de pNP liberado en las reacciones se prepara una recta patrón de pNP (1,2-1000  $\mu$ M) en tampón 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 7. Se toman 20  $\mu$ L de cada uno de los patrones y se mezclan con 200  $\mu$ L de solución STOP. Finalmente se introducen 100  $\mu$ L de cada una de las muestras tomadas y de los patrones en una placa de 96 pocillos y se lee su absorbancia a 405 nm.

La determinación de la actividad específica ( $V_0/[E]$ ) se calcula mediante la pendiente de la velocidad inicial de cada una de las reacciones ( $\mu$ M pNP liberado/min) vs la concentración de enzima utilizada.

### 5.4.3 Actividad glicosintasa del mutante E233G de BgaC

Para el estudio de la actividad glicosintasa de la enzima se han empleado dos métodos analíticos distintos, TLC y H-RMN, el protocolo de los cuales se detallará más adelante.

La actividad glicosintasa de la variante de BgaC E233G ha sido analizada frente a distintos sustratos, fijando la concentración de proteína en reacción 15  $\mu$ M. Para poder realizar la reacción sintética, previamente se han preparado las siguientes soluciones:

- Se prepara, en caso necesario, una dilución de la solución *stock* de enzima para así poder obtener la concentración de proteína en reacción deseada.
- Se prepara una solución *stock* de sustrato Gal $\beta$ -pNP a una concentración de 50 mM en H<sub>2</sub>O MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a -20°C.
- Se preparan soluciones *stock* de los sustratos GlcNAc $\beta$ -pNP y GlcNAc $\alpha$ -pNP a una concentración de 10 mM en H<sub>2</sub>O MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a -20°C.
- Se preparan soluciones *stock* de GlcN-oxazolina a una concentración de 16 mM en H<sub>2</sub>O MilliQ. Las alícuotas realizadas se conservan a -20°C.
- Se prepara un tampón 2x (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7).

Para el estudio de actividad glicosintasa se han realizado reacciones de volumen final 500  $\mu$ L, empleando las siguientes condiciones de reacción: 1 mM Gal $\alpha$ -F, 2 mM GlcNAc $\beta$ -pNP/ GlcNAc $\alpha$ -pNP/ GlcN-oxazolina, 15  $\mu$ M BgaC E233G, y 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7. Se introduce en un tubo eppendorf los volúmenes necesarios de aceptor (GlcNAc $\beta$ -pNP, GlcNAc $\alpha$ -pNP o GlcN-oxazolina), dador, tampón y H<sub>2</sub>O MilliQ y se incuba la reacción durante 5 minutos a 30°C en un baño termostático. Transcurrido este tiempo, se adiciona el volumen de enzima necesario y se inicia la reacción. La reacción será analizada a distintos tiempos, a continuación, se presentan los protocolos empleados para el análisis de la reacción por TLC y H-RMN. Para cada aceptor empleado se realizarán blancos de reacción a los cuales se adicionarán todos los elementos de la reacción a excepción de la enzima.

#### 5.4.3.1 Análisis de la reacción glicosintasa mediante TLC

A cada tiempo definido, se toman 3  $\mu$ L de muestra y/ o blanco de reacción y se analizan mediante TLC. En ésta también se analizarán patrones de todos los sustratos empleados en las reacciones: GlcN-oxazolina GlcNAc $\beta$ -pNP o GlcNAc $\alpha$ -pNP y Gal $\alpha$ -F. Para el análisis de la reacción mediante TLC, se ha empleado como fase estacionaria placas de TLC de gel de sílice 60 no modificado (Macherey-Nagel™) y como fase móvil AcN/H<sub>2</sub>O (8:2). El revelado se ha realizado mediante una solución de orcinol.

### 5.4.3.2 Análisis de la reacción glicosintasa mediante 1H-RMN

Para el análisis de la reacción glicosintasa mediante H-RMN, se toma un volumen determinado de muestra y se liofiliza. El sólido obtenido se disuelve con D<sub>2</sub>O, y se analiza mediante H-RMN (298K).

En el caso de desear monitorizar la reacción a lo largo de un tiempo determinado mediante <sup>1</sup>H-RMN se necesitará emplear tampones deuterados en los experimentos.

Se preparan tampones 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 7 y 8 en H<sub>2</sub>O, se liofilizan y se resuspende el sólido obtenido con D<sub>2</sub>O, empleando el mismo volumen de H<sub>2</sub>O usado para la preparación del tampón. Los valores de pD se midieron determinando el pH usando un electrodo de pH de vidrio y luego aplicando la ecuación:

$$pH = 0.292 \cdot pD + 0.41 \quad (Ec. 2)$$

Con la finalidad de cambiar el tampón de almacenamiento de la enzima por su análogo deuterado, se diluye la solución stock de enzima 10 veces con el tampón deuterado y se concentra mediante el uso de un centrífugo 10000 MWCO. Se repite este paso dos veces. Para la preparación de los sustratos, en esta ocasión se disolverán los sólidos con tampón 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pD 7 deuterado.

### 5.4.4 Controles de la reacción glicosintasa

Con la finalidad de estudiar si GlcNAc puede actuar como aceptor de la reacción, y que la enzima no puede catalizar la autocondensación de Gal $\alpha$ -F se realizaron dos experimentos adicionales:

- Reacción a 5 mM Gal $\alpha$ -F, 15  $\mu$ M de BgaC E233G en 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pD 7 y 30°C.
- Reacción a 5 mM Gal $\alpha$ -F, 5 mM GlcNAc, 15  $\mu$ M de BgaC E233G en 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pD 7 y 30°C.

Las reacciones se monitorizaron por H-RMN a tiempo 0, 1, 3, 5, 6, 24 y 48 horas.

### 5.4.5 Estudio de la estabilidad del aceptor GlcN-oxazolina

Se preparan tampones 50 mM Na<sub>2</sub>HPO a pH 6, 6.5, 7, 7.5 y 8 en H<sub>2</sub>O, se liofilizan, y se redisuelve el sólido obtenido con D<sub>2</sub>O, empleando para ello el volumen de disolvente inicial. Los valores de pD se midieron determinando el pH usando un electrodo de pH de vidrio y luego aplicando la ecuación Ec. 2.

Se preparan 5 soluciones *stock* de GlcN-oxazolina a una concentración de 16 mM, empleando en cada una de ellas los diferentes tampones deuterados preparados, se incuban a 30°C y se monitoriza la hidrólisis del sustrato mediante H-RMN a 1, 3, 5, 6, 24 y 48 horas de reacción.

#### 5.4.6 Estudio de la reacción glicosintasa a pD 7.5 y 8

Se preparan dos reacciones a 5 mM Gal $\alpha$ -F, 5 mM GlcN-oxazolina, 15  $\mu$ M de BgaC E233G empleando los tampones Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pD 7.5 y 8 respectivamente, y se incuban la reacción a 30°C. Para la preparación de los controles de reacción, se prepara una reacción a 1 mM mM Gal $\alpha$ -F, 2 mM GlcNAc $\alpha$ -pNP, 15  $\mu$ M de BgaC E233G empleando el tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pD 8. Se monitorizan las reacciones por H-RMN tras 1, 3, 5, 6, 24 y 48 horas de reacción.

### 5.5 Protocolos bioquímicos y de biología molecular básicos

#### 5.5.1 Preparación células competentes

El protocolo descrito a continuación ha sido empleado para obtener células competentes tanto para la clonación de ADN (*E. coli* DH5 $\alpha$ , Invitrogen) como para la expresión de proteínas (*E. coli* BL21 (DE3)star, Invitrogen).

A partir de un glicerinado *stock* de la cepa de *E. coli* deseada se realiza una siembra en estría sobre una paca de medio LB sólido y se deja incubar ON a 37°C. A partir de una colonia aislada se realiza un inóculo de 3 mL de medio LB líquido y se incuban ON a 37°C y 250 rpm. Se realiza un cultivo de 30 mL de medio LB líquido (en un tubo falcón de 50 mL) y se inocula con el volumen necesaria del cultivo anterior para obtener una OD<sub>600</sub> inicial aproximada de 0,3; se deja crecer a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6. A continuación se mantiene el cultivo en hielo durante 20 minutos y se centrifuga a 3000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante mediante decantación y el *pellet* obtenido se resuspende por pipeteo con 15 mL una solución 50 mM CaCl<sub>2</sub> estéril y fría (4°C). Se realiza una segunda etapa de centrifugación empleando las condiciones anteriormente descritas y se resuspende el *pellet* obtenido con 3 mL de solución 50 mM CaCl<sub>2</sub> estéril y fría. Se adiciona el volumen necesario (750  $\mu$ L) de una solución estéril de glicerol al 80% (p/v) para alcanzar una concentración final al 20% (p/v). Finalmente se realizan alícuotas de 200  $\mu$ L de las células en eppendorfs de 1,5 mL estériles y se almacenan a -80°C.

## 5.5.2 Transformación de células competentes por CaCl<sub>2</sub>

En primer lugar, se descongelan en hielo las alícuotas necesarias de células competentes almacenadas a -80°C. A continuación, se adiciona el volumen de ADN correspondiente a 50 ng (<10 µL) sobre la alícuota de 200 µL de células competentes. En este protocolo será necesario realizar los siguientes controles:

Para el **control negativo** se añaden 5 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ estéril sobre los 200 µL de células. En la etapa final se realiza la siembra sobre medio LB sólido sin antibiótico.

En caso de trabajar con un vector no caracterizado será necesario realizar un **control positivo**. Para ello se transforma una alícuota de células con ADN de un vector ya caracterizado. En la etapa final se realizará la siembra sobre LB sólido con el antibiótico correspondiente

Se realiza un **control de viabilidad celular** en el cual no se añadirá ningún reactivo sobre las células competentes, se realizará la siembra sobre placas de LB sólido sin antibiótico.

Las células con el ADN/H<sub>2</sub>O se incuban 30 minutos en hielo, a continuación, se realiza la etapa de choque térmico donde se incuban las muestras a 42°C durante 2 minutos seguido de una incubación en hielo durante 5 minutos. Se añaden 500 µL de medio LB líquido a las muestras y se incuban a 37°C y 250 rpm durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo se extiende el contenido de las muestras sobre placas de LB sólido con kanamicina. En el caso que las muestras provengan de extracción de ADN (miniprep), se siembran 20 µL de las células transformadas. Por otro lado, si la muestra de ADN proviene de una QC-PCR, las células transformadas se centrifugan a 4000 rpm y 4°C durante 5 minutos. Se descartan 500 µL de sobrenadante, con el volumen restante se resuspende el *pellet* obtenido y se siembra la totalidad del volumen obtenido.

## 5.5.3 Transformación de células Stellar<sup>TM</sup> competent cells (ClonThec)

Se toman alícuotas de 25 µL de las células Stellar<sup>TM</sup> competent cells (ClonThec) almacenadas a -80°C. Se adiciona el volumen de ADN necesario, procurando no introducir más de 2.5 ng de DNA y se incuban durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realiza la etapa de choque térmico, para ello se incuban las células durante 45 segundos a 42°C y se incuban en hielo durante 5 minutos. Seguidamente se adicionan x4 volúmenes de SOC media ( 100 µL SOC media, suplementado con 10 mM glucosa, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM MgSO<sub>4</sub>) previamente atemperado a 37°C, y se incuban las células durante 1 hora a 37°C y 200 rpm. Finalmente se plaquea la totalidad de las células transformadas en una placa de medio sólido LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y se incuban a 37°C durante 24 horas.

#### 5.5.4 Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN se ha empleado el kit *High Purity Plasmid Miniprep kit* (CliniSciences). En primer lugar, se inoculan células de *E. coli* DH5 $\alpha$  recién transformadas con el plásmido de interés en 5 mL de medio LB líquido suplementado con kanamicina (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para la extracción de ADN se sigue el protocolo proporcionado por el fabricante.

#### 5.5.5 Purificación de ADN

Para la purificación de productos de PCR se ha usado el kit *QIAquick spin - PCR purification Kit* (Qiagen) Se ha seguido el protocolo descrito por el fabricante.

#### 5.5.6 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN en este trabajo se ha realizado mediante el sistema Qubit<sup>®</sup> (Thermo Fisher). Este ensayo se basa la capacidad que presenta cierto fluoróforo comercial Life Technologies (Thermo Fisher<sup>®</sup>) de emitir fluorescencia cuando se une al ADN de doble hebra.

Se dispone de dos kits diferentes, su uso dependerá de la concentración esperada de ADN en la muestra (*high sensitivity*, para muestras entre 10 y 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ; y *broad range*, para muestras entre 100 and 1000  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Para la cuantificación de las muestras de ADN se sigue el protocolo proporcionado por el fabricante.

#### 5.5.7 Digestión de ADN: DpnI

Con la finalidad de eliminar el ADN metilado, empleado como molde en las reacciones de PCR, se realiza su digestión con la enzima DpnI. Una vez realizada la etapa de purificación del producto de PCR, se eluye en un con 40  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O MilliQ; a los cuales se le añadirá 1,5  $\mu\text{L}$  de enzima DpnI-HF (New England Biolabs), y 4,4  $\mu\text{L}$  de tampón 10xCutsmart Buffer (New England Biolab). Se incuban las reacciones entre 2 y 3 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se inactiva la enzima incubando las reacciones a 80 $^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.

#### 5.5.8 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína en este trabajo se ha realizado mediante el método de BCA empleando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como proteína de referencia para realizar la recta patrón. Para este



ensayo se ha empleado el kit *Pierce™ BCA Protein Assay kit* (ThermoFisher Scientific), se realizan diluciones seriadas de BSA (de 0 a 2 mg/mL) empleando el tampón presente en la solución proteica. Se toman 20 µL de cada muestra (tanto de cada dilución de la recta patrón como de la muestra problema (previamente diluida)), y se mezclan en una microplaca con 160 µL de la solución BCA de trabajo (se prepara siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante). Se incuba la microplaca 30 minutos a 37°C y se lee la absorbancia 595 nm.

### 5.5.9 Medio Luria Bertani (LB) suplementado para autoinducción

Los cultivos de todas las variantes de la proteína LnbB se han realizado mediante medio LB líquido suplementado con medio de autoinducción. Para este protocolo se han seguido las directrices descritas en la publicación Studier et al 2005<sup>106</sup>. A continuación, se describe el protocolo realizado para un cultivo de 30 mL.

Se preparan las siguientes soluciones *stock*, en todas ellas se emplea H<sub>2</sub>O MilliQ como disolvente:

**Tabla 5. 10.** Soluciones empleadas en el método de autoinducción de proteínas. En ella se indican las soluciones, los compuestos que la conforman, la concentración *stock* empleada y la concentración final en cultivo.

Solución	Compuesto	Concentración <i>Stock</i> (M)	Concentración final en cultivo (M)
M (50x)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,25	0,025
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	0,025
	NH <sub>4</sub> Cl	2,5	0,05
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25	0,005
Solución	Compuesto	Concentración <i>Stock</i> (p/v) %	Concentración final en cultivo (p/v)%
5052 (50x)	Glicerol	25	0,5
	Glucosa	2,5	0,05
	Lactosa	10	0,2
Solución	Compuesto	Concentración <i>Stock</i> (M)	Concentración final en cultivo (M)
MgSO <sub>4</sub> (100x)	MgSO <sub>4</sub>	0,2	0,002

Para esterilizar las soluciones se han empleado dos métodos distintos, las soluciones M (50x) y 5050 (50x) se esterilizan por autoclavado, mientras que la solución MgSO<sub>4</sub> (100x) se esteriliza por filtración empleado filtros de 0,22 µm.

En un matraz Erlenmeyer se preparan 30 mL de cultivo de LB líquido (20 g/L, SigmaAldrich) y se autoclava. Cuando todas las soluciones están a temperatura ambiente se suplementa el medio LB con las soluciones de autoinducción; para ello se emplean los siguientes volúmenes:

**Tabla 5. 11.** Soluciones para la preparación de un cultivo por autoinducción de 30mL.

<b>Solución</b>	<b>Volumen adicionado (mL)</b>
LB	30
M (50x)	0,6
5052 (50x)	0,6
MgSO <sub>4</sub> (100x)	0,3
Kanamicina (1000x)	0,03



## Bibliografía

---



## Bibliografía

- (1) World Health Organization. *Infant and Young Child Nutrition Global Strategy on Infant and Young Child Feeding*; 2002; Vol. A55/15.
- (2) Meredith-Dennis, L.; Xu, G.; Goonatileke, E.; Lebrilla, C. B.; Underwood, M. A.; Smilowitz, J. T. Composition and Variation of Macronutrients, Immune Proteins, and Human Milk Oligosaccharides in Human Milk From Nonprofit and Commercial Milk Banks. *J. Hum. Lact.* **2017**, 1–10. <https://doi.org/10.1177/0890334417710635>.
- (3) Ballard, O.; Morrow, A. L. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. North Am.* **2013**, *60* (1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.
- (4) Garrido, D.; Dallas, D. C.; Mills, D. A. Consumption of Human Milk Glycoconjugates by Infant-Associated Bifidobacteria: Mechanisms and Implications. *Microbiology* **2013**, *159*, 649–664. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064113-0>.
- (5) Niñonuevo, M. R.; Perkins, P. D.; Francis, J.; Lamotte, L. T. M.; LoCascio, R. G.; Freeman, S. L.; Mills, D. A.; German, J. B.; Grimm, R.; Lebrilla, C. B. Daily Variations in Oligosaccharides of Human Milk Determined by Microfluidic Chips and Mass Spectrometry (Journal of the Agricultural and Food Chemistry (2008) *56*, (618)). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (12), 4854. <https://doi.org/10.1021/jf800912v>.
- (6) Coppa, G. V.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Gabrielli, O. Prebiotics in Human Milk: A Review. *Dig. Liver Dis.* **2006**, *38* (SUPPL. 2), 291–294. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60013-9](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60013-9).
- (7) Newburg, D. S. Glycobiology of Human Milk. *Biochem.* **2013**, *78* (7), 771–785. <https://doi.org/10.1134/S0006297913070092>.
- (8) Newburg, D. S.; Ruiz-Palacios, G. M.; Morrow, A. L. Human Milk Glycans Protect Infants against Enteric Pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* **2005**, *25*, 37–58. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.25.050304.092553>.
- (9) Hennet, T.; Weiss, A.; Borsig, L. Decoding Breast Milk Oligosaccharides. *Swiss Med. Wkly.* **2014**, *144* (February), 1–9. <https://doi.org/10.4414/smw.2014.13927>.
- (10) Akkerman, R.; Faas, M. M.; de Vos, P. Non-Digestible Carbohydrates in Infant Formula as Substitution for Human Milk Oligosaccharide Functions: Effects on Microbiota and Gut Maturation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59* (9), 1486–1497. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1414030>.
- (11) Kunz, C.; Rudloff, S.; Baier, W.; Klein, N.; Strobel, S. Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. *Annu. Rev. Nutr.* **2000**, No. 20, 699–722. <https://doi.org/10.1199-9885/00/0715-0699>.
- (12) Bode, L. Human Milk Oligosaccharides: Structure and Functions. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* **2020**, *94*, 115–123. <https://doi.org/10.1159/000505339>.
- (13) Urashima, T.; Taufik, E.; Fukuda, R.; Nakamura, T.; Fukuda, K.; Saito, T.; Messer, M. Chemical Characterization of Milk Oligosaccharides of the Koala (*Phascolarctos Cinereus*). *Glycoconj. J.* **2013**, *30* (8), 801–811. <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9484-8>.
- (14) Bode, L. Human Milk Oligosaccharides: Every Baby Needs a Sugar Mama. *Glycobiology* **2012**, *22*, 1147–1162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>.
- (15) Coppa, G. V.; Pierani, P.; Zampini, L.; Carloni, I.; Carlucci, A.; Gabrielli, O. Oligosaccharides in Human Milk during Different Phases of Lactation. *Acta Paediatr. Suppl.* **1999**, *88*, 89–94.
- (16) Kunz, C.; Rudloff, S.; Baier, W.; Klein, N.; St, S. Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. *Annu. Rev. Nutr.* **2000**, *20*, 699–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.699>.

- (17) Bode, L.; Jantscher-krenn, E. Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides. *Adv. Nutr.* **2012**, 383–391. <https://doi.org/10.3945/an.111.001404>.
- (18) Azad, M. B.; Robertson, B.; Atakora, F.; Becker, A. B.; Subbarao, P.; Moraes, T. J.; Mandhane, P. J.; Turvey, S. E.; Lefebvre, D. L.; Sears, M. R.; Bode, L. Human Milk Oligosaccharide Concentrations Are Associated with Multiple Fixed and Modifiable Maternal Characteristics, Environmental Factors, and Feeding Practices. *J. Nutr.* **2018**, *148* (11), 1733–1742. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy175>.
- (19) Tsuchida, A.; Okajima, T.; Furukawa, K.; Ando, T.; Ishida, H.; Yoshida, A.; Nakamura, Y.; Kannagi, R.; Kiso, M.; Furukawa, K. Synthesis of Disialyl Lewis a (Lea) Structure in Colon Cancer Cell Lines by a Sialyltransferase, ST6GalNAc VI, Responsible for the Synthesis of  $\alpha$ -Series Gangliosides. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (25), 22787–22794. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211034200>.
- (20) Faijes, M.; Castejón-Vilatersana, M.; Cristina, V.-C.; Planas, A. Enzymatic and Cell Factory Approaches to the Production of Human Milk Oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.*
- (21) Thurl, S.; Muller-Werner, B.; Sawatzki, G. Quantification of Individual Oligosaccharide Compounds from Human Milk Using High-PH Anion-Exchange Chromatography. *Anal Biochem* **1996**, *235* (2), 202–206. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0113>.
- (22) Kunz, C.; Rudloff, S.; Schad, W.; Braun, D. Lactose-Derived Oligosaccharides in the Milk of Elephants: Comparison with Human Milk. *The British journal of nutrition.* **1999**, pp 391–399. <https://doi.org/doi:10.1017/S0007114599001798>.
- (23) Chaturvedi, P.; Warren, C. D.; Altaye, M.; Morrow, A. L.; Ruiz-Palacios, G.; Pickering, L. K.; Newburg, D. S. Fucosylated Human Milk Oligosaccharides Vary between Individuals and over the Course of Lactation. *Glycobiology* **2001**, *11* (5), 365–372. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.5.365>.
- (24) Bao, Y.; Chen, C.; Newburg, D. S. Quantification of Neutral Human Milk Oligosaccharides by Graphitic Carbon High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2013**, *433* (1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.003>.
- (25) Wu, S.; Grimm, R.; German, J. B.; Lebrilla, C. B. Annotation and Structural Analysis of Sialylated Human Milk Oligosaccharides. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (2), 856–868. <https://doi.org/10.1021/pr101006u>.
- (26) Hong, Q.; Ruhaak, L. R.; Totten, S. M.; Smilowitz, J. T.; German, J. B.; Lebrilla, C. B. Label Free Absolute Quantitation of Oligosaccharides Using Multiple Reaction Monitoring. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2640–2647. <https://doi.org/10.1021/ac404006z>.
- (27) Barboza, M.; Sela, D. A.; Pirim, C.; LoCascio, R. G.; Freeman, S. L.; German, J. B.; Mills, D. A.; Lebrilla, C. B. Glycoprofiling Bifidobacterial Consumption of Galacto-Oligosaccharides by Mass Spectrometry Reveals Strain-Specific, Preferential Consumption of Glycans. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (23), 7319–7325. <https://doi.org/10.1128/AEM.00842-09>.
- (28) Wu, S.; Tao, N.; German, J. B.; Grimm, R.; Lebrilla, C. B. Development of an Annotated Library of Neutral Human Milk Oligosaccharides. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (8), 4138–4151. <https://doi.org/10.1021/pr100362f>.
- (29) Urashima, T.; Asakuma, S.; Leo, F.; Fukuda, K.; Messer, M.; Oftedal, O. T. The Predominance of Type I Oligosaccharides Is a Feature Specific to Human Breast Milk. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 473S–482S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001412.473S>.
- (30) Jantscher-Krenn, E.; Marx, C.; Bode, L. Human Milk Oligosaccharides Are Differentially Metabolised in Neonatal Rats. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110* (4), 640–650. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005727>.
- (31) Martínez-Ferez, A.; Rudloff, S.; Guadix, A.; Henkel, C. a.; Pohlentz, G.; Boza, J. J.; Guadix, E. M.; Kunz, C. Goats' Milk as a Natural Source of Lactose-Derived Oligosaccharides: Isolation by Membrane Technology. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 173–181.

- <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.003>.
- (32) Tao, N.; Wu, S.; Kim, J.; An, H. J.; Hinde, K.; Power, M. L.; Gagneux, P.; German, J. B.; Lebrilla, C. B. Evolutionary Glycomics: Characterization of Milk Oligosaccharides in Primates. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (4), 1548–1557. <https://doi.org/10.1021/pr1009367>.
- (33) Fajjes, M.; Castejón-Vilatersana, M.; Val-Cid, C.; Planas, A. Enzymatic and Cell Factory Approaches to the Production of Human Milk Oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.014>.
- (34) Albrecht, S.; Lane, J. a; Mariño, K.; Al Busadah, K. a; Carrington, S. D.; Hickey, R. M.; Rudd, P. M. A Comparative Study of Free Oligosaccharides in the Milk of Domestic Animals. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111* (7), 1313–1328. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003772>.
- (35) Mariño, K.; Lane, J. A.; Abrahams, J. L.; Struwe, W. B.; Harvey, D. J.; Marotta, M.; Hickey, R. M.; Rudd, P. M. Method for Milk Oligosaccharide Profiling by 2-Aminobenzamide Labeling and Hydrophilic Interaction Chromatography. *Glycobiology* **2011**, *21* (10), 1317–1330. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr067>.
- (36) Blank, D.; Dozt, V.; Geyer, R.; Kunz, C. Human Milk Oligosaccharides and Lewis Blood Group : Individual High-Throughput Sample Pro Fi Ling to Enhance Conclusions From. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 440–449. <https://doi.org/10.3945/an.111.001446>.
- (37) Bode, L. Human Milk Oligosaccharides: Every Baby Needs a Sugar Mama. *Glycobiology* **2012**, *22* (9), 1147–1162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>.
- (38) Castanys-Muñoz, E.; Martin, M. J.; Prieto, P. A. 2'-Fucosyllactose: An Abundant, Genetically Determined Soluble Glycan Present in Human Milk. *Nutr. Rev.* **2013**, *71* (12), 773–789. <https://doi.org/10.1111/nure.12079>.
- (39) Ramakrishnan, B.; Boeggeman, E.; Qasba, P. K. Breakthroughs and Views:  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase and Lactose Synthase: Molecular Mechanical Devices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291* (5), 1113–1118. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6506>.
- (40) Kobata, A. Possible Application of Milk Oligosaccharides for Drug Development. *Chang Gung Med J* **2003**, *26* (9), 620–636.
- (41) Hundshammer, C.; Minge, O. In Love with Shaping You—Influential Factors on the Breast Milk Content of Human Milk Oligosaccharides and Their Decisive Roles for Neonatal Development. *Nutrients* **2020**, *12* (11), 1–31. <https://doi.org/10.3390/nu12113568>.
- (42) Rudloff, S.; Pohlentz, G.; Borsch, C.; Lentze, M. J.; Kunz, C. Urinary Excretion of in Vivo <sup>13</sup>C-Labelled Milk Oligosaccharides in Breastfed Infants. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107* (7), 957–963. <https://doi.org/10.1017/S0007114511004016>.
- (43) Bode, L. Recent Advances on Structure, Metabolism, and Function of Human Milk Oligosaccharides. *J. Nutr.* **2006**, *136* (8), 2127–2130. <https://doi.org/10.1093/jn/136/8/2127>.
- (44) Kitaoka, M. Bifidobacterial Enzymes Involved in the Metabolism of Human Milk Oligosaccharides. *Adv. Nutr.* **2012**, *3*, 422S–429S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001420>.
- (45) Garrido, D.; Barile, D.; Mills, D. a. A Molecular Basis for Bifidobacterial Enrichment in the Infant Gastrointestinal Tract. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* **2012**, *3*, 415–421. <https://doi.org/10.3945/an.111.001586>.
- (46) Fushinobu, S. Unique Sugar Metabolic Pathways of Bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74* (12), 2374–2384. <https://doi.org/10.1271/bbb.100494>.
- (47) Thomson, P.; Medina, D. A.; Garrido, D. Human Milk Oligosaccharides and Infant Gut Bifidobacteria: Molecular Strategies for Their Utilization. *Food Microbiology.* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.001>.
- (48) Moro, G. E. Morphologie Und Bakteriologische Untersuchungen Über Die Darmbakterien Des Säuglings: Die Bakterien-Flora Des Normalen Frauenmilchstuhls. *Jahrb. Kinderh* **1900**, *61*, 686–734.



- (49) Schönfeld, H. Über Die Beziehungen Der Einzelnen Bestandteile Der Frauenmilch Zur Bifidusflora. *Jahrb. der Kinderh* **1926**, *113*, 19–60.
- (50) György, P.; Norris, R. F.; Rose, C. S. Bifidus Factor. I. A Variant of Lactobacillus Bifidus Requiring a Special Growth Factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **1954**, *48*, 193–201. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(54\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(54)90323-9).
- (51) Rudloff, S.; Kuntz, S.; Ostenfeldt Rasmussen, S.; Roggenbuck, M.; Sprenger, N.; Kunz, C.; Sangild, P. T.; Brandt Bering, S. Metabolism of Milk Oligosaccharides in Preterm Pigs Sensitive to Necrotizing Enterocolitis. *Front. Nutr.* **2019**, *6* (March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00023>.
- (52) Smith-Brown, P.; Morrison, M.; Krause, L.; Davies, P. S. W. Mothers Secretor Status Affects Development of Childrens Microbiota Composition and Function: A Pilot Study. *PLoS One* **2016**, *11* (9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161211>.
- (53) Parkkinen, J.; Finne, J.; Achtman, M.; Väisäne, V.; Korhonen, T. . Escherichia Coli Strains Binding Neuraminyl A2-3 Galactosides. *Mikrobiyol. Bul.* **1983**, *26* (1), 12–16.
- (54) Andersson, B.; Porras, O.; Hanson, L. Å.; Lagergård, T.; Svanborg-Edén, C. Inhibition of Attachment of Streptococcus Pneumoniae and Haemophilus Influenzae by Human Milk and Receptor Oligosaccharides. *J. Infect. Dis.* **1986**, *153* (2), 232–237.
- (55) Coppa, G. V.; Zampini, L.; Galeazzi, T.; Facinelli, B.; Ferrante, L.; Capretti, R.; Orazio, G. Human Milk Oligosaccharides Inhibit the Adhesion to Caco-2 Cells of Diarrheal Pathogens: Escherichia Coli, Vibrio Cholerae, and Salmonella Fyris. *Pediatr. Res.* **2006**, *59* (3), 377–382. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000200805.45593.17>.
- (56) Morrow, A. L.; Ruiz-Palacios, G. M.; Jiang, X.; Newburg, D. S. Human-Milk Glycans That Inhibit Pathogen Binding Protect Breast-Feeding Infants against Infectious Diarrhea. *J. Nutr.* **2005**, *135* (5), 1304–1307. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.510> [pii].
- (57) Read, J. S. Late Postnatal Transmission of HIV-1 in Breast-Fed Children: An Individual Patient Data Meta-Analysis. *J. Infect. Dis.* **2004**, *189* (12), 2154–2166. <https://doi.org/10.1086/420834>.
- (58) Kuhn, L.; Aldrovandi, G. M.; Sinkala, M.; Kankasa, C.; Semrau, K.; Mwiya, M.; Kasonde, P.; Scott, N.; Vwalika, C.; Walter, J.; Bulterys, M.; Tsai, W.-Y.; Thea, D. M. Effects of Early, Abrupt Weaning on HIV-Free Survival of Children in Zambia. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359* (2), 130–141. <https://doi.org/10.1056/nejmoa073788>.
- (59) Rudloff, C.; Sabine, K.; Kuntz, S. Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. In *Food oligosaccharides: production, analysis and bioactivity*; Moreno, F. J., Luz Sanz, M., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: West Sussex, **2014**; pp 5–20.
- (60) Angeloni, S.; Ridet, J. L.; Kusy, N.; Gao, H.; Crevoisier, F.; Guinchard, S.; Kochhar, S.; Sigrist, H.; Sprenger, N. Glycoprofiling with Micro-Arrays of Glycoconjugates and Lectins. *Glycobiology* **2005**, *15* (1), 31–41. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh143>.
- (61) Eiwegger, T.; Stahl, B.; Haidl, P.; Schmitt, J.; Boehm, G.; Dehlink, E.; Urbanek, R.; Szepfalusi, Z. Prebiotic Oligosaccharides: In Vitro Evidence for Gastrointestinal Epithelial Transfer and Immunomodulatory Properties. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2010**, *21* (8), 1179–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01062.x>.
- (62) Wang, B.; Brand-Miller, J.; McVeagh, P.; Petocz, P. Concentration and Distribution of Sialic Acid in Human Milk and Infant Formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74* (4), 510–515. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.510>.
- (63) Wang, B.; McVeagh, P.; Petocz, P.; Brand-Miller, J. Brain Ganglioside and Glycoprotein Sialic Acid in Breastfed Compared with Formula-Fed Infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78* (5), 1024–1029. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.5.1024>.
- (64) Wang, B.; Yu, B.; Karim, M.; Hu, H.; Sun, Y.; McGreevy, P.; Petocz, P.; Held, S.; Brand-Miller, J. Dietary Sialic Acid Supplementation Improves Learning and Memory in Piglets. *Am. J. Clin. Nutr.*

- 2007, 85 (2), 561–569. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.2.561>.
- (65) Vázquez, E.; Barranco, A.; Ramírez, M.; Gruart, A.; Delgado-García, J. M.; Martínez-Lara, E.; Blanco, S.; Martín, M. J.; Castanys, E.; Buck, R.; Prieto, P.; Rueda, R. Effects of a Human Milk Oligosaccharide, 2'-Fucosyllactose, on Hippocampal Long-Term Potentiation and Learning Capabilities in Rodents. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, 26 (5), 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.11.016>.
- (66) Wang, L.-X.; Davis, B. G. Realizing the Promise of Chemical Glycobiology. *Chem. Sci.* **2013**, 4, 3381–3394.
- (67) Jennum, C. A.; Hauch Fenger, T.; Bruun, L. M.; Madsen, R. One-Pot Glycosylations in the Synthesis of Human Milk Oligosaccharides. *European J. Org. Chem.* **2014**, 2014 (15), 3232–3241. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201400164>.
- (68) Hsu, Y.; Lu, X.; Zulueta, M. M. L.; Tsai, C.; Lin, K.; Hung, S.; Wong, C. Acyl and Silyl Group Effects in Reactivity-Based One-Pot Glycosylation: Synthesis of Embryonic Stem Cell Surface Carbohydrates Lc 4 and IV 2 Fuc-Lc 4. *Jacs* **2012**, 3, 4549–4552.
- (69) Xiao, Z.; Guo, Y.; Liu, Y.; Li, L.; Zhang, Q.; Wen, L.; Wang, X.; Kondengaden, S. M.; Wu, Z.; Zhou, J.; Cao, X.; Li, X.; Ma, C.; Wang, P. G. Chemoenzymatic Synthesis of a Library of Human Milk Oligosaccharides. *J. Org. Chem.* **2016**, 81 (14), 5851–5865. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00478>.
- (70) Prudden, A. R.; Liu, L.; Capicciotti, C. J.; Wolfert, M. A.; Wang, S.; Gao, Z.; Meng, L.; Moremen, K. W.; Boons, G.-J. Synthesis of Asymmetrical Multiantennary Human Milk Oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, 114 (27), 6954–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701785114>.
- (71) Planas, A.; Fajjes, M.; Codera, V.; Llull, U. R. When Enzymes Do It Better: Enzymatic Glycosylation Methods. In *When Enzymes do it better: enzymatic glycosylation methods. In Carbohydrate Chemistry: State of the art and challenges for drug development*; **2015**; pp 213–244.
- (72) Na, L.; Li, R.; Chen, X. Recent Progress in Synthesis of Carbohydrates with Sugar Nucleotide-Dependent Glycosyltransferases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2021**, 61, 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.10.007>.
- (73) Srivastava, A.; Bandhu, S. Technological Challenges in Enzymatically Produced Functional Foods. *Curr. Sustain. Energy Reports* **2020**, 7 (3), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s40518-020-00151-7>.
- (74) McArthur, J. B.; Yu, H.; Chen, X. A Bacterial B1-3-Galactosyltransferase Enables Multigram-Scale Synthesis of Human Milk Lacto- N-Tetraose (LNT) and Its Fucosides. *ACS Catal.* **2019**, 10721–10726. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b03990>.
- (75) Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. The Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (D1), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- (76) Abdul Manas, N. H.; Md. Illias, R.; Mahadi, N. M. Strategy in Manipulating Transglycosylation Activity of Glycosyl Hydrolase for Oligosaccharide Production. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2018**, 38 (2), 272–293. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1339664>.
- (77) Dies, G.; Henrissat, B.; Davies, G.; Henrissat, B. Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. **1995**.
- (78) Koshland Jr., D. E. Koshland - Original. *Biol. Rev.* **1953**, 28 (February), 416–436.
- (79) Bissaro, B.; Monsan, P.; Fauré, R.; O'Donohue, M. J. Glycosynthesis in a Waterworld: New Insight into the Molecular Basis of Transglycosylation in Retaining Glycoside Hydrolases. *Biochem. J.* **2015**, 467 (1), 17–35. <https://doi.org/10.1042/BJ20141412>.
- (80) Danby, P. M.; Withers, S. G. Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis. *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11 (7), 1784–1794. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00340>.

- (81) Mackenzie, L. F.; Wang, Q.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. **1998**, *7863* (16), 5583–5584.
- (82) Malet, C.; Planas, A. From  $\beta$ -Glucanase to  $\beta$ -Glucansynthase: Glycosyl Transfer to  $\alpha$ -Glycosyl Fluorides Catalyzed by a Mutant Endoglucanase Lacking Its Catalytic Nucleophile. *FEBS Lett.* **1998**, *440* (1–2), 208–212. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01448-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01448-3).
- (83) Davies, G. J.; Wilson, K. S.; Henrissat, B. Nomenclature for Sugar-Binding Subsites in Glycosyl Hydrolases [1]. *Biochem. J.* **1997**, *321* (2), 557–559. <https://doi.org/10.1042/bj3210557>.
- (84) Planas, A.; Malet, C. Contribution of Subsites to Catalysis and Specificity in the Extended Binding Cleft of Bacillus 1,3-1,4- $\beta$ -D-Glucan 4-Glucanohydrolases. *Prog. Biotechnol.* **1995**, *10* (C), 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(06\)80096-1](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(06)80096-1).
- (85) Miyazaki, T.; Sato, T.; Furukawa, K.; Ajisaka, K. Enzymatic Synthesis of Lacto-N-Difucohexaose I Which Binds to Helicobacter Pylori. *Methods Enzymol.* **2010**, *480* (C), 511–524. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)80023-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)80023-0).
- (86) Murata, T.; Inukai, T.; Suzuki, M.; Yamagishi, M.; Usui, T. Facile Enzymatic Conversion of Lactose into Lacto-N-Tetraose and Lacto-N-Neotetraose. *Glycoconj. J.* **1999**, *16* (3), 189–195. <https://doi.org/10.1023/A:1007020219275>.
- (87) Wada, J.; Ando, T.; Kiyohara, M.; Ashida, H.; Kitaoka, M.; Yamaguchi, M.; Kumagai, H.; Katayama, T.; Yamamoto, K. Bifidobacterium Bifidum Lacto-N-Biosidase, a Critical Enzyme for the Degradation of Human Milk Oligosaccharides with a Type 1 Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (13), 3996–4004. <https://doi.org/10.1128/AEM.00149-08>.
- (88) Schmölder, K.; Weingarten, M.; Baldenius, K.; Nidetzky, B. Lacto-N-Tetraose Synthesis by Wild-Type and Glycosynthase Variants of the  $\beta$ -N-Hexosaminidase from Bifidobacterium Bifidum. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (23), 5661–5665. <https://doi.org/10.1039/c9ob00424f>.
- (89) Han, N. S.; Kim, T. J.; Park, Y. C.; Kim, J.; Seo, J. H. Biotechnological Production of Human Milk Oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30* (6), 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.003>.
- (90) Sprenger, G. A.; Baumgärtner, F.; Albermann, C. Production of Human Milk Oligosaccharides by Enzymatic and Whole-Cell Microbial Biotransformations. *J. Biotechnol.* **2017**, *258* (July), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.030>.
- (91) Sprenger, G. A.; Baumgärtner, F.; Albermann, C. Production of Human Milk Oligosaccharides by Enzymatic and Whole-Cell Microbial Biotransformations. *J. Biotechnol.* **2017**, *258*, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.030>.
- (92) Baumgärtner, F.; Conrad, J.; Sprenger, G. A.; Albermann, C. Synthesis of the Human Milk Oligosaccharide Lacto-N-Tetraose in Metabolically Engineered, Plasmid-Free E. Coli. *Chembiochem* **2014**, *15* (13), 1896–1900. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402070>.
- (93) Baumgärtner, F.; Sprenger, G. A.; Albermann, C. Galactose-Limited Fed-Batch Cultivation of Escherichia Coli for the Production of Lacto-N-Tetraose. *Enzyme Microb. Technol.* **2015**, *75–76*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.04.009>.
- (94) Papadakis, M.; Pedersen, M.; Bych, K. Fermentive Production of Oligosaccharides. WO 2017/101958 A1, 2017.
- (95) Sano, M.; Hayakawa, K.; Kato, I. An Enzyme Releasing Lacto-N-Biose from Oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (18), 8512–8516. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8512>.
- (96) Wada, J.; Ando, T.; Kiyohara, M.; Ashida, H.; Kitaoka, M.; Yamaguchi, M.; Kumagai, H.; Katayama, T.; Yamamoto, K. Bifidobacterium Bifidum Lacto-N-Biosidase, a Critical Enzyme for the Degradation of Human Milk Oligosaccharides with a Type 1 Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (13), 3996–4004. <https://doi.org/10.1128/AEM.00149-08>.
- (97) Hattie, M.; Debowski, A. W.; Stubbs, K. A. Development of Tools to Study Lacto-N-Biosidase:

- An Important Enzyme Involved in the Breakdown of Human Milk Oligosaccharides. *ChemBioChem* **2012**, *13* (8), 1128–1131. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200135>.
- (98) Ito, T.; Katayama, T.; Hattie, M.; Sakurama, H.; Wada, J.; Suzuki, R.; Ashida, H.; Wakagi, T.; Yamamoto, K.; Stubbs, K. A.; Fushinobu, S. Crystal Structures of a Glycoside Hydrolase Family 20 Lacto-N-Biosidase from *Bifidobacterium Bifidum*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (17), 11795–11806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420109>.
- (99) Hattie, M.; Ito, T.; Debowski, A. W.; Arakawa, T.; Katayama, T.; Yamamoto, K.; Fushinobu, S.; Stubbs, K. A. Gaining Insight into the Catalysis by GH20 Lacto-N-Biosidase Using Small Molecule Inhibitors and Structural Analysis. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (81), 15008–15011. <https://doi.org/10.1039/c5cc05494j>.
- (100) Val-Cid, C.; Biarnés, X.; Fajjes, M.; Planas, A. Structural-Functional Analysis Reveals a Specific Domain Organization in Family GH20 Hexosaminidases. *PLoS One* **2015**, *10* (5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128075>.
- (101) Henn-Sax, M.; Höcker, B.; Wilmanns, M.; Sterner, R. Divergent Evolution of (Ba)8-Barrel Enzymes. *Biol. Chem.* **2001**, *382* (9), 1315–1320. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.163>.
- (102) Mark, B. L.; Vocadlo, D. J.; Knapp, S.; Triggs-Raine, B. L.; Withers, S. G.; James, M. N. G. Crystallographic Evidence for Substrate-Assisted Catalysis in a Bacterial  $\beta$ -Hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (13), 10330–10337. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011067200>.
- (103) Val-Cid, C. Doctoral Thesis: STRUCTURAL-FUNCTIONAL ANALYSIS OF LACTO-N-BIOSIDASE FROM *Bifidobacterium Bifidum*: A POTENTIAL BIOCATALYST FOR THE PRODUCTION OF HUMAN MILK OLIGOSACCHARIDES, IQS School of Engineering, **2016**.
- (104) Zeuner, B.; Teze, D.; Muschiol, J.; Meyer, A. S. Synthesis of Human Milk Oligosaccharides: Protein Engineering Strategies for Improved Enzymatic Transglycosylation. *Molecules* **2019**, *24* (11). <https://doi.org/10.3390/molecules24112033>.
- (105) Teze, D.; Zhao, J.; Wiemann, M.; Ara, K. Z. G.; Lupo, R.; Rønne, M. E.; Carlström, G.; Duus, J.; Sanejouand, Y. H.; O'Donohue, M. J.; Nordberg-Karlsson, E.; Fauré, R.; Ståhlbrand, H.; Svensson, B. Rational Enzyme Design without Structural Knowledge: A Sequence-Based Approach for Efficient Generation of Glycosylation Catalysts. *ChemRxiv* **2020**, No. 1. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11538708.v2>.
- (106) Studier, F. W. Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *41* (1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>.
- (107) Yamada, C.; Gotoh, A.; Sakanaka, M.; Hattie, M.; Stubbs, K. A.; Katayama-Ikegami, A.; Hirose, J.; Kurihara, S.; Arakawa, T.; Kitaoka, M.; Okuda, S.; Katayama, T.; Fushinobu, S. Molecular Insight into Evolution of Symbiosis between Breast-Fed Infants and a Member of the Human Gut Microbiome *Bifidobacterium Longum*. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (4), 515-524.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.012>.
- (108) Castejón-vilatersana, M.; Fajjes, M.; Planas, A. Transglycosylation Activity of Engineered *Bifidobacterium Lacto-n-Biosidase* Mutants at Donor Subsites for Lacto-n-Tetraose Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22063230>.
- (109) Chen, X.; Jin, L.; Jiang, X.; Guo, L.; Gu, G.; Xu, L.; Lu, L.; Wang, F.; Xiao, M. Converting a  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase into Two Trans- $\beta$ -N-Acetylhexosaminidases by Domain-Targeted Mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104* (2), 661–673. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10253-y>.
- (110) Kapešová, J.; Petrásková, L.; Kulík, N.; Straková, Z.; Bojarová, P.; Markošová, K.; Rebroš, M.; Křen, V.; Slámová, K. Transglycosidase Activity of Glycosynthase-Type Mutants of a Fungal GH20  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *161*, 1206–1215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.273>.
- (111) Schmölzer, K.; Weingarten, M.; Baldenius, K.; Nidetzky, B. Glycosynthase Principle Transformed

- into Biocatalytic Process Technology: Lacto- N-Triose II Production with Engineered Exo-Hexosaminidase. *ACS Catal.* **2019**, *9* (6), 5503–5514. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b01288>.
- (112) Tews, I.; Terwisschal van Scheltinga, A. C.; Perrakis, A.; Wilson, K.S.; Dijkstra, B. Substrate-Assisted Catalysis Unifies Two Families of Chitinolytic Enzymes. *Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7954–7959.
- (113) Slámová, K.; Krejzová, J.; Marhol, P.; Kalachova, L.; Kulik, N.; Pelantová, H.; Cvačka, J.; Křen, V. Synthesis of Derivatized Chitoooligomers Using Transglycosidases Engineered from the Fungal GH20  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (8), 1941–1950. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500075>.
- (114) Bissaro, B.; Saurel, O.; Arab-Jaziri, F.; Saulnier, L.; Milon, A.; Tenkanen, M.; Monsan, P.; O'Donohue, M. J.; Fauré, R. Mutation of a PH-Modulating Residue in a GH51  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase Leads to a Severe Reduction of the Secondary Hydrolysis of Transfuranosylation Products. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1840* (1), 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.013>.
- (115) Bonnin, E.; Vigouroux, J.; Thibault, J. F. Kinetic Parameters of Hydrolysis and Transglycosylation Catalyzed by an Exo- $\beta$ -(1,4)-Galactanase. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20* (7), 516–522. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00188-3).
- (116) Bissaro, B.; Durand, J.; Biarnés, X.; Planas, A.; Monsan, P.; O'Donohue, M. J.; Fauré, R. Molecular Design of Non-Leloir Furanose-Transferring Enzymes from an  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase: A Rationale for the Engineering of Evolved Transglycosylases. *ACS Catal.* **2015**, *5* (8), 4598–4611. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00949>.
- (117) Liu, T.; Duan, Y.; Yang, Q. Revisiting Glycoside Hydrolase Family 20  $\beta$ -N-Acetyl-D-Hexosaminidases: Crystal Structures, Physiological Substrates and Specific Inhibitors. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36* (4), 1127–1138. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.013>.
- (118) Sakurama, H.; Kiyohara, M.; Wada, J.; Honda, Y.; Yamaguchi, M.; Fukiya, S.; Yokota, A.; Ashida, H.; Kumagai, H.; Kitaoka, M.; Yamamoto, K.; Katayama, T. Lacto-N-Biosidase Encoded by a Novel Gene of *Bifidobacterium Longum* Subspecies *Longum* Shows Unique Substrate Specificity and Requires a Designated Chaperone for Its Active Expression. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (35), 25194–25206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484733>.
- (119) Bayón, C.; Cortés, Á.; Berenguer, J.; Hernáiz, M. J. Highly Efficient Enzymatic Synthesis of Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc and Gal $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GlcNAc in Ionic Liquids. *Tetrahedron* **2013**, *69* (24), 4973–4978. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.04.015>.
- (120) Henze, M.; You, D. J.; Kamerke, C.; Hoffmann, N.; Angkawidjaja, C.; Ernst, S.; Pietruszka, J.; Kanaya, S.; Elling, L. Rational Design of a Glycosynthase by the Crystal Structure of  $\beta$ -Galactosidase from *Bacillus Circulans* (BgaC) and Its Use for the Synthesis of N-Acetyllactosamine Type 1 Glycan Structures. *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.003>.
- (121) Li, C.; Kim, Y. W. Characterization of a Galactosynthase Derived from *Bacillus Circulans*  $\beta$ -Galactosidase: Facile Synthesis of D -Lacto- and D -Galacto-N-Bioside. *ChemBioChem* **2014**, *15* (4), 522–526. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300699>.
- (122) Kamerke, C.; Pattky, M.; Huhn, C.; Elling, L. Synthesis of Nucleotide-Activated Disaccharides with Recombinant B3-Galactosidase C from *Bacillus Circulans*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2013**, *89*, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.12.014>.
- (123) Liang, S.; Hammond, G. B.; Xu, B. Hydrogen Bonding: Regulator for Nucleophilic Fluorination. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (71), 17850–17861. <https://doi.org/10.1002/chem.201702664>.
- (124) Uhrig, M. L.; Lantaño, B.; Postigo, A. Synthetic Strategies for Fluorination of Carbohydrates. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (21), 5173–5189. <https://doi.org/10.1039/c9ob00405j>.

- (125) Gerstenberger, M.; Hass, A.; *ethods of Fluorination in Organic Chemistry. Angewandte Chemie International Edition in English* **1981**, 20 (8), 647–667. <https://doi.org/10.1002/anie.198106471>.
- (126) Cheng, Y.; Guo, A.-L.; Guo, D.-S. Recent Progress in Synthesis and Applications of Fluorinated Carbohydrates. *Curr. Org. Chem.* **2010**, 14 (9), 977–999. <https://doi.org/10.2174/138527210791111821>.
- (127) Olah, G. A.; Welch, J. T.; Vankar, Y. D.; Nojima, M.; Kerekes, I.; Olah, J. A. Synthetic Methods and Reactions. 63. Pyridinium Poly(Hydrogen Fluoride)(30% Pyridine-70% Hydrogen Fluoride): A Convenient Reagent for Organic Fluorination Reactions. *J. Org. Chem.* **1979**, 44 (22), 3872–3881. <https://doi.org/10.1021/jo01336a027>.
- (128) Meier, L.; Monteiro, G. C.; Baldissera, R. A. M.; Sá, M. M. Simple Method for Fast Deprotection of Nucleosides by Triethylamine- Catalyzed Methanolysis of Acetates in Aqueous Medium. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 21 (5), 859–866. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000500013>.
- (129) Noguchi, M.; Tanaka, T.; Gyakushi, H.; Kobayashi, A.; Shoda, S. Efficient Synthesis of Sugar Oxazolines from Unprotected N -Acetyl-2-Amino Sugars by Using Chloroformamidinium Reagent in Water Sugar Oxazoline Derivatives Were Directly Synthesized from the Corresponding N -Acetyl-2-Amino Sugars in Aqueous Media by Using. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (8), 2210–2212.
- (130) Noguchi, M.; Fujieda, T.; Huang, W. C.; Ishihara, M.; Kobayashi, A.; Shoda, S. I. A Practical One-Step Synthesis of 1,2-Oxazoline Derivatives from Unprotected Sugars and Its Application to Chemoenzymatic  $\beta$ -N- Acetylglucosaminidation of Disialo-Oligosaccharide. *Helv. Chim. Acta* **2012**, 95 (10), 1928–1936. <https://doi.org/10.1002/hlca.201200414>.
- (131) Rota, P.; La Rocca, P.; Cirillo, F.; Piccoli, M.; Allevi, P.; Anastasia, L. The Acidic Hydrolysis of: N -Acetylneuraminic 4,5-Oxazoline Allows a Direct Functionalization of the C5 Position of Neu5Ac2en (DANA). *RSC Adv.* **2019**, 10 (1), 162–165. <https://doi.org/10.1039/c9ra10215a>.



Anexos

---





## Anexos

### **Anexo 1: Rediseño de los subsitios negativos de LnbB para la síntesis de LNT.**

- A.1.1-** Seguimiento de la reacción de hidrólisis de los mutantes simples de LnbB.
- A.1.2-** Caracterización de la reacción TG de los mutantes simples de LnbB: monitorización de los productos de reacción (LNB-pNP, LNB y LNY) mediante HPLC-MS.
- A.1.3-** Seguimiento de la reacción de hidrólisis de los mutantes dobles de LnbB.
- A.1.4-** Caracterización de la reacción TG de los mutantes dobles de LnbB: monitorización de los productos de reacción (LNB-pNP, LNB y LNY) mediante HPLC-MS.
- A.1.5-** Seguimiento de la reacción de hidrólisis de los mutantes del residuo Trp394 de LnbB.
- A.1.6-** Caracterización de la reacción TG de los mutantes del residuo Trp394 de LnbB: monitorización de los productos de reacción (LNB-pNP, LNB y LNY) mediante HPLC-MS.
- A.1.7-** Exploración de la reacción TG a diferentes pHs del mutante W394F LnbB: monitorización de los productos de reacción (LNB-pNP, LNB y LNY) mediante HPLC-MS.
- A.1.8-** Seguimiento de la reacción de los mejores biocatalizadores de LnbB frente a una concentración fija de dador (250  $\mu$ M LNB-pNP) frente a diferentes concentraciones de aceptor (0-600 mM lactosa).

### **Anexo 2: Exploración de los subsitios positivos de LnbB**

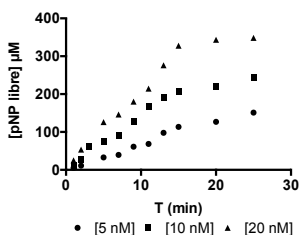
- A.2.1.** Evolución de la reacción de hidrólisis para los mutantes simples de LnbB. Se realizan reacciones empleando 3 concentraciones de enzima para determinar su  $V_o$  y así calcular la actividad específica de las variantes.
- A.2.2.** Monitorización de los compuestos resultantes de la reacción TG para los mutantes de los subsitios positivos de LnbB. En los gráficos se muestran las concentraciones de LNB-pNP; LNB y LNT determinadas mediante monitorización por HPLC-MS.
- A.2.3.** Seguimiento de la reacción de los mutantes transglucosídicos de los subsitios positivos de LnbB frente a una concentración fija de dador (250  $\mu$ M LNB-pNP) frente a diferentes concentraciones de aceptor (0-600 mM lactosa).

### **Anexo 3: Exploración de la síntesis secuencial de LNT**

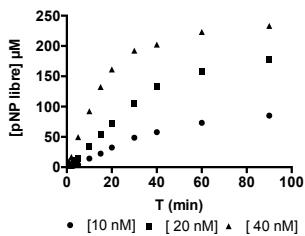
- A.3.1.** Evolución de la reacción de hidrólisis de las enzimas BgaC WT y BgaC E233G. Se realizan reacciones empleando 3 concentraciones de enzima para determinar su  $V_o$  y así calcular la actividad específica de las variantes.

**A.1.1.** Evolución de la reacción de hidrólisis para los mutantes simples de LnbB. Se realizan reacciones empleando 3 concentraciones de enzima para determinar su  $V_o$  y así calcular la actividad específica de las variantes.

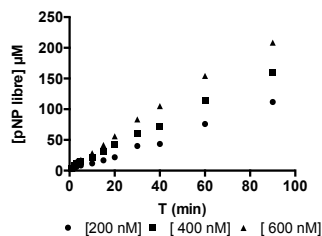
**a) LnbB wt**



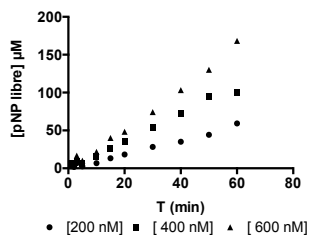
**b) LnbB W373F**



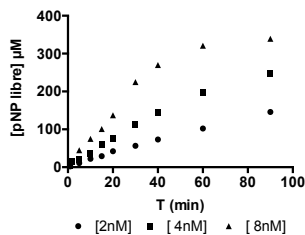
**c) LnbB W394F**



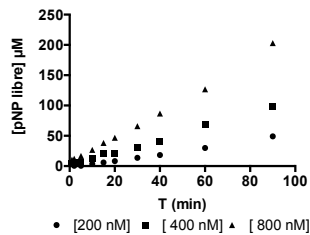
**d) LnbB Y419F**



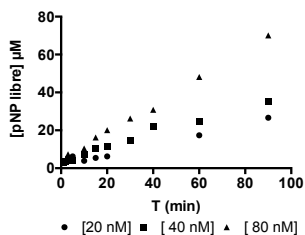
**e) LnbB Y427F**



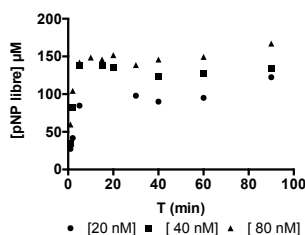
**f) LnbB W465F**



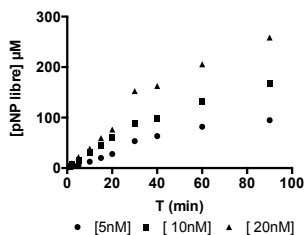
**g) LnbB Q190L**



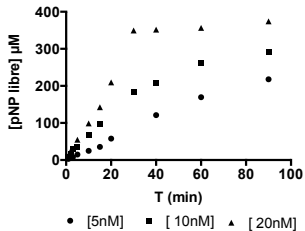
**h) LnbB Q190H**



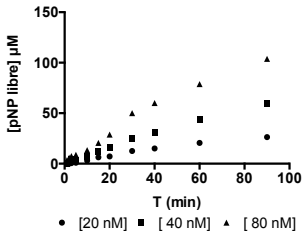
**i) LnbB E216A**



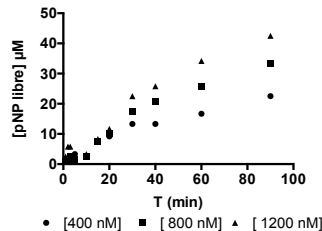
**j) LnbB E216D**



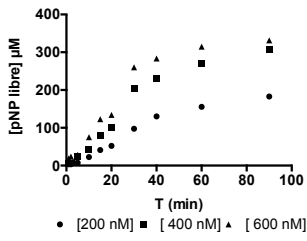
**k) LnbB N259A**



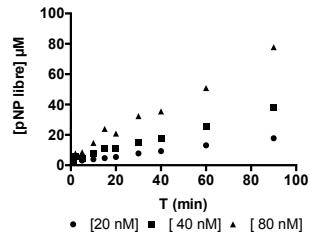
**l) LnbB N259Q**



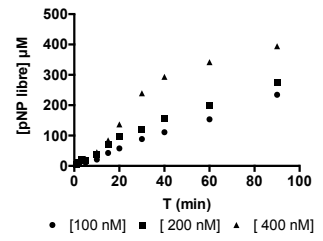
**m) LnbB H263R**



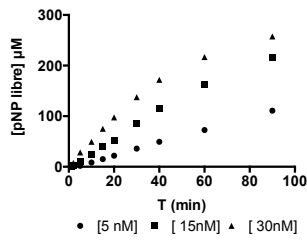
**n) LnbB H263A**



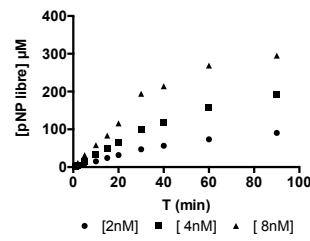
**o) LnbB D467A**



**p) LnbB D467E**

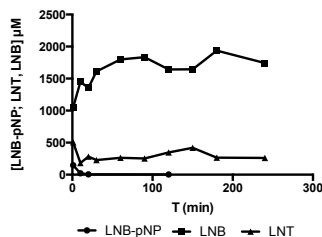


**q) LnbB L574V**

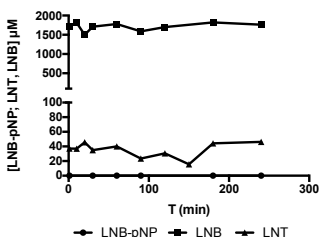


A.1.2. Monitorización de los compuestos resultantes de la reacción de TG para los mutantes simples de LnbB. En los gráficos se muestran las concentraciones de LNB-pNP; LNB y LNT determinadas mediante monitorización por HPLC-MS.

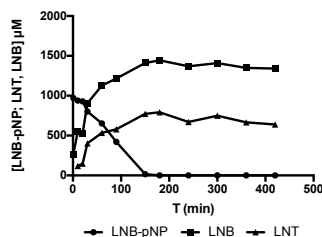
a) LnbB Q190L



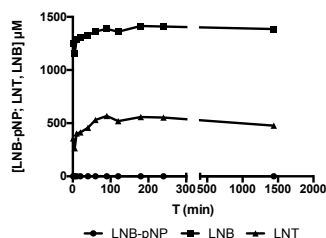
b) LnbB Q190H



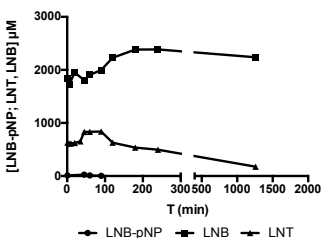
c) LnbB H263A



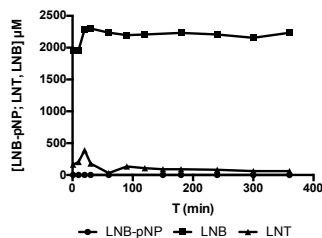
d) LnbB H263R



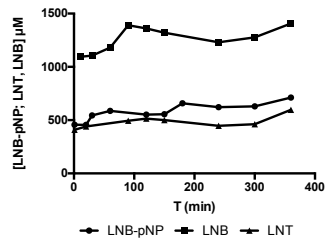
e) LnbB W394F



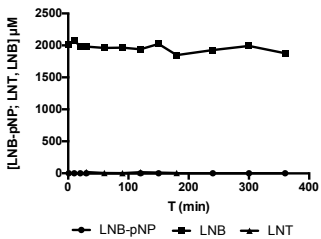
f) LnbB N259A



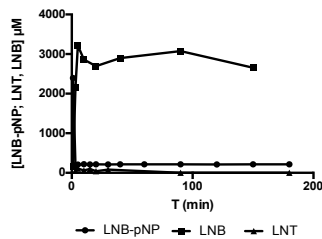
g) LnbB N259Q



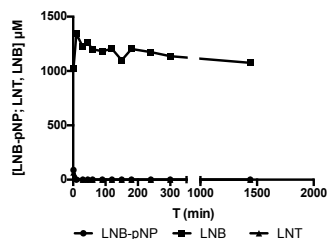
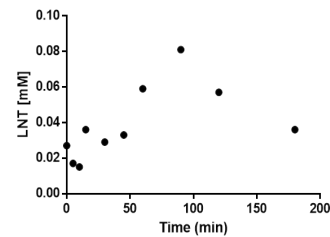
h) LnbB D467A



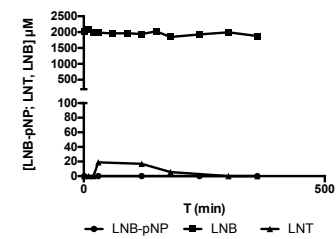
i) LnbB D467E



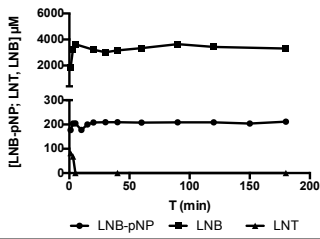
k) LnbB Y419F



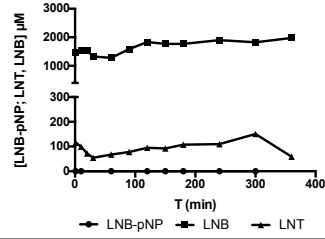
l) LnbB W373F



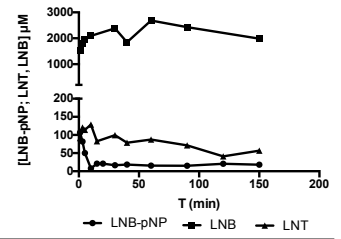
**m) LnbB Y427F**



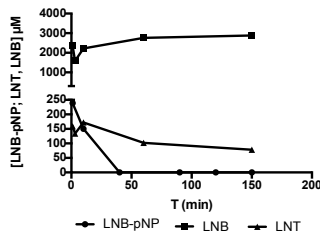
**n) LnbB W465F**



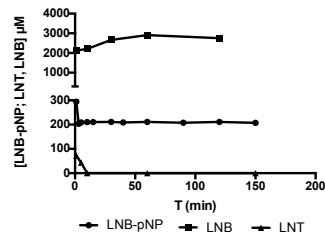
**o) LnbB E216D**



**o) LnbB E216A**

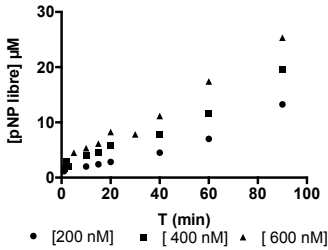


**o) LnbB L574V**

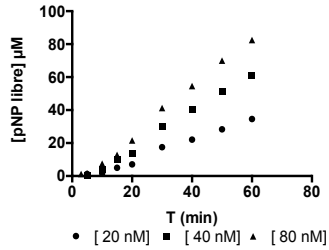


**A.1.3.** Evolución de la reacción de hidrólisis para los mutantes dobles de LnbB. Se realizan reacciones empleando 3 concentraciones de enzima para determinar su  $V_o$  y así calcular la actividad específica de las variantes.

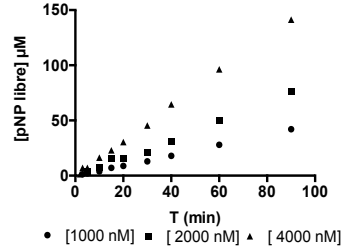
**a) LnbB W394F\_Y419F**



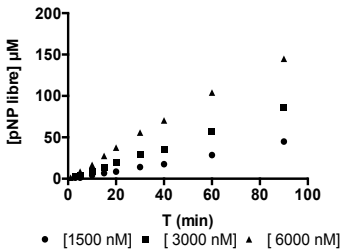
**b) LnbB W394F\_H263A**



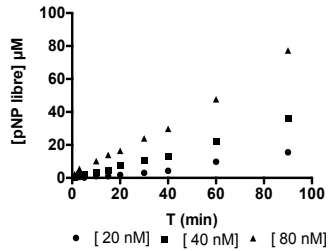
**c) LnbB W394F\_N259A**



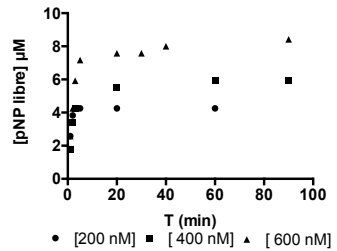
**d) LnbB W394F\_N259Q**



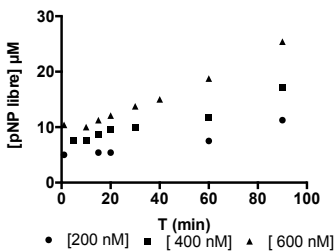
**e) LnbB Q190L\_Y419F**



**f) LnbB H263A\_Y419F**

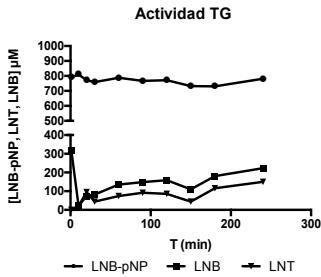


**g) LnbB H263R\_Y419F**

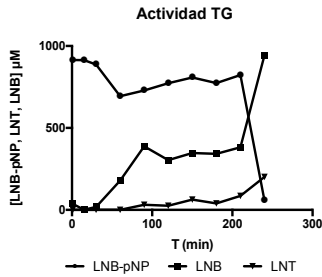


A.1.4. Monitorización de los compuestos resultantes de la reacción TG de los mutantes dobles de LnbB. En los gráficos se muestran las concentraciones de LNB-pNP; LNB y LNT determinadas mediante monitorización por HPLC-MS.

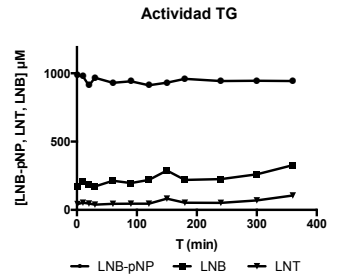
a) LnbB W394F\_Y419F



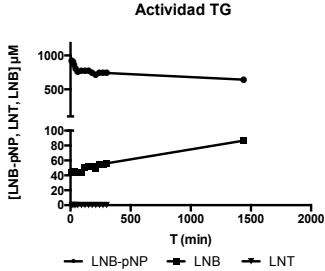
b) LnbB W394F\_H263A



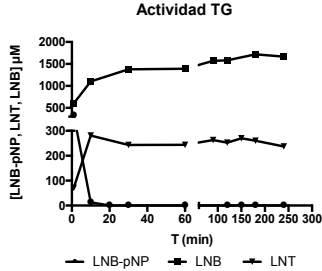
c) LnbB W394F\_N259A



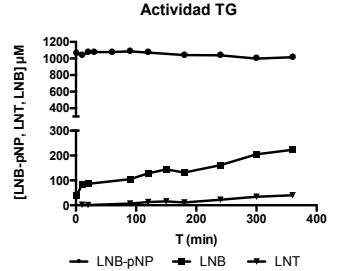
d) LnbB W394F\_N259Q



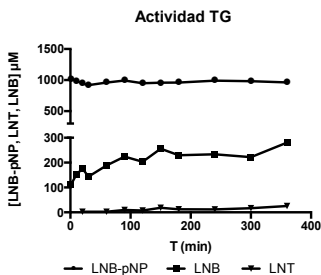
e) LnbB Q190L\_Y419F



f) LnbB H263A\_Y419F



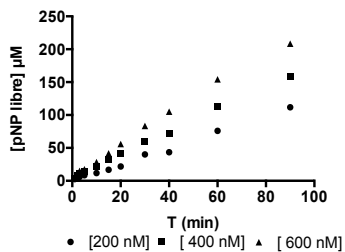
g) LnbB H263R\_Y419F



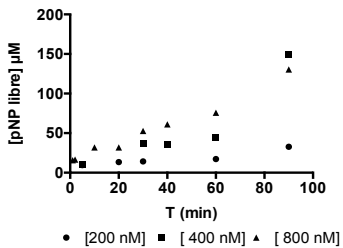


**A.1.5.** Evolución de la reacción de hidrólisis para los mutantes del residuo Trp394 de LnbB. Se realizan reacciones empleando 3 concentraciones de enzima para determinar su  $V_o$  y así calcular la actividad específica de las variantes.

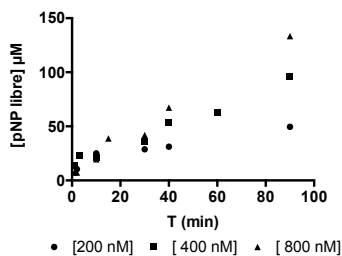
**a) LnbB W394F**



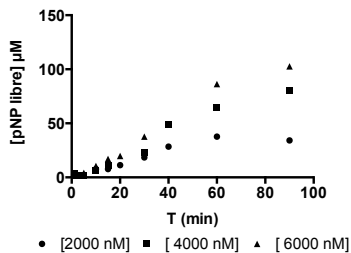
**b) LnbB W394A**



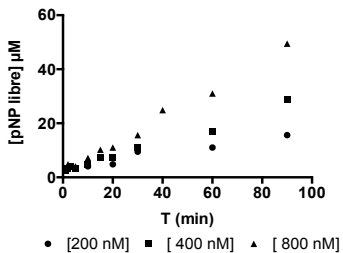
**c) LnbB W394E**



**d) LnbB W394K**

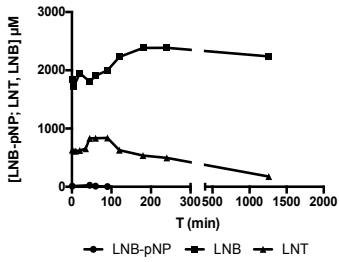


**e) LnbB W394Q**

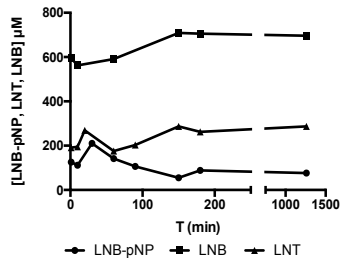


**A.1.6.** Monitorización de los compuestos resultantes de la reacción de TG de los mutantes del residuo Trp394 de LnbB. En los gráficos se muestran las concentraciones de LNB-pNP; LNB y LNT determinadas mediante monitorización por HPLC-MS.

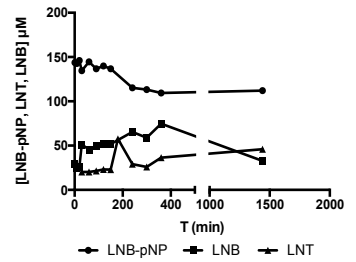
**a) LnbB W394F**



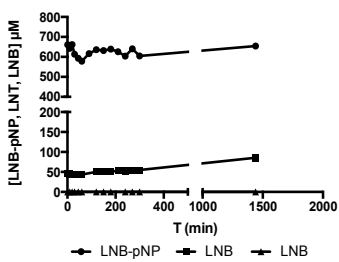
**b) LnbB W394A**



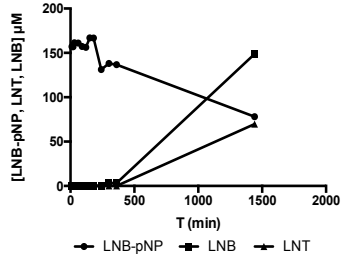
**c) LnbB W394E**



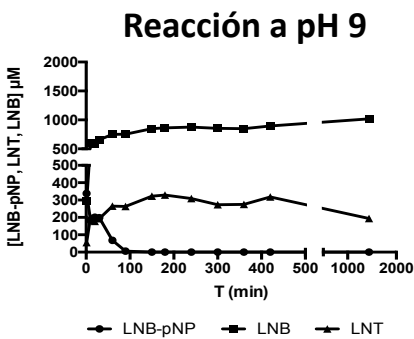
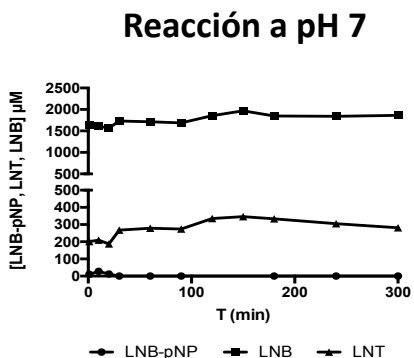
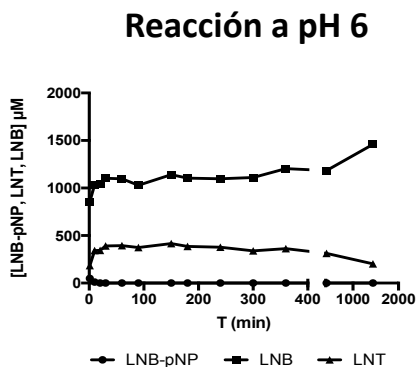
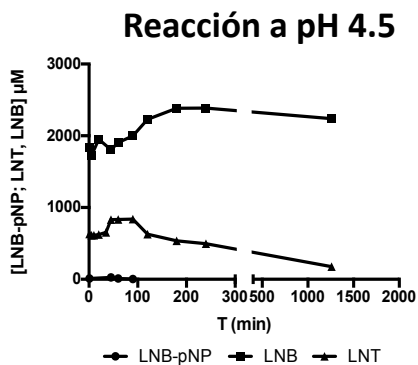
**d) LnbB W394K**



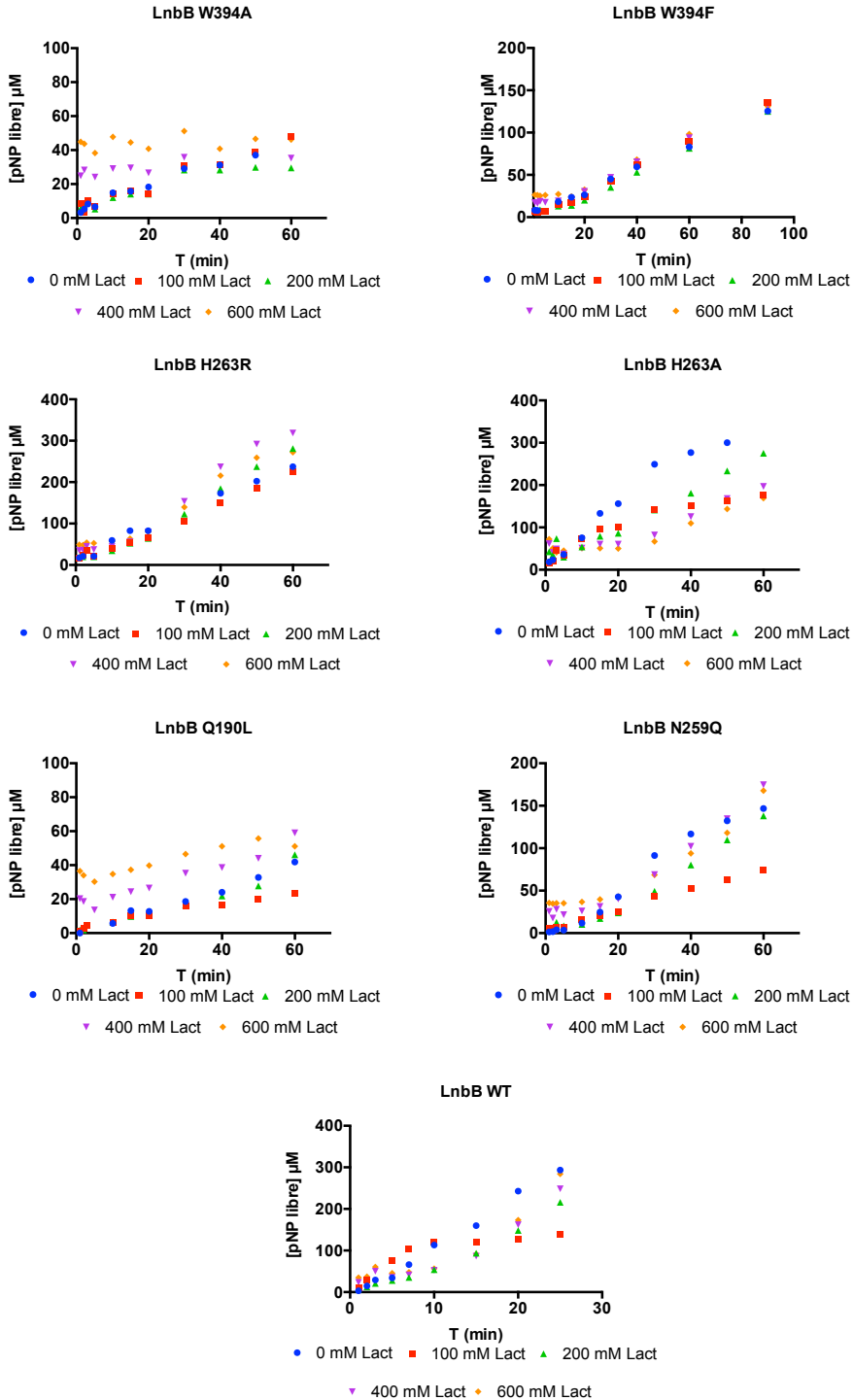
**e) LnbB W394Q**



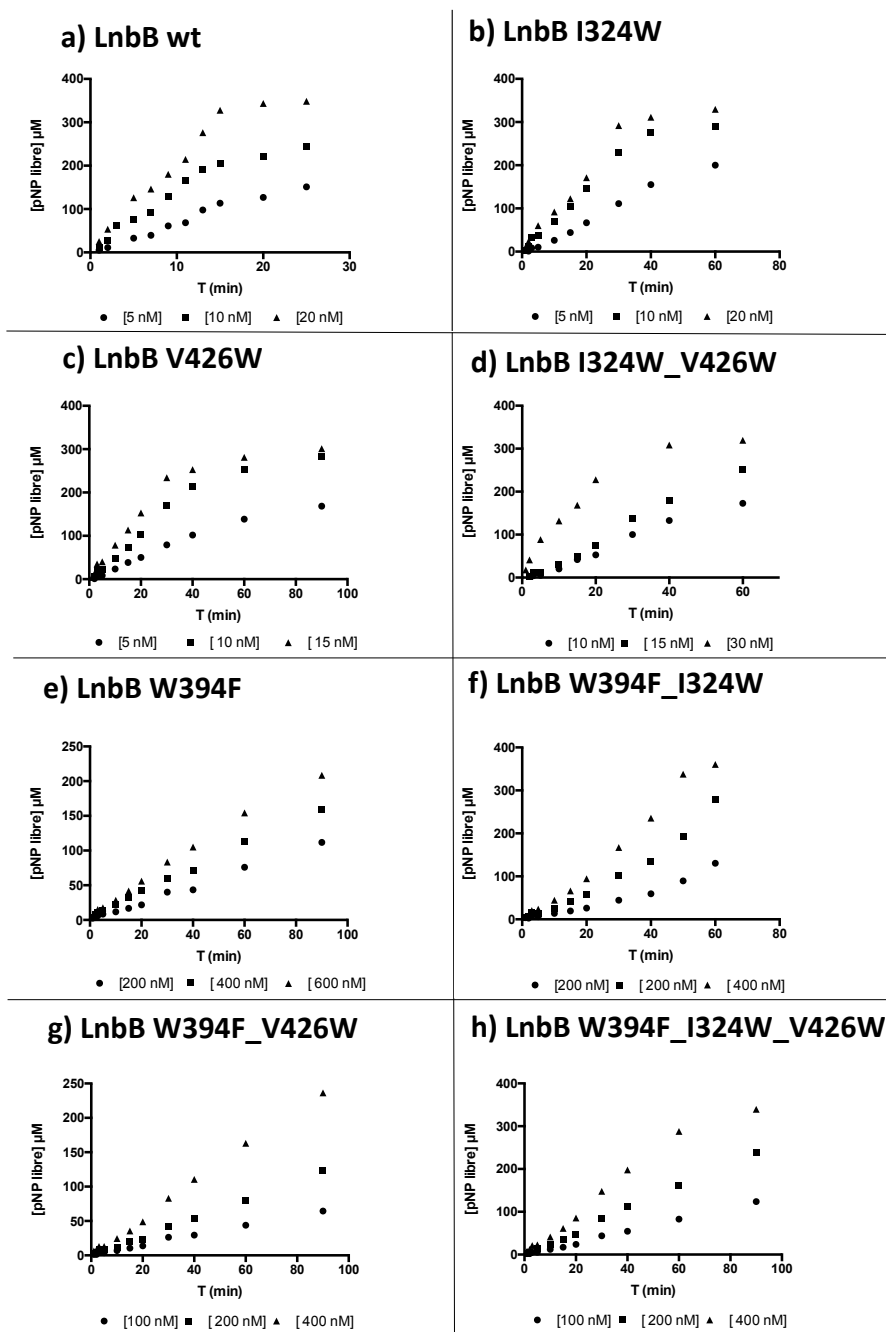
A.1.7. Exploración de la reacción TG del mutante W394F a pH 4.5, 6, 7 y 9. En los gráficos se muestran las concentraciones de LNB-pNP; LNB y LNT determinadas mediante monitorización por HPLC-MS.



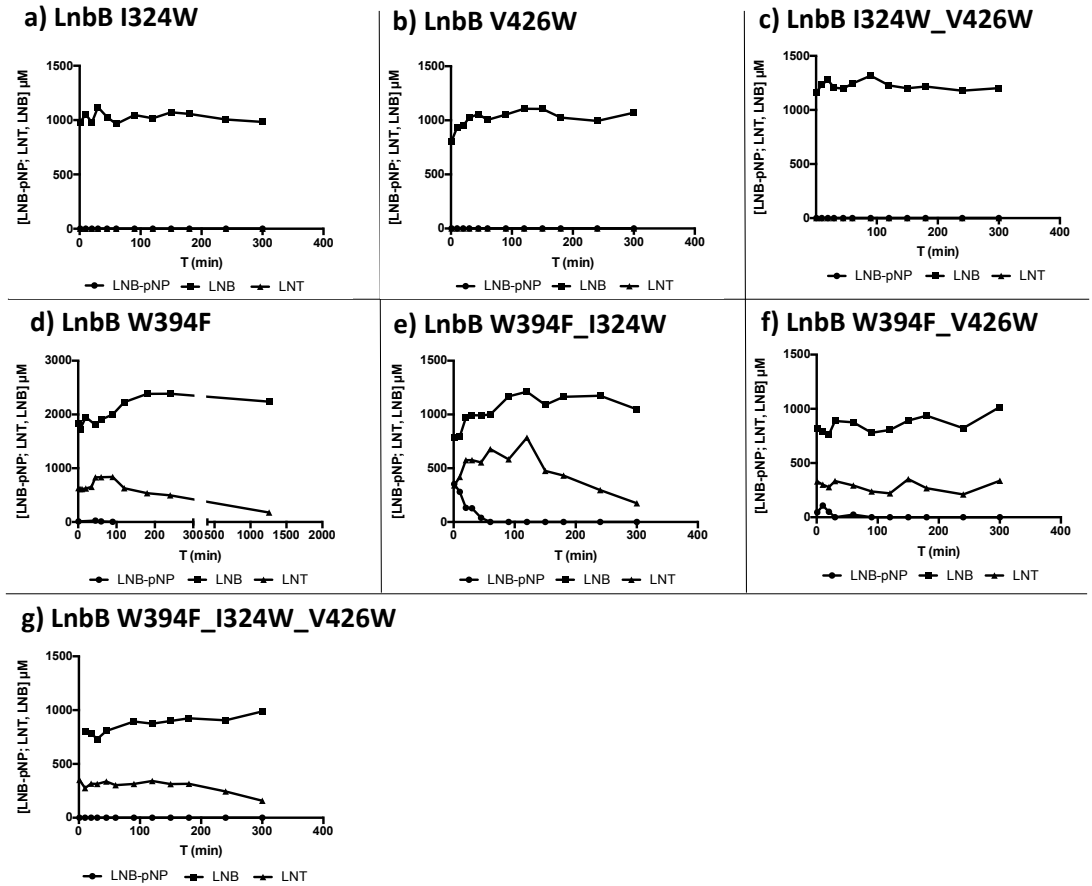
**A.1.8.** Seguimiento de la reacción de los mejores biocatalizadores de LnbB frente a una concentración fija de dador (250  $\mu\text{M}$  LNB-pNP) frente a diferentes concentraciones de aceptor (0-600 mM lactosa).



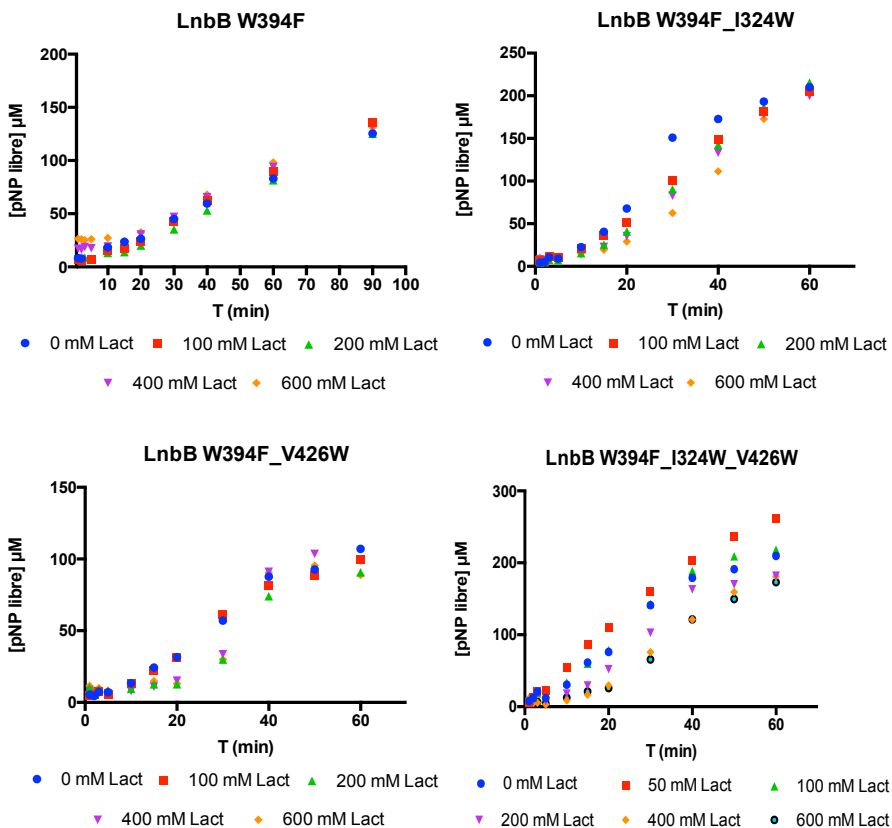
**A.2.1.** Evolución de la reacción de hidrólisis para los mutantes de los subsitios positivos de LnbB. Se realizan reacciones empleando 3 concentraciones de enzima para determinar su  $V_0$  y así calcular la actividad específica de las variantes.



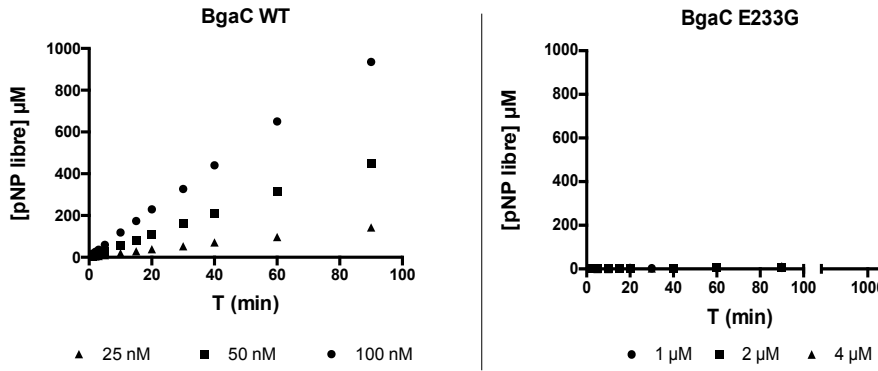
A.2.2. Monitorización de los compuestos resultantes de la reacción TG para los mutantes de los subsitios positivos de LnbB. En los gráficos se muestran las concentraciones de LNB-pNP; LNB y LNT determinadas mediante monitorización por HPLC-MS.



**A.2.3.** Seguimiento de la reacción de los mutantes más transglucosídicos de los subsitios positivos de LnbB frente a una concentración fija de dador (250  $\mu$ M LNB-pNP) frente a diferentes concentraciones de aceptor (0-600 mM lactosa).



**A.3.1.** Evolución de la reacción de hidrólisis de las enzimas BgaC WT y BgaC E233G. Se realizan reacciones empleando 3 concentraciones de enzima para determinar su  $V_o$  y así calcular la actividad específica de las variantes.





## Publicaciones



Contents lists available at ScienceDirect

## Biotechnology Advances

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biotechadv](http://www.elsevier.com/locate/biotechadv)

Research review paper

# Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides

Magda Faijes<sup>\*</sup>, Mireia Castejón-Vilatersana, Cristina Val-Cid, Antoni Planas<sup>\*</sup>

Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, University Ramon Llull, 08017 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Keywords:

HMO  
Enzymatic synthesis  
Metabolic engineering  
Human milk  
Oligosaccharides  
Glycosyltransferases

## ABSTRACT

Infant formula milk companies try to develop fortified formula milk that mimics human milk as closely as possible, since it is well-known that breast milk has considerable implications in the development of the infant in the first years of life. Human milk is unique in terms of complex oligosaccharides content, known as human milk oligosaccharides (HMOs). Their role in the development of intestinal flora blocking the attachment of pathogens and modulating the immune system of the infant are currently recognized. Due to these biological effects, there is a great interest to introduce the main HMOs in the infant formula milk. Therefore, efficient synthetic strategies for HMOs production are required. Here we present a complete review of HMO production using either (chemo) enzymatic syntheses or cell factory approaches, focusing on the strategies that produce HMOs at least at the milligram scale. 42 HMO structures have already been produced as free sugars. Whereas short HMOs are well obtained by cell factory approaches, complex and branched HMOs are better produced by chemoenzymatic strategies. In spite of the current advances, production strategies of some biologically relevant HMOs are still missing.

## 1. Introduction

Infant formula milk tries to mimic human milk as closely as possible since breast milk is important in the development of the infant gut microbiota and the immune system in the first years of life. Human milk is defined as a very complex mixture with a dynamic composition that varies within a feeding, diurnally, throughout the lactation period, and between mothers and populations. In general, human milk consists of essential nutrients such as lactose, fatty acids and proteins, micro-nutrients such as nucleotides, vitamins and minerals, and a wide variety of bioactive molecules, including immunoglobulins, antimicrobial agents such as lactoferrin and lysozyme, and human milk glycoconjugates (Garrido et al., 2013; Meredith-Dennis et al., 2017; Smilowitz et al., 2014). Glycans in milk are present as free human milk oligosaccharides (HMOs) or conjugated to peptides, proteins or lipids. In addition to lactose, the major glycans in milk are HMOs, representing 1% of the total human milk mass and the third largest solid component of human milk, after lactose and lipids. HMOs are exclusively synthesized in the mammary glands, and only during lactation. The

oligosaccharide composition varies between women and throughout the lactation period, with levels of > 20 g/L in colostrum and 5–14 g/L in mature milk (Bode, 2012; Coppa et al., 1999; Kunz et al., 2000). HMOs are considered unique among other mammalian oligosaccharides with regard to the quantity and the structural complexity present in milk (Garrido et al., 2012; Kunz et al., 2000; Urashima et al., 2012).

Interest in breast milk benefits started at the beginning of the 20th century, when infant mortality rates were as high as 30% in the first year of the infants' life; however, breastfed infants exhibited a 7-fold greater survival rate than formula-fed infants (Kunz, 2012). Since the initiation of HMO research (Egge et al., 1983; Escherich, 1886; György et al., 1954; Kuhn et al., 1956; Montreuil, 1956; Polonovski and Montreuil, 1954; Schönfeld, 1926), these oligosaccharides have been reported to exert a prebiotic effect. However, striking evidence also suggests a wide spectrum of health benefits for neonates, such as prevention of pathogen adhesion, direct effects on epithelial cells and systemic effects (Rudloff et al., 2014) (Fig. 1). In contrast to lactose, HMOs have no nutritional value for humans. HMOs tolerate the acidic conditions of the upper gastrointestinal tract and are not hydrolyzed in

**Abbreviations:** oNP-Gal, o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside; pNP-Gal, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside; GNB, galacto-N-biose; LNB, lacto-N-biose; Lac, lactose; LacNAc, N-acetyllactosamine; Fru, fructose; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid; Glc-1-P,  $\alpha$ -glucose 1-phosphate; Gal-1-P,  $\alpha$ -galactose 1-phosphate; UDP-Glc, UDP- $\alpha$ -D-glucose; UDP-Gal, UDP- $\alpha$ -D-galactose; UDP-GlcNAc, UDP- $\alpha$ -D-N-acetylglucosamine; GDP-Fuc, GDP- $\beta$ -L-fucose; GDP-Man, GDP- $\alpha$ -D-mannose; CMP-NeuAc, CMP- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid

<sup>\*</sup> Corresponding authors.

E-mail addresses: [magda.faijes@iqs.edu](mailto:magda.faijes@iqs.edu) (M. Faijes), [antoni.planas@iqs.edu](mailto:antoni.planas@iqs.edu) (A. Planas).

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.014>

Received 12 November 2018; Received in revised form 22 February 2019; Accepted 23 March 2019

Available online 29 March 2019

0734-9750/© 2019 Published by Elsevier Inc.

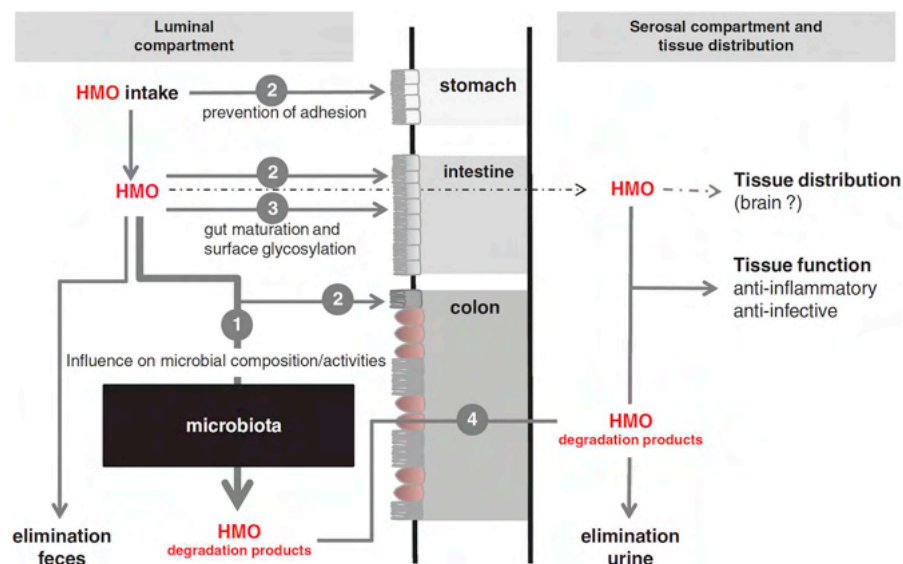


Fig. 1. Overview of HMO metabolism and potential functions in breast-fed infants. Numbers 1 to 4 indicate specific functions, i.e., (1) influence on the microbiota composition and/or activity, (2) prevention of pathogen adhesion, (3) direct effects on epithelial cells and (4) systemic effects. Reproduced from Kunz et al., 2014 with permission (Kunz et al., 2014).

the intestine due to the lack of locally expressed glycosidases. HMOs reach the distal small intestine and colon in an intact form and are excreted in infants' feces (Engfer et al., 2000). Some of the *Bifidobacterium* strains present in the colon are able to metabolize HMOs using, for example, the specific galacto-N-biose/lacto-N-biose (GNB/LNB) pathway, and consequently, lactobacilli and bifidobacteria represent up to 90% of the total gut flora in breastfed infants but only represent 40–60% in formula-fed infants (Asakuma et al., 2011; Bode, 2006; Bunesova et al., 2016; Cantarel et al., 2009; De Bruyn et al., 2013; Fuhrer et al., 2010; Fushinobu, 2010; Garrido et al., 2016; Hidaka et al., 2009; James et al., 2016; Kitaoka et al., 2005; Marcobal et al., 2010; Miwa et al., 2010; Sakurama et al., 2013; Sela et al., 2008; Smilowitz et al., 2014; Varki et al., 2015; Wada et al., 2008a; Yamada et al., 2017; Yu et al., 2013) (Fig. 2). In this sense, supplementing the diet with HMOs also shapes the adult gut microbiota and promotes the growth of beneficial bifidobacteria (Elison et al., 2016). Moreover, HMOs have been reported to function as innate anti-adhesion agents that protect the breast-fed child by preventing pathogen attachment, decreasing the risk of infections of the gastrointestinal, urogenital and respiratory tracts caused by species such as *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus pneumoniae*, respectively, and even protecting from human immunodeficiency virus (HIV) mother-to-child transmission (Albrecht et al., 2014; Andersson et al., 1986; Bode, 2012, 2015; Coppa et al., 2006; He et al., 2016; Jantscher-Krenn et al., 2012a; Martín-Sosa et al., 2002; Morrow et al., 2005; Ruiz-Palacios et al., 2003). For more details on protection against viruses, see the recent review by Morozov et al. (2018).

In addition, at least some ingested HMOs are absorbed in an intact form into the circulation and excreted in the urine. The relative fractions of absorbed HMOs are low, but these levels have been shown to exert biological effects on cultured cells (Goehring et al., 2014; Martín-Sosa et al., 2002), including modulation of intestinal epithelial cells by affecting the expression of genes that influence cell surface glycosylation events and other cell responses (Albrecht et al., 2014; Angeloni et al., 2005; Bode, 2012, 2015; Kuntz et al., 2008, 2009) and modulation of immune responses that affect leukocyte adhesion, interaction of platelets with neutrophils (Bode et al., 2004), macrophage activity and

inflammatory processes. Notably, HMOs protect against necrotizing enterocolitis (NEC), where damage to the epithelial tissues of the small or large intestine leads to mucosal or even deeper intestinal necrosis. Breastfed infants exhibit an up to a 10-fold lower risk of developing NEC than formula-fed infants. Improper establishment of the neonatal gastrointestinal microbiota has been implicated as one of several factors contributing to NEC (Hoeflinger et al., 2015), and studies in rat models showed that sialylated HMOs protect against this disease (Jantscher-Krenn et al., 2012b; Yu et al., 2014).

Finally, HMOs provide potential essential nutrients required for brain development and cognition, particularly the sialyl and galactosyl moieties that are present in high amounts in the brain as sialic acid-containing gangliosides and galactocerebrosides (Bode, 2012; Kunz et al., 2000; Wang, 2009; Wang and Huang, 2009). Additionally, 2'-fucosyllactose has been shown to contribute to cognitive abilities (Vázquez et al., 2015).

## 2. Structures of HMOs

The unique and complex mixture of HMOs consists of a pool of soluble oligosaccharides with different degrees of polymerization that is composed of five monosaccharides: glucose (Glc), galactose (Gal), *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), fucose (Fuc) and sialic acid, with the predominant form of *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac).

All HMOs are characterized by a lactose at their reducing ends. Lactose can be fucosylated or sialylated to produce human milk trisaccharides, such as 2'/3-fucosyllactose or 3'/6'-sialyllactose, or can be further elongated with lacto-N-biose (LNB, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc) or *N*-acetyllactosamine (LacNAc, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) through  $\beta$ 1,3 and  $\beta$ 1,6 linkages to produce the building blocks of the HMO structures. They are classified from tetra to decaose core structures and at least 13 core structures have been identified (Table 1) (Kobata, 2010; Urashima et al., 2013). The first two core structures are the tetrasaccharides lacto-N-tetraose (LNT, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) core type 1 and lacto-N-neotetraose (LNnT, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) core type 2 (Bode, 2012; Garrido et al., 2013; Kobata, 2010; Kunz et al., 2000). Side chains are introduced at  $\beta$ 1,6 linkages, and branched oligosaccharides

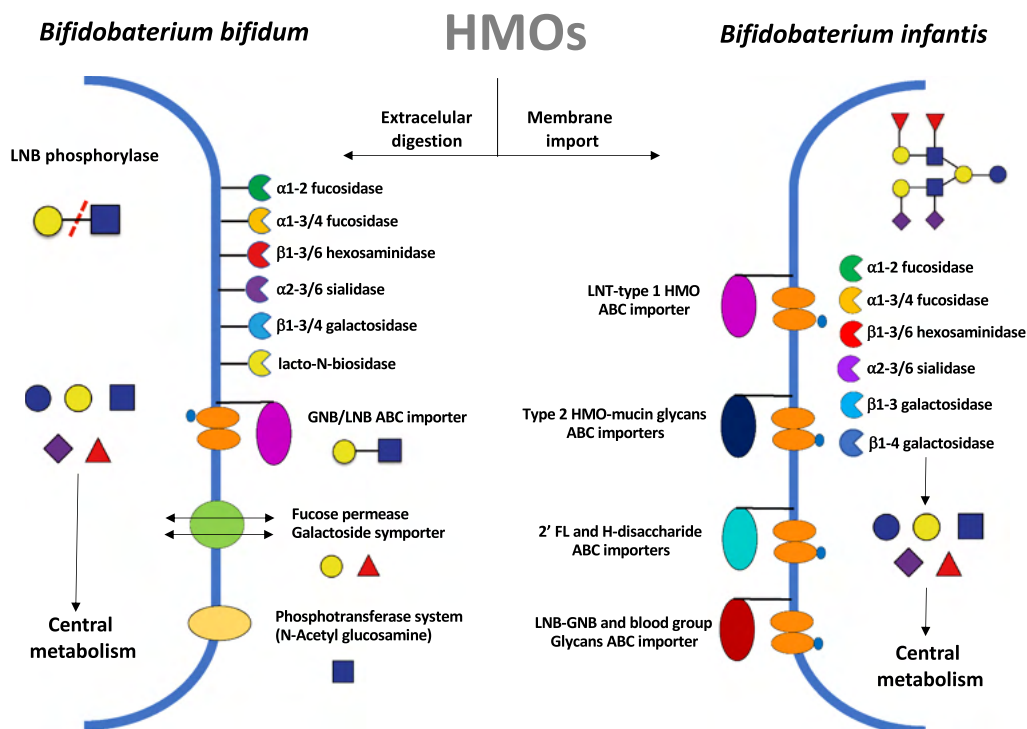


Fig. 2. Different strategies for HMO consumption by bifidobacteria through the LNB/GNB pathway. Extra- and intracellular glycosidases and specific transporters are indicated. Abbreviations: GNB, galacto-N-biose, LNB, lacto-N-biose. Garrido et al. (2012).

are designated as *iso*-HMO, whereas the linear structures are named *para*-HMO (Table 1).

These backbone structures can be modified with Fuc residues at the  $\alpha$ 1,2 position to terminal Gal residues, at the  $\alpha$ 1,3 position to the Glc unit at the reducing end, at the  $\alpha$ 1,3 or  $\alpha$ 1,4 positions to the GlcNAc moieties, or with Neu5Ac at  $\alpha$ 2,3 or  $\alpha$ 2,6 linkages (Table 2). Therefore, HMOs are classified as fucosylated, sialylated or acidic oligosaccharides, as well as non-fucosylated neutral oligosaccharides.

The heterogeneity of fucosylated oligosaccharides strongly depends on the expression of specific fucosyltransferases that are correlated with the mother's Lewis blood group and secretor status (Kobata, 2003). The Le and Se genes encode the active  $\alpha$ 1,2 and  $\alpha$ 1,3/4-fucosyltransferases (FUT2 and FUT3), respectively, from at least 1 functional allele (Table 3). Therefore, women with a  $Se^+Le^+$  phenotype have the capacity to make all possible Lewis structures. In contrast, women with the  $Se^-Le^-$  phenotype can not (Blank et al., 2012; Bode and Jantscher-krenn, 2012; Jantscher-krenn et al., 2012b; Kobata, 2003; Kunz et al., 2000), the nonsecretors lack a functional FUT2 enzyme and they do not produce  $\alpha$ 1,2-fucosylated HMOs, and the Le-negative women the specific  $\alpha$ 1,3/4-fucosylated HMOs. In terms of sialylation, variations among individuals may be due to the differential expression and regulation of sialyltransferases rather than an all-or-nothing expression system (Bode and Jantscher-krenn, 2012; Tsuchida et al., 2003).

The biosynthesis of HMOs is suggested to be an extension of lactose synthesis in the Golgi, where the complex lactose synthase machinery is located and further elongation steps are performed, although the process is not fully understood due to the highly variable concentrations and compositions of HMOs in human milk (Fig. 3) (Bode et al., 2004; Castanyes-Muñoz et al., 2013; Kobata, 2010; Kobata, 2003; Urashima et al., 2012). In addition to HMO variations among women, differences have also been observed during different periods of lactation in the

same individual (Kunz et al., 2000; Urashima et al., 2013). Furthermore, women delivering preterm have much wider variations (both between women and for a given woman over time) in the percentage of HMOs that contain fucose or sialic acid than women who deliver at term (Underwood et al., 2015).

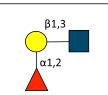
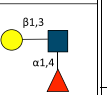
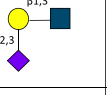
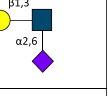
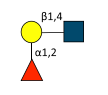
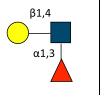
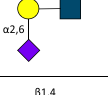
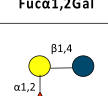
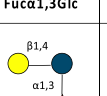

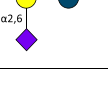
In a pooled human milk sample, more than 200 different HMOs have been identified to date and among them, approximately 100 structures that have been completely elucidated (Chen, 2015; Kobata, 2010; Urashima et al., 2012). These HMOs are grouped according to the core structures, but a few are unable to be classified into these groups. These HMOs are present in urine or feces of breast milk-fed infants and their origin is unclear since they may have been altered in the gut lumen by gut microbial enzymes. Correlations between milk, urine and fecal HMOs provide striking information about the absorption from the gut into the bloodstream, excretion and influence on the intestinal microbiota (Underwood et al., 2015). Some structures that are not yet well characterized are named with general numeric labels (for example, 4120 meaning 4 hexoses, 1 fucose and *N*-acetylhexosamine residues and no sialic acid residues).

Despite the diversity of HMO structures, up to 50 structures with degrees of polymerization ranging between 3 and 14 represent 99% of the oligosaccharide abundance (Gabrielli et al., 2011; Smilowitz et al., 2014). Type 1 oligosaccharides containing the LNT structure predominate over type 2 oligosaccharides with the LNnT structure, which is a human-specific feature. The proportions of fucosylated, sialylated, and nonfucosylated neutral HMOs in term breast milk are approximately 35–50%, 12–14%, and 42–55%, respectively (Hong et al., 2014; Ninonuevo and Bode, 2008). In contrast, complex oligosaccharide concentrations in other mammals are 100–1000 times lower than in human milk, with type 2 oligosaccharides being the most predominant or the only types detected, whereas fucosylated oligosaccharides are

**Table 1**  
The 13 core structures that occur in HMO.

Abbreviation	Name	Structure
Lac	Lactose	Gal(β1-4)Glc
LNT	Lacto-N-tetraose	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
LNnT	Lacto-N-neotetraose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
LNH	Lacto-N-hexaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)
LNnH	Lacto-N-neohexaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)
pLNH	para-Lacto-N-hexaose	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
pLNnH	para-Lacto-N-neohexaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
LNO	Lacto-N-octaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)
LNnO	Lacto-N-neooctaose	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)
iLNO	iso-Lacto-N-octaose	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)
pLNO	para-Lacto-N-octaose	Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
pLNnO	para-Lacto-N-octaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc
LND	Lacto-N-decaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)
LNnD	Lacto-N-neodecaose	Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)Gal(β1-4)Glc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)

**Table 2**  
Fucosidic and sialic acid linkages in HMO. Glycan structures are depicted according to the recommendations of the Consortium of Functional Glycomics.

A)	Fuca1,2Gal	Fuca1,3GlcNAc	Fuca1,4GlcNAc	B)	Neu5Aca2,3Gal	Neu5Aca2,6Gal	Neu5Aca2,6GlcNAc
<b>Type I</b>				<b>Type I</b>			
<b>Type II</b>				<b>Type II</b>			
<b>Lactose</b>				<b>Lactose</b>			

**Table 3**

The Lewis and Secretor gene-related groups of HMOs. The Le and Se epitopes, which are characteristic for the Le phenotype in red blood cells and in human milk, are synthesized by the listed fucosyltransferases (FUT). The Le and Se genes encode the active FUT in presence of at least 1 functional allele (heterozygous with  $Le^+ Se^-$  or  $Se^+ Se^-$ , homozygous with  $Le^+ Le^+$  or  $Se^+ Se^+$ ). The prevalence of the Le phenotypes is conferred to Europeans.

Group	FucT type	Type 1 (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc)	Type 2 (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc)
Secretor, Lewis positive ( $Se^+$ , $Le^+$ )	$\alpha$ 1,2-FucT $\alpha$ 1,3/4-FucT		
Nonsecretor, Lewis positive ( $Se^-$ , $Le^+$ )	$\alpha$ 1,3/4-FucT		
Secretor, Lewis negative ( $Se^+$ , $Le^-$ )	$\alpha$ 1,2-FucT		
Nonsecretor, Lewis negative ( $Se^-$ , $Le^-$ )	-		

rare and sialylated oligosaccharides are abundant and contain two forms of sialic acid, *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) (Boehm and Stahl, 2007; Kunz et al., 2000; Kunz et al., 1999; Ninonuevo et al., 2006; Urashima et al., 2012, 2013, 2014, 2015). In bovine milk, only traces of oligosaccharides have been detected (0.05 g/L compared to the 12–13 g/L in mature human milk), with approximately 1% fucosylated and 70% sialylated oligosaccharides and sialylactose as the major components detected in cow milk (Kunz et al., 2000). Goat milk oligosaccharides are present in higher amounts and acidic oligosaccharides, such as sialyl and disialyllactose, and neutral oligosaccharide, such as galactosyllactose and *N*-acetylglucosaminylactose, are the major forms (Martinez-Perez et al., 2006). For more details on the milk oligosaccharide composition in domestic animals, see Albrecht et al. (2014).

Considering the biological variation between samples and the different quantification techniques, the range of HMO concentrations reported in different studies is summarized in Tables 4 and 5 (and recently reviewed in Thurl et al. (2017)). Among these complex oligosaccharides, the major HMOs include lacto-*N*-tetraose (LNT), lacto-*N*-neotetraose (LNnT), fucosylated lacto-*N*-tetraoses such as lacto-*N*-fucopentaoses (LNFP I and II), lacto-*N*-neofucopentaose (LNFP III), the difucosyl derivative LNDFH I, and fucosylated lacto-*N*-hexaose derivatives such as F-LNH I, F-LNH II, DF-LNH II and TF-LNH, in addition to the trisaccharides 2'-fucosyllactose (2'FL) and 3-fucosyllactose (3FL) (Table 4). Finally, sialyl-lacto-*N*-neotetraose (LST c), disialyl-lacto-*N*-tetraose (DSLNT), 3'-sialyllactose (3'SL), 6'-sialyllactose (6'SL) and fucosyl-, sialyl-lacto-*N*-neotetraose (FS-LNnH I) are the most abundant acidic HMOs, although their concentrations are less than 1 g/L (Kunz et al., 2000; Urashima et al., 2012) (Table 5).

The relevant biological effects assigned to HMOs have made them attractive targets as supplements in infant formulas. The European Food Safety Authority reported that 2'FL is safe for use as a novel food ingredient (He et al., 2016; Sprenger et al., 2017). Therefore, the production of HMOs has attracted increasing interest, but it remains challenging due to the structural complexity of these compounds. Although some HMOs are commercially available at rather high prices, limitations hamper large-scale production, and HMOs are not available in most infant formulas. Instead, fructooligosaccharides and galactooligosaccharides are added as prebiotics, but they are not present in human milk and they do not possess the same biological functions as HMOs.

Here, we present an up-to-date review of HMO synthesis using *in vitro* enzymatic and *in vivo* cell factory approaches. We focus on the 42 well-defined HMO structures (including LNB, 3'SLNb and lacto-*N*-triose ID) ranging from 2 to 10 monosaccharides that had been obtained as free reducing sugars (Fig. 4). Other recent approaches for the synthesis of HMO derivatives (not as free reducing sugars) are also discussed.

### 3. Production of HMOs

Milk from other mammals contains complex oligosaccharides that do not resemble the quantity and composition of HMOs. Therefore, the milk of farm animals can not be used as a natural source of HMOs. Alternatively, chemical synthesis, enzymatic synthesis and cell factory approaches have been explored to produce some HMOs. These strategies are being improved to become more efficient and attractive for large-scale production. Interestingly, similar retrosynthetic strategies employing these different methodologies have been used (Fig. 5). The





**Fig. 3.** Biosynthesis of neutral complex human milk oligosaccharides (HMOs) thought to be located in Golgi apparatus (Blank et al., 2012). *N*-acetylglucosaminyltransferases (GlcNAcT) attach *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) to terminal galactose (Gal) at the  $\beta$ 1,3 position, and I $\beta$ 6GlcNAcT attaches GlcNAc to terminal Gal at the  $\beta$ 1,6 position. Galactosyltransferases (GalT):  $\beta$ 3GalT attaches Gal to GlcNAc at the  $\beta$ 1,3 position and  $\beta$ 4GalT attaches Gal to the  $\beta$ 1,4 position of GlcNAc. Fucosyltransferases (FucT):  $\alpha$ 2FucT attaches fucose (Fuc) to terminal Gal at the  $\alpha$ 1,2 position, secretor (Se) enzyme,  $\alpha$ 3FucT attaches Fuc to GlcNAc at the  $\alpha$ 1,3 position,  $\alpha$ 3/4FucT attaches Fuc to GlcNAc at the  $\alpha$ 1,3/4 position and to Glc of the lactose core at the  $\alpha$ 1,3 position, Lewis (Le) enzyme. The no entry signs indicate that no further elongation occurs. Fucosylation of terminal type 1 and type 2 chains is also indicated.

most frequently used retrosynthetic strategy is based on the assembly of the lactosamine or lacto-*N*-biose donor derivative to the lactose acceptor, which are properly protected and activated according to the chemical or enzymatic reaction (strategy 1). This 2 + 2 convergent reaction produces different linear or branched backbone structures that will be later fucosylated or sialylated to obtain the corresponding derivatives. Another retrosynthetic strategy mimics the biosynthetic pathway of HMOs, which extends the lactose molecule with *N*-acetylglucosaminyl and additional galactosyl moieties in a sequential manner (strategy 2). Finally, only a few retrosynthetic chemical schemes use the fucosylated or sialylated donors, such as the Lewis X epitope, and lactose as the acceptor (Chernyak et al., 2000; Lee et al., 2006; Schmidt and Thiem, 2010) (strategy 3).

Most of the reported syntheses address type 2 HMOs, based on the lacto-*N*-neo-series and its fucosyl derivatives, despite the predominance of type 1 HMOs with a lacto-*N*-tetraose core structure in human milk. The difficulties in chemically synthesizing the  $\beta$ 1,3 linkage between galactosyl and *N*-acetylglucosaminyl moieties compared with the  $\beta$ 1,4 linkage in type 1 HMOs (Bohn et al., 2006; Jennum et al., 2014) and the biological interest of the neolacto-series as precursors of various cell surface antigens, such as the trisaccharide Lewis X antigen subunit, are potential explanations for this observation.

The chemical synthesis of HMOs remains challenging because of the requirements for the stereo- and regioselective control of glycosidic

bond formation. Multiple activation, protection and deprotection steps are required to achieve the desired selectivity, but often with low net yields (Hsu et al., 2010; Kovács et al., 2013; Roussel et al., 2001a, 2001b; Schmidt and Thiem, 2010; Yamada et al., 2006) Kovács et al., 2013). New approaches, such as reactivity-based one-pot strategies (Hsu et al., 2010, 2012; Jennum et al., 2014) or a combination of chemoenzymatic syntheses (Prudden et al., 2017; Xiao et al., 2016), applied to HMOs are affording promising results in preparative scale synthesis.

Here, we summarize the current enzymatic syntheses and cell factory approaches for obtaining HMOs at least at the mg scale. These strategies are classified according to the synthetic methodology and structure of neutral non-fucosylated, fucosylated and sialylated derivatives.

### 3.1. Enzymatic synthesis

Glycosylation reactions are performed by two types of enzymes: glycosyltransferases (GT) and glycoside hydrolases (GH). These enzymes are classified according to their sequence in the carbohydrate active enzymes (CAZY) database ([www.cazy.org](http://www.cazy.org), (Lombard et al., 2014)). Glycosyltransferase enzymes are responsible for glycoside bond formation in nature, catalyzing the transfer of a monosaccharide from a sugar nucleotide donor (in Leloir type GTs) to an acceptor (Palcic,

**Table 4**

Neutral HMO concentrations in human milk reported in 9 different studies (Bao et al., 2013; Chaturvedi et al., 2001; Coppa et al., 1999; Hong et al., 2014; Kunz et al., 1999; Olivares et al., 2015; Smilowitz et al., 2013; Thurl et al., 1996; Urashima et al., 2013).

Concentration (g/L)										
Compound	Maximum value	Thurl et al. (1996)	Kunz et al. (1999)	Coppa et al. (1999)	Chaturvedi et al. (2001)	Asakuma et al. (2007)	Smilowitz et al. (2013)	Bao et al. (2013)	Olivares et al. (2015)	Hong et al., 2014
					d 4-90	d 2		d 3-29		
2'FL	< 3.93	1.84	0.45	1.84–3.93	2.43	2.01	1.22	0.006–1.36	2.48	2.5
3FL	< 1.34	0.46	0.07	0.22–0.71	0.86	0.28	1.02	0.030–1.34		
DFL (LDFT)	< 0.43	0.17			0.43	0.28	0.17		0.12	
LNT	< 1.54	0.86	1.09	0.71–1.56	0.55	1.44	0.36	0.160–1.18	1.23	0.75
LNnT	< 2.04	0.11	Traces	0.95–2.04	0.17	0.54	0.09	0.040–0.5		
LNFP I	< 2.08	0.67	1.26	0.97–1.36	1.14	2.08	0.16	0.001–1.80		0.42
LNFP II	< 1.79	0.20		0.29–0.48			0.18	0.020–1.79	0.27	
LNFP III	< 0.78	0.28					0.20	0.060–0.78		
LNFP V	0.06							0.060		
LNFP VI	0.01							0.010		
LNDFH I	< 1.87	0.58		0.43–1.18	0.50	1.87		< 1.22	0.76	
LNDFH II	< 0.25	0.25	0.16	0.19–0.22	0.09	0.02		< 0.22		
LNH	< 0.17	0.13		0.05–0.17	2.43					0.05
LNnH	< 0.28			0.09–0.28						
F-LNH I	< 2.62	0.20		1.74–2.62						
F-LNH II	< 1.06			0.18–1.06						
DF-LNH I	0.31	0.31								
DF-LNH II	< 1.02			0.12–1.02						
TF-LNH	< 3.10			2.60–3.10						

Abbreviations: d, day of lactation, 2'FL, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4Glc; 3FL, Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)Glc; DFL (LDFT), Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)Glc; LNT, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnT, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNFP I, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNFP II, Gal $\beta$ 1,3(Fuca1,4)GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNFP III, Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNFP V, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)Glc; LNFP VI, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)Glc; LNDFH I, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3(Fuca1,4)GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNDFH II, Gal $\beta$ 1,3(Fuca1,4)GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)Glc; LNnH, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnH, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc; F-LNH I, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc; DF-LNH II, Gal $\beta$ 1,3(Fuca1,4)GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc; DF-LNH I, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc; TF-LNH, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3(Fuca1,4)GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc.



**Table 5**

Acidic HMO concentrations in human milk reported in 6 different studies (Asakuma et al., 2007; Coppa et al., 1999; Hong et al., 2014; Kunz et al., 1999; Smilowitz et al., 2013; Thurl et al., 1996).

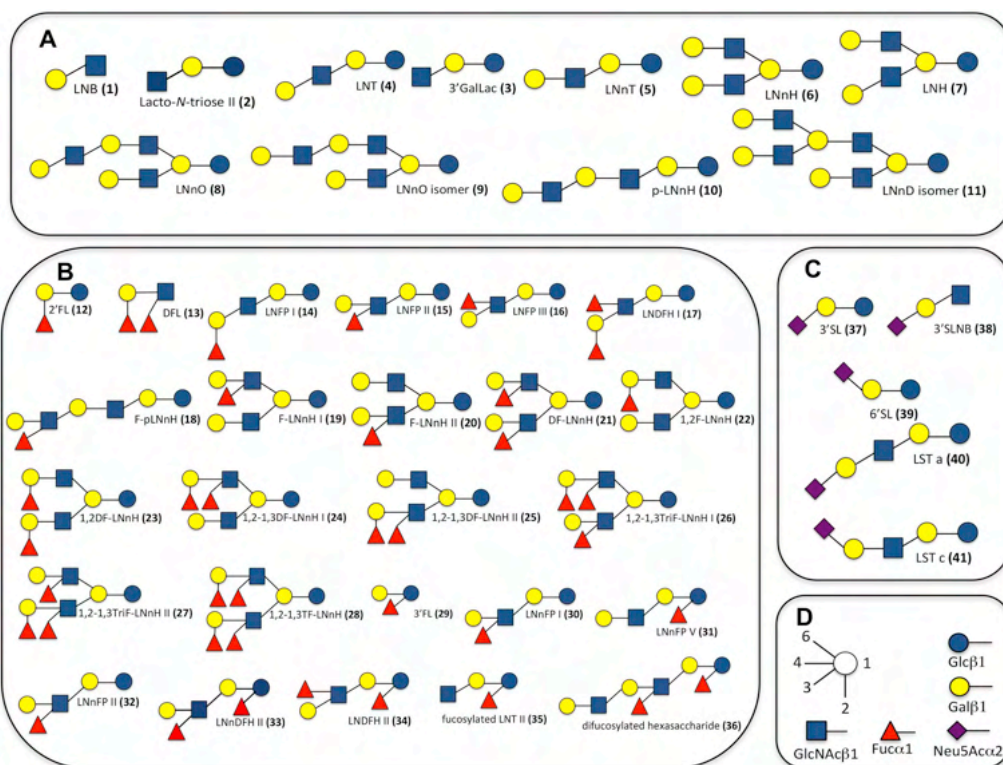
Concentration (g/L)							
Compound	Maximum value	Thurl et al. (1996)	Coppa et al. (1999)	Kunz et al. (1999)	Asakuma et al. (2007)	Smilowitz et al. (2013)	Hong et al. (2017)
3'SL	< 0.30	0.15	0.09–0.13	0.27	0.30	0.09	0.17
6'SL	< 0.59	0.42	0.24–0.59	0.38	0.37	0.07	0.29
LST a	< 0.18	0.01	0.11–0.18	0.14	0.14		
LST b	< 0.25	0.04	0.17–0.25		0.06		
LST c	< 1.05	0.07	0.12–1.05	0.17	0.69		0.05
DSLNT	< 0.80	0.10	0.63–0.80	0.20	0.46		
FS-LNnH I	< 0.55		0.26–0.55				

Abbreviations: 3'SL, Neu5Acα2,3Galβ1,4Glc; 6'SL, Neu5Acα2,6Galβ1,4Glc; LST a, Neu5Acα2,3Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; LST b, Galβ1,3(Neu5Acα2,6)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; LST c, Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; DSLNT, Neu5Acα2,3Galβ1,3(Neu5Acα2,6)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; FS-LNnH I, Neu5Acα2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc.

2011) (Fig. 6). The main limitations of the use of GTs for carbohydrate synthesis are their limited stability and availability, as well as the need for expensive nucleotide donors. The use of more readily available recombinant bacterial GTs instead of the mammalian GTs involved in HMO biosynthesis, and *in situ* generation of the nucleotide donors have partially overcome these limitations. In addition, sequential one-pot multienzyme syntheses using inexpensive monosaccharides and multiple enzymes for sequential donor activation and transfer to the acceptor have been successfully applied to a broad range of complex oligosaccharides (Chen, 2015; Li et al., 2016; Petschacher and Nidetzky, 2016; Xiao et al., 2016). Other strategies rely on

phosphorylases and the transglycosidase activity of retaining glycoside hydrolases for the donor-acceptor condensation step using the corresponding glycosyl phosphates and oligosaccharide donors, respectively (Fig. 6).

Glycoside hydrolases (GHs) normally catalyze the hydrolytic cleavage of glycosidic bonds. However, they also perform transglycosylation reactions leading to glycosidic bond formation with activated glycosyl donors under specific conditions (kinetically controlled transglycosylation) (Fig. 6). Transglycosylation rates are lower than the hydrolysis rates and typical yields are up to 40–50% since the products are subsequently hydrolyzed by the enzyme (Mimura et al., 2018;



**Fig. 4.** HMO structures discussed in this review: A) neutral non-fucosylated HMO, B) fucosylated HMO, C) sialylated HMO, and D) symbol legend.

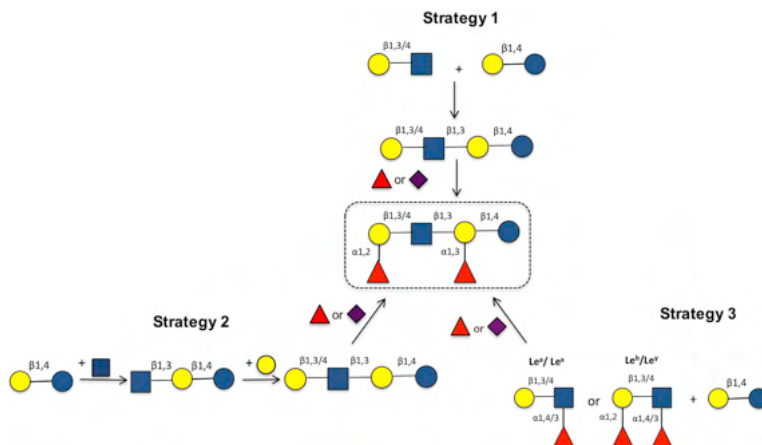


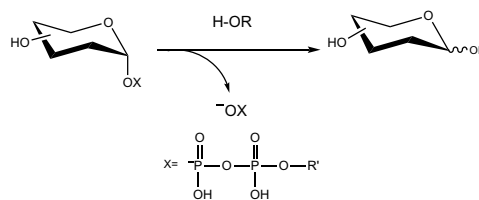
Fig. 5. General retrosynthetic strategies for HMO production. Strategy (1) 2+2 convergent synthesis, (2) sequential addition to lactose (biosynthetic pathway mimic), (3) Lewis epitopes (Le) convergent synthesis. Symbol legend indicated in Fig. 4.

Planas et al., 2015; Wang and Davis, 2013; Zeuner et al., 2014). However, advances in enzyme engineering are delivering improved transglycosylating enzymes. As the first example, the glycosynthase approach (Mackenzie et al., 1998; Malet and Planas, 1998) has been successfully used to synthesize a broad range of oligo- and polysaccharides and glycoconjugates (Cobucci-Ponzano and Moracci, 2012; Danby and Withers, 2016; Hayes and Pietruszka, 2017; Planas et al., 2015; Wang and Davis, 2013). Glycosynthases are mutated glycosyl hydrolases lacking the catalytic nucleophile residue. They are able to catalyze glycosyl transfer from activated donors with an opposite anomeric configuration to the natural substrate of the parental hydrolase (a mimic of the glycosyl-enzyme intermediate) to an acceptor substrate with high yields of glycoside bond formation since products are not able to be hydrolyzed (Fig. 6). Another approach seeks to disrupt the balance in the transglycosylation to hydrolysis ratio (T/H ratio) of retaining GHs towards enhanced transglycosylation with activated glycosyl donors. This approach is based on a rational design aimed at destabilizing the first step of the hydrolase mechanism and improving acceptor binding for more efficient transglycosylation. Several GHs have recently been converted into efficient transglycosidases (Arab-Jaziri et al., 2013; Bissaro et al., 2015; Bissaro et al., 2014). Current efforts focusing on the engineering of GTs and GHs by rational and directed evolution approaches will provide more efficient biocatalysts for the synthesis of HMOs. To date, 29 HMO structures have been produced enzymatically (including LNB, 3'SLNB and lacto-*N*-triose II) (Tables 6–8).

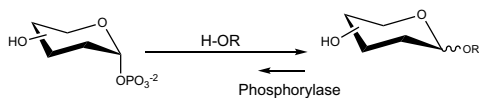
### 3.1.1. Neutral non-fucosylated oligosaccharides

Two retrosynthetic strategies are mainly used to construct the tetrasaccharide core structures (Fig. 5): the first mimics the biosynthetic pathway, which is the sequential addition of GlcNAc and further Gal units to lactose, and the second is the 2+2 convergent synthesis approach where laminaribiosyl and lactosyl moieties are condensed. For the approach mimicking the biosynthetic pathway, the key enzymes include  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferases,  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidases, lacto-*N*-biose phosphorylase and transglycosylating galactosidases or galactosyltransferases. For the 2+2 convergent approach, the key enzyme is lacto-*N*-biosidase, which functions as a transglycosylase. The core oligosaccharides are later decorated with fucosyl or/and sialyl moieties. Fucosylation is performed by

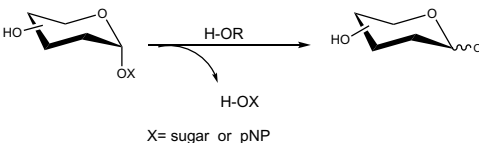
## A) Leloir glycosyltransferase activity



## B) Phosphorylase activity



## C) Glycosidase: TG activity



## D) Glycosynthase activity

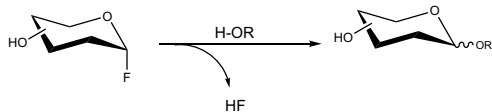


Fig. 6. General enzymatic routes for glycosidic bond formation. A) Leloir GT, B) phosphorylases, C) glycosidases: transglycosidase activity, and D) glycosynthases.

**Table 6**

Full list of abbreviations of HMO components with their structures discussed in this review.

Code	Name	Abbreviation	Structure
1	Lacto- <i>N</i> -biose	LNB	Galβ1,3GlcNAc
2	Lacto- <i>N</i> -triose II		GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
3	3'-Galactosyllactose	3'GalLac	Galβ1,3Galβ1,4Glc
4	Lacto- <i>N</i> -tetraose	LNT	Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
5	Lacto- <i>N</i> -neotetraose	LnNT	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
6	Lacto- <i>N</i> -neohexaose	LNNH	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
7	Lacto- <i>N</i> -hexaose	LNH	Galβ1,3GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
8	Lacto- <i>N</i> -neooctaose	LNNO	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
9	Lacto- <i>N</i> -neooctaose isomer	LNNO isomer	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
10	para-Lacto- <i>N</i> -neohexaose	p-LNNH	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
11	Lacto- <i>N</i> -neodecaose isomer	LNND isomer	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc
12	2'-fucosyllactose	2'FL	Fuca1,2Galβ1,4Glc
13	2',3-Difucosyllactose	2'3FL or DFL	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
14	Lacto- <i>N</i> -fucopentaose I	LNFP I	Fuca1,2Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
15	Lacto- <i>N</i> -fucopentaose II	LNFP II	Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
16	Lacto- <i>N</i> -fucopentaose III	LNFP III	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
17	Lacto- <i>N</i> -difucohexaose I	LNDFH I	Fuca1,2Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
18	F-p-Lacto- <i>N</i> -neohexaose	F-p-LNNH or IFLNH III	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
19	F-Lacto- <i>N</i> -neohexaose I	F-LNNH I	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
20	F-Lacto- <i>N</i> -neohexaose II	F-LNNH II	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
21	DF-Lacto- <i>N</i> -neohexaose	DF-LNNH	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
22	α1,2-Fucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose I	1,2F-LNNH I	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
23	α1,2-Difucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose	1,2DF-LNNH	Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
24	α1,2-1,3Difucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose I	1,2-1,3DF-LNNH I	Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
25	α1,2-1,3Difucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose II	1,2-1,3DF-LNNH II	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
26	α1,2-1,3Trifucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose I	1,2-1,3TrIF-LNNH I	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
27	α1,2-1,3Trifucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose II	1,2-1,3TrIF-LNNH II	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
28	α1,2-1,3Tetra-fucosylated lacto- <i>N</i> -neohexaose	1,2-1,3TF-LNNH	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc
29	3-Fucosyllactose	3FL	Galβ1,4Fuca1,3Glc
30	Lacto- <i>N</i> -neofucopentaose I	LNnFP I	Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
31	Lacto- <i>N</i> -neofucopentaose V	LNnFP V	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
32	Lacto- <i>N</i> -neofucopentaose II	LNnFP II	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
33	Lacto- <i>N</i> -neodifucohexaose II	LNnDFH II	Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
34	Lacto- <i>N</i> -difucohexaose II	LNDFH II	Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
35	α1,3-fucosylated lacto- <i>N</i> -triose II		GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
36	Difucosylated hexasaccharide		Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc
37	α2,3-Sialyllactose	3'SL	NeuAcα2,3Galβ1,4Glc
38	α2,3-Sialyl-lacto- <i>N</i> -biose	3'SLNB	NeuAcα2,3Galβ1,3GlcNAc
39	α2,6-Sialyllactose	6'SL	NeuAcα2,6Galβ1,4Glc
40	α2,6-Sialyllacto- <i>N</i> -tetraose	LST a	NeuAcα2,6Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
41	α2,6-Sialyllacto- <i>N</i> -neotetraose	LST c	NeuAcα2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc
42	α2,6-Sialyllacto- <i>N</i> -neohexaose	S-LNNH II	NeuAcα2,6Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc

fucosyltransferases or redesigned fucosidases acting as transfucosidases or glycosynthases (fucosynthases), whereas sialylation is mediated either by sialyltransferases, trans-sialidases or sialidases.

**3.1.1.1. Lacto-*N*-biose (LNB, Galβ1,3GlcNAc) (1).** LNB (1) was efficiently produced using two different approaches: the formation of galactose 1-phosphate and condensation with GlcNAc by a phosphorylase or transglycosylation of p-nitrophenyl galactoside by a β-galactosidase (Table 7, Fig. 7).

In the first approach, the most remarkable synthesis was reported by Kitaoka and coworkers at kilogram scale (Nishimoto and Kitaoka, 2007) (Table 7, entry 1). Glucose 1-phosphate (Glc1P) was formed from sucrose by sucrose phosphorylase and then, it was converted into UDP-Glc concomitantly with the conversion of UDP-Gal into GalP by the uridylyltransferase GalT and epimerase. In the final step of this one-pot reaction, LNB was synthesized from GalP and GlcNAc by *Bifidobacterium longum* lacto-*N*-biose phosphorylase with an 83% overall yield. Alternatively, Chen and coworkers used the reaction between galactose and ATP catalyzed by galactokinase to generate GalP that was directly transferred to GlcNAc by the phosphorylase to produce LNB in quantitative yields at the mg scale (Yu et al., 2010) (Table 7, entry 2). This one-pot, two-step galactosylation reaction was used to synthesize the ethyl thiolactobioside derivative (Yao et al., 2015) and a library of β1,3-linked galactodisaccharides by taking advantage of the acceptor promiscuity of *Bifidobacterium infantis* D-galactosyl-β1,3-*N*-

acetyl-D-hexosamine phosphorylase (Yu et al., 2010).

In the second approach, LNB (1) was synthesized from pNP-Gal and GlcNAc by *Bacillus circulans* β-galactosidase (Table 7, entry 3). The transglycosylation reaction achieved excellent yields at the mg scale in the presence of the ionic solvent 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ((Bmim)(PF<sub>6</sub>)) (Bayón et al., 2013).

**3.1.1.2. Lacto-*N*-triose II (GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc) (2).** Lacto-*N*-triose II (2) was synthesized as a precursor of the tetrasaccharides LNT (3) and LnNT (4). Two different approaches were used: transglycosylation using β-*N*-acetylhexosaminidases or glycosyltransferase activity using Leloir glycosyltransferases (Table 7, Fig. 8).

Best yield of lacto-*N*-triose II (2) was obtained at preparative scale by glycosyltransferases. Remarkably, the one-pot multienzyme reaction starting with GlcNAc and using β1-3-*N*-acetylglucosaminyltransferase from *Neisseria meningitidis* as glycosyltransferase gave ≥ 95% yield at the gram scale (Yu et al., 2014) (Table 7, entry 5).

When the transfer of GlcNAc from UDP-GlcNAc to lactose was catalyzed by the crude bovine serum β1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase, the yield was 44% (Mine et al., 2010; Murata et al., 1999) (Table 7, entry 4) which is still higher than the ones obtained using β-*N*-acetylhexosaminidases at the analytical scale (Nyffenegger et al., 2015; Matsuo et al., 2003)). The wild-type enzymes generated yields of less than 8% and a mixture of regioisomers.

**Table 7**  
Neutral non-fucosylated HMOs produced using enzymatic synthesis.

HMO	Entry	Enzyme	Substrates	Amount (yield)	Reference
LNB (1)	1	BISP, BiGalT, BiGalE, BbLNBP	Sucrose, Glc One-pot reaction	1.9 kg (83%)	Nishimoto and Kitaoka (2007)
	2	EcGalK, BiGalHexNACp	Gal, GlcNAc, ATP One-pot reaction	n.p. (95%)	Yu et al. (2010)
	3	Bc $\beta$ -Gal-3	GlcNAc, pNP-Gal presence of ionic liquid	n.p. (97%)	Bayón et al. (2013)
Lacto- <i>N</i> -triose II (2)	4	Bovine serum $\beta$ -1,3-GnT	Lac, UDP-GlcN	106 mg (26%)	Murata et al. (1999),
		Bovine blood $\beta$ -1,3-GnT	Lac, UDP-GlcNAc	17 mg (44%)	Miyazaki et al. (2010)
	5	BiNahK, PmGlmU, PmPpA, NmLgtA	GlcNAc, ATP, UTP, Lac	1.4 g (95%)	Yu et al. (2014)
3'-Gallac (3)	6	SpGalK, BLUSP, PmPpA, NmLgtA	Lac, Gal, ATP, UTP,	15 mg (10%)	Li et al. (2016)
LNT (4)	7	AsLNB	Lac, pNP-LNB	4 mg (3.7%)	Murata et al. (1999)
	8	Bc $\beta$ -Gal-3	Lacto- <i>N</i> -triose II (entry 4), oNP-Gal	16 mg (19.6%)	Murata et al. (1999),
		Ao $\beta$ -Gal-3		28 mg (22%)	Miyazaki et al. (2010)
LNnT (5)	9	Bc $\beta$ -Gal-3	Lac, Lacto- <i>N</i> -triose II (entry 4)	12 mg (19%)	Murata et al. (1999)
	10	GalT, UDPGE	1-Thio $\beta$ -lacto- <i>N</i> -triose II coupled to PEG, UDP-Glc	18 mg (from 1-thio $\beta$ -lactose)	Renaudie et al. (2004)
	11	EcGalK, BLUSP, PmPpA, NmLgtB	Lacto- <i>N</i> -triose II (entry 5), Gal, ATP, UTP One-pot reaction	1.2 g (92%)	Yu et al. (2014)
LNnH (6)	12	BiGalK, AtUSP, NmLgtB, EcPPA	GlcNAc $\beta$ 1,3(GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc (chemical synthesis), Gal, ATP, UTP One-pot reaction	40 mg (92%)	Xiao et al. (2016)

Abbreviations: n.p.: not provided, BISP: sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*, BiGalT: UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase from *Bifidobacterium longum*, BiGalE: UDP-glucose-4-epimerase from *Bifidobacterium longum*, BbLNBP: lacto-*N*-biose phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum*, EcGalK: galactokinase from *Escherichia coli*, BiGalHexNACp: D-galactosyl- $\beta$ -1-3-*N*-acetyl-D-hexosamine phosphorylase from *Bifidobacterium infantis*, Bc $\beta$ -Gal-3:  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus circulans*,  $\beta$ -1,3-GnT:  $\beta$ -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase, BiNahK *N*-acetylhexosamine-1-kinase from *Bifidobacterium longum*, PmGlmU: *N*-acetylglucosamine uridylyltransferase from *Pasteurella multocida*, PmPpA: inorganic pyrophosphatase from *Pasteurella multocida*, NmLgtA:  $\beta$ -1-3-*N*-acetylglucosaminyltransferase from *Neisseria meningitidis*, SpGalK: TIGR4 galactokinase from *Streptococcus pneumoniae*, BLUSP: UDP-sugar pyrophosphorylase from *Bifidobacterium longum*, AsLNB: lacto-*N*-biosidase from *Aureobacterium sp. L-101*, Bc $\beta$ -Gal-3:  $\beta$ -D-galactosidase from *Bifidobacterium longum*, Ao $\beta$ -Gal-3:  $\beta$ -D-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, BiGalK: galactokinase from *Bifidobacterium infantis*, AtUSP: pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana*, NmLgtB:  $\beta$ -1-4-*N*-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*, EcPPA: inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*, GalT:  $\beta$ -1,4-galactosyl transferase from bovine milk, UDPGE: UDP-glucose epimerase, LNB: Gal $\beta$ 1,3GlcNAc; lacto-*N*-triose II: GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; 3'Gallac: Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNT: Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnT: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnH: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc.

**3.1.1.3. 3'-Galactosyltransferase (3'Gallac, Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (3).** Gal $\beta$ 1,3-lactose (3) is present in milk from humans and other mammals (Difilippo et al., 2015; Donald and Feeney, 1988; Fukuda et al., 2010; Kunz et al., 1999; Saito et al., 1987; Urashima et al., 2015; Urashima et al., 2014; Urashima et al., 1999; Urashima et al., 1989). After analyzing different glycosyltransferases and their donor specificity, this trisaccharide was produced at the mg scale from galactose and lactose using a one-pot multienzyme system containing *Neisseria meningitidis*  $\beta$ -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase that is able to use UDP-Gal as the donor (Li et al., 2016) (Table 7, entry 6). The galactosylation reaction produced 3'-galactosyltransferase at a 10% yield (Li et al., 2016) (Fig. 8).

**3.1.1.4. Lacto-*N*-tetraose (LNT, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (4).** Lacto-*N*-tetraose (4) (type 1 core structure) was produced at the mg scale using the two types of retrosynthetic schemes (Fig. 9). Best results were obtained by the biosynthetic strategy in which lacto-*N*-triose II (2) is obtained first and then it is galactosylated. Very promising was the application of  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase from *E. coli* (WbgO) that was able to synthesize the benzyl LNT derivative (not included in Table 7) at mg scale in 87% yield (Liu et al., 2009). Another synthesis used the  $\beta$ -galactosidase from *B. circulans* ATCC31382, which transglycosylated *o*-nitrophenyl galactoside to the trisaccharide to generate LNT (4) (regiosomer  $\beta$ 1,3) and the regiosomer  $\beta$ 1,6 with an overall yield of 19% (Murata et al., 1999). Higher transglycosylation yields, 22% for pure LNT (4), were obtained after the selective hydrolysis of the  $\beta$ 1,6-regioisomer in the presence of 10% DMF at different times and temperatures (Miyazaki et al., 2010).

Lower yields were obtained by the 2+2 convergent strategy (Table 7, entry 7) using lacto-*N*-biosidases from *Aureobacterium sp.* and *Bifidobacterium bifidum* (Murata et al., 1999; Wada et al., 2008a).

**3.1.1.5. Lacto-*N*-neotetraose (LNnT, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (5).** LNnT (5) has been produced via the biosynthetic strategy from lacto-*N*-triose II (2) and further galactosylation reactions using either transglycosylating galactosidases or galactosyltransferases (Fig. 8).

Best yields were obtained using glycosyltransferases and the most remarkable synthesis was reported by Chen and coworkers at gram scale (Yu et al., 2014). The one-pot, four enzyme galactosylation system that involves Gal activation and transfer to lacto-*N*-triose II with *Neisseria meningitidis*  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase (NmLgtB) gave LNnT in quantitative yields (Table 7, entry 11). This Gal activation system was more effective than the previous system also reported by Chen and coworkers involving the formation of UDP-Glc from Glc1P and C4 epimerization to produce UDP-Gal (Yu et al., 2010).

LNnT (5) was also obtained in a solid-supported synthesis reaction (Table 7, entry 10) (Renaudie et al., 2004). Starting from 1-thio- $\beta$ -D-lactose, the thiolacto-*N*-triose II (2) derivative was obtained and immobilized on to a polyethylene support, followed by galactosylation using the milk  $\beta$ -1,4-galactosyl transferase. After cleavage, 18 mg of free LNnT (5) were obtained. Similarly, a LNnT (5) derivative was recently produced to construct a glycan microarray with branched HMOs (Prudden et al., 2017). First, the lacto-*N*-triose II (2) linked to the support was synthesized with the recombinant human  $\beta$ -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase B3GNT2 and elongated with Gal by the commercial  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase from bovine milk (not included in Table 7).

A lower yield of LNnT (5) was obtained with the commercial *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase (BIOLACTA) specific for the formation of the  $\beta$ 1,4 linkage (Table 7, entry 9) (Murata et al., 1999). This reaction was the first to produce LNnT (5) at the mg scale with a yield of 19%.

**3.1.1.6. Lacto-N-neohexaose (LNnH, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc) (6).** Recently, the branched hexasaccharide type 2 HMO LNnH (6) was obtained using an efficient chemoenzymatic synthesis approach that the Wang group extended to produce a glycan library (Xiao et al., 2016) (Table 7, entry 12). First, the tetrasaccharide GlcNAc $\beta$ 1,3(GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc was obtained using chemical synthesis from *N*-acetylglucosaminyl bromide and lactosyl derivatives at an 80% yield and more recently from the glycosyl imidate donor and azidopropylactosyl derivatives (Han et al., 2016). Then, a one-pot multienzyme reaction with Gal activation and transfer with *Neisseria meningitidis*  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase, which interestingly was able to accept the branched tetrasaccharide, produced 40 mg of the hexasaccharide at a 93% yield (Fig. 11A).

**3.1.1.7. para-Lacto-N-neohexaose (p-LNnH, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (10).** To our knowledge, enzymatic synthesis of the p-LNnH (10) as a free reducing sugar at the preparative scale has not been reported. Only the consecutive

combination of the human *N*-acetylglucosaminyl transferase (B3GNT2) and GalT1 from bovine milk has been applied to obtain the p-LNnH (10) derivative from a lactose derivative in a glycan microarray (Prudden et al., 2017).

### 3.1.2. Fucosylated HMOs

Despite the difficulties in synthesizing  $\alpha$ -L-fucosyl linkages, the production of fucosylated oligosaccharides has attracted researchers' interest since it is present not only in fucosylated HMOs but also in the Lewis and ABO antigens and plays important roles in many biological processes. Regarding HMO biosynthesis, fucosylation requires GDP-L-fucose as a substrate donor and fucosyltransferase enzymes with  $\alpha$ 1,2,  $\alpha$ 1,3/4 selectivities (Table 2) (Bode, 2015; He et al., 2016). *In vitro*, fucosylated HMOs were obtained using  $\alpha$ -fucosyltransferases and  $\alpha$ -L-fucosidases. Different  $\alpha$ -fucosyltransferases required for  $\alpha$ 1,2,  $\alpha$ 1,3 and  $\alpha$ 1,4 regioselective bond formation have been characterized, but only a few exhibit sufficient activity for synthetic applications. Interestingly, their corresponding GDP-Fuc donors have been produced *in situ* from

**Table 8**  
Fucosylated HMO produced using enzymatic synthesis.

HMO	Entry	Enzyme	Substrates	Amount (yield)	Reference
2'FL (12)	1	HpFucT2	GDP-Fuc, lactose	18 mg (65%)	Albermann et al. (2001)
	2	1) BbAfcA N423H 2) BbAfcA N423H-D766N	$\beta$ -FucF, lactose	1) n.p. (88%) 2) n.p. (83%)	Sugiyama et al. (2016)
DFL (13)	3	$\alpha$ 1,3/4 fucosidase from <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	3FL, 2'FL	1) n.p. (59%) 2) n.p.	Champion et al. (2016a) and Saumonneau et al. (2015)
		1) W135E 2) W135F-P165E-A174N-E413R			
LNFP I (14)	4	FUT1	LNT, GDP- $\beta$ -L-Fuc	3 mg (71%)	Miyazaki et al. (2010)
	5	BfFKP, PmPpA, Te2FT	Fuc, ATP, GTP, LNT	1.1 g (95%)	Zhao et al. (2016)
	6	BbAfcA N423H	$\beta$ -FucF, LNT	n.p. (75%)	Sugiyama et al. (2016)
LNFP II (15)	7	BbAfcAB D703S	$\beta$ -FucF, LNT	n.p. (41%)	Sakurama et al. (2012)
	8	$\alpha$ 1,3/4 fucosidase from <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	3FL, LNT	1) n.p. (48.7%) 2) n.p. (48.7%)	Champion et al. (2016a) and Saumonneau et al. (2015)
LNFP III (16)	9	1) S168E-A174H-E413R 2) S168E-A174H-V221A	LNnT, GDP-Fuc, Fuc	2 mg (20%)	Totani et al. (2002)
	10	$\alpha$ 1,3-fucosyltransferase from chicken serum $\alpha$ 1,3/4 fucosidase from <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	3FL, LNnT	1) n.p. (52.8%) 2) n.p. (52.1%)	Champion et al. (2016a) and Saumonneau et al. (2015)
LNDFH I (17)	11	1) W135E-A174F-V221A 2) S168E-A174F-V221A-V282R	LNFP I, GDP-Fuc	1.7 mg (85%)	Miyazaki et al. (2010)
	12	FUT3	3FL, LNFP I	1) n.p. (57%) 2) n.p. (58%)	Champion et al. (2016a) and Saumonneau et al. (2015)
F-p-LNnH or IFLNH III (18)	13	1) W135Y-A174N-E419R 2) W135F-A174N-E419R	3FL, p-LNnH	1) n.p. (52%) 2) n.p. (49.4%)	Champion et al. (2016a) and Saumonneau et al. (2015)
		1) S168E-A174H-V221A-V282H 2) S168E-A174F-V221A-V282R			
F-LNnH I (19)	14	i) HpFucT ii) NmLgtB, BiGalK, AtUSP, EcPPA	i) (42) (chemical synthesis), GDP-Fuc ii) Gal, ATP, UTP	i) 2.2 mg (95%) ii) 1.1 mg (90%)	Xiao et al. (2016)
	15	i) HpFucT ii) NmLgtB, BiGalK, AtUSP, EcPPA	i) (43) (chemical synthesis), GDP-Fuc ii) Gal, ATP, UTP	i) 2 mg (95%) ii) 1 mg (90%)	Xiao et al. (2016)
DF-LNnH (21)	16	HpFucT	LNnH (Table 7, entry 12), GDP-Fuc	2.3 mg (95%)	Xiao et al. (2016)
F-LNnH I (19)	17	$\alpha$ 1,3/4 fucosidase from <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	3FL, LNnH	n.p. (< 20%)	Saumonneau et al. (2015)
F-LNnH II (20)		L321P			
DF-LNnH (21)	18	i) Hma $\alpha$ 1,2FT ii) Table 7, entry 16	i) HMO3, GDP-Fuc ii) Gal, ATP, UTP	i) 2 mg (92%) ii) 1 mg (90%)	Xiao et al. (2016)
1,2F-LNnH <sup>1</sup> (22)	19	Hma $\alpha$ 1,2FT	LNnH (Table 7, entry 12), GDP-Fuc	2 mg (93%)	Xiao et al. (2016)

(continued on next page)



Table 8 (continued)

HMO	Entry	Enzyme	Substrates	Amount (yield)	Reference
1,2-1,3DF-LNnH I <sup>a</sup> (24)	20	i) Hmα1,2FT	i) (42), GDP-Fuc	i) 2 mg (92%)	Xiao et al. (2016)
		ii) HpFucT	ii) GDP-Fuc	ii) 1.1 mg (93%)	
		iii) NmLgtB, BiGalK, AtUSP, EcPPA	iii) Gal, ATP, UTP	iii) 0.5 mg (90%)	
1,2-1,3DF-LNnH II <sup>a</sup> (25)	21	i) Hmα1,2FT	i) (43), GDP-Fuc	i) 2 mg (91%)	Xiao et al. (2016)
		ii) HpFucT	ii) GDP-Fuc	ii) 1 mg (93%)	
		iii) NmLgtB, BiGalK, AtUSP, EcPPA	iii) Gal, ATP, UTP	iii) 0.5 mg (90%)	
1,2-1,3-TriF-LNnH I <sup>a</sup> (26)	22	HpFucT	1,2F-LNnH <sup>a</sup> (entry 18), GDP-Fuc	0.4 mg (93%)	Xiao et al. (2016)
1,2-1,3TriF-LNnH II <sup>a</sup> (27)	23	i) Hmα1,2FT	i) (43), GDP-Fuc	i) 2 mg (92%)	Xiao et al. (2016)
		ii) NmLgtB, BiGalK, AtUSP, EcPPA	ii) Gal, ATP, UTP	ii) 1 mg (93%)	
		iii) HpFucT	iii) GDP-Fuc	iii) 0.5 mg (95%)	
1,2-1,3TF-LNnH <sup>a</sup> (28)	24	HpFucT	1,2DF-LNnH <sup>a</sup> (entry 19) GDP-Fuc	1 mg (95%)	Xiao et al. (2016)

Abbreviations: n.p.: not provided, HpFucT2: α1,2-fucosyltransferase from *Helicobacter pylori*, BbAfcABbAfcA: 1,2-α-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*, FUT1: α1,2-fucosyltransferase from human, BFKP: L-fucokinase/GDP-fucose pyrophosphorylase from *Bacteroides fragilis*, PmPpA: inorganic pyrophosphatase from *Pasteurella multocida*, Te2FT: α1,2-fucosyltransferase from *Thermosynechococcus elongatus*, BbAfcB: 1,3-1,4-α-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*, FUT3: α1,4-fucosyltransferase from humans, HpFucT: α1,3-fucosyltransferase from *Helicobacter pylori*, NmLgtB: β1,4-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*, BiGalK: galactokinase from *Bifidobacterium infantis*, AtUSP pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana*, EcPPA: inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*, Hmα1,2FT: α1,2-fucosyltransferase from *Helicobacter mustelae*; 2FL: Fuca1,2Galβ1,4Glc; DFL: Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)Glc; LNFP I: Fuca1,2Galβ1,3GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; LNFP II: Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; LNFP III: Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; LNDFH I: Fuca1,2Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; F-p-LNnH: Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc; F-LNnH I: Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6(Galβ1,4GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc; DF-LNnH: Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6(Galβ1,4GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc; F-LNnH II: Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6(Galβ1,4GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc; 1,2F-LNnH: Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,6(Galβ1,4GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc; 1,2-1,3DF-LNnH I: Galβ1,4GlcNAcβ1,6(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc; 1,2-1,3-triF-LNnH I: Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc; 1,2-1,3-TF-LNnH: Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3)Galβ1,4Glc.

Yield: (1) and (2) correspond to each enzyme mutant.

<sup>a</sup> Abbreviations used in this review to name their corresponding structures.

GDP-Man (Albermann et al., 2001) or even fucose using a one-pot multienzyme system (Zhao et al., 2016). Regarding the specificity, their acceptors are the linear structures lactose, lacto-*N*-triose II, LNT or LNnT (Engels and Elling, 2014; Lin et al., 2006; Martin et al., 1997; Miyazaki et al., 2010; Prudden et al., 2017; Rasko et al., 2000; Sarnesto et al., 1992; Stein et al., 2008; Wang et al., 1999; Weston et al., 1992; Zhao et al., 2016), and exceptionally branched HMOs, such as LNnH (Xiao et al., 2016). In addition, fucosylation preferentially proceeds either on the terminal Gal, the reducing end fucosyl residue or the GlcNAc from the terminal lacto-*N*-biosyl or lactosaminyl moiety. Enzymatic characteristics of the microbial fucosyltransferases are reviewed in detail by Nidetzky and coworkers (Petschacher and Nidetzky, 2016).

On the other hand, the transferase activity of α-L-fucosidases has

been exploited with different fucosyl donors and engineered to increase the transglycosylation/hydrolysis ratio (Champion et al., 2016a; Saumonneau et al., 2015). In addition, several fucosidases have been converted to glycosynthases. The classical glycosynthase approach was first developed for retaining enzymes, but either retaining and inverting α-L-fucosidases from the GH29 and GH95 families, respectively, have been converted to fucosynthases (Sakurama et al., 2012; Sugiyama et al., 2016; Wada et al., 2008b). Fig. 10 presents the different fucosynthase strategies. Among them, the glycosynthase mutants developed for HMOs introduce Fuc residues using the β-fucosyl fluoride as donor substrates.

The fucosylated HMOs produced at least at the mg scale are described in Table 8. The concentrations of most of these HMOs in milk are known, but the concentrations of others, such as the fucosylated

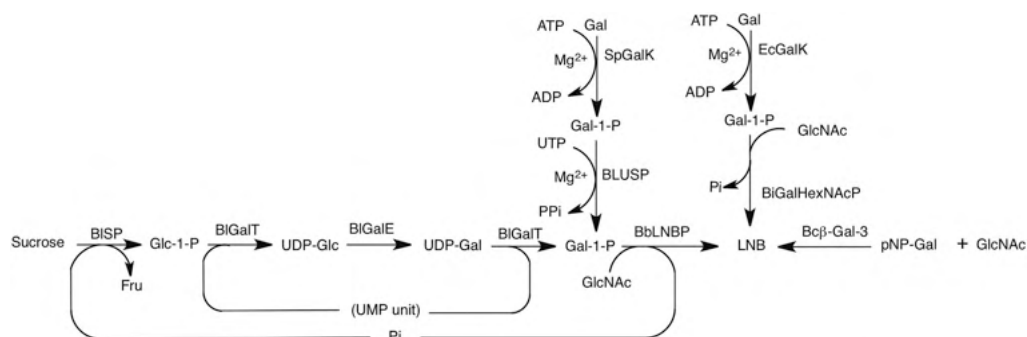
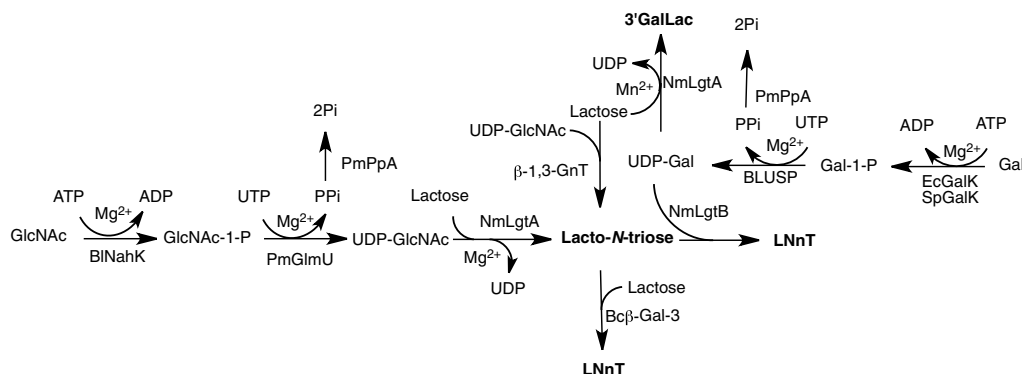
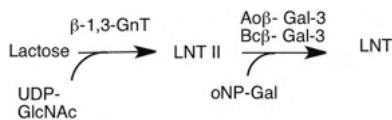


Fig. 7. Enzymatic reactions for LNB production. Abbreviations used: BISP: sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*, BIGalT: UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridylyltransferase from *Bifidobacterium longum*, BIGalE: UDP-glucose-4-epimerase from *Bifidobacterium longum*, BbLNBP: lacto-*N*-biose phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum*, SpGalK: TIGR4 galactokinase from *Streptococcus pneumoniae*, EcGalK: galactokinase from *Escherichia coli*, BLUSP: UDP-sugar pyrophosphorylase from *Bifidobacterium longum*, BIGalHexNAcP: D-galactosyl-β-1-3-N-acetyl-D-hexosamine phosphorylase from *Bifidobacterium infantis*, Bcβ-Gal-3: β-galactosidase from *Bacillus circulans*, LNB: Galβ1,3GlcNAc.



**Fig. 8.** Enzymatic synthesis of lacto-*N*-triose II, 3'galactosyllactose (3'GalLac) and LNnT. Abbreviations used: BINahK *N*-acetylhexosamine-1-kinase from *Bifidobacterium longum*, PmGlmU: *N*-acetylglucosamine uridylyltransferase from *Pasteurella multocida*, PmPpA: inorganic pyrophosphatase from *Pasteurella multocida*, NmLgtA:  $\beta$ -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase from *Neisseria meningitidis*,  $\beta$ -1,3GnT:  $\beta$ -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase, EcGalK: galactokinase from *Escherichia coli*, SpGalK: TIGR4 galactokinase from *Streptococcus pneumoniae*, BLUSP: UDP-sugar pyrophosphorylase from *Bifidobacterium longum*, NmLgtB:  $\beta$ -1,4-*N*-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*, Bc $\beta$ -Gal-3:  $\beta$ -D-galactosidase from *Bifidobacterium circulans*; lacto-*N*-triose II: GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; 3'GalLac: Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNT: Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnT: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc.



**Fig. 9.** Enzymatic reactions used to produce LNT. Abbreviations used:  $\beta$ -1,3-GnT:  $\beta$ -1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase; Bc $\beta$ -Gal-3:  $\beta$ -D-galactosidase from *Bacillus circulans*; Aof $\beta$ -Gal-3:  $\beta$ -D-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, lacto-*N*-triose II: GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNT: Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc.

branched type 2 core structures F-LNnH I (17), have not been clearly determined. Table 8 also lists the synthesis of structures that may exist in human milk, although the identity of the isomers is not clearly reported or not yet identified. In all cases, these oligosaccharides are synthesized as free reducing sugars.

**3.1.2.1. 2'-fucosyllactose (2'FL, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4Glc) (12).** 2'FL (12) was produced using fucosyltransferases or the glycosynthase activity of fucosidases.

The most remarkable enzymatic synthesis at mg scale provided the trisaccharide with a 51% overall yield using the *H. pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase FucT2 (N-terminal part of FutC) (Table 8, entry 1) (Albermann et al., 2001). First, GDP-L-fucose is produced from GDP-D-mannose and NADPH using GDP-D-mannose 4,6-dehydratase (Gmd) and GDP-L-fucose synthetase (WcaG) with a 78% yield (Albermann et al., 2001). Then, the FucT2 transfers Fuc from GDP-L-fucose to lactose with a 65% yield (Albermann et al., 2001).

The linker-conjugated version in a glycan microarray was obtained by Boons and coworkers using the human fucosyltransferase FUT1 expressed in HEK293 suspension cultures (Prudden et al., 2017).

Additionally, inverting *Bifidobacterium bifidum*  $\alpha$ 1,2-L-fucosynthase (BbAfcA) mutants, N423H and N423D/D766N (Table 8, entry 2), where N423 activated by the neighboring D766 acts a base residue, exhibited sufficient efficiency to produce 2'FL (12) from  $\beta$ -L-fucosyl fluoride (10 mM) and lactose (10 mM) at an 88% yield (Sugiyama et al., 2016).

**3.1.2.2. 2',3-Difucosyllactose (2'3FL or DFL, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)Glc) (13).** As a transfucosidase, different engineered mutants of  $\alpha$ 1,3/4 fucosidase from *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 produced DFL (13) from 3FL (29) as a donor and 2'FL (12) as an acceptor at a 1:1 ratio with yields up to 59% (Table 8, entry 3) (Champion et al., 2016; Saumonneau et al., 2015). This compound

was also obtained linked in a glycan microarray using the combination of the human fucosyltransferases FUT1 and FUT3 (Prudden et al., 2017).

**3.1.2.3. Lacto-*N*-fucopentaose I (LNFP I, Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (14).** Fucosyltransferases or the glycosynthase activity of fucosidases had been applied to the synthesis of LNFP I (14).

Gram-scale synthesis of LNFP I (14) was recently achieved using the *Thermosynechococcus elongates* BP-1  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase that has high fucosyltransferase activity towards  $\beta$ 1,3-linked galactosides (Li et al., 2015) (Table 8, entry 5). The one-pot, three-enzyme fucosylation system employing recombinant bifunctional L-fucokinase/GDP-fucose pyrophosphorylase from *Bacteroides fragilis*, *Pasteurella multocida* inorganic pyrophosphatase and *T. elongates* fucosyltransferase converted Fuc to GDP-Fuc, which is transferred to LNT (4) to achieve 1.1 g of LNFP I (14) (95% yield).

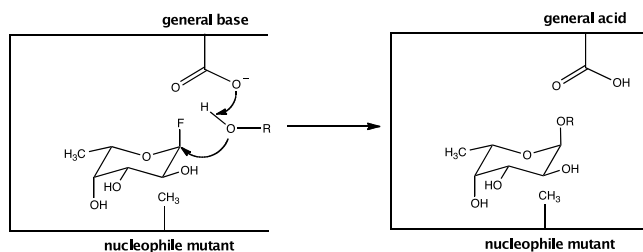
Also, the recombinant human fucosyltransferase I (FUT1) enzyme expressed in a baculovirus system (Mine et al., 2010) efficiently fucosylates LNT (4) with an  $\alpha$ 1,2 linkage to produce LNFP I (14) (Table 8, entry 4). This pentasaccharide was obtained through three enzymatic steps starting from lactose and UDP-GlcNAc to obtain Lacto-*N*-triose II (2), further galactosylation with oNP-Gal (Table 7, entries 4 and 8) and final fucosylation with an overall yield of 71% (3 mg).

Using fucosidases, the *Bifidobacterium bifidum* fucosynthase N423H mutant produced LNFP I (14) from  $\beta$ -L-fucosyl fluoride (10 mM) and LNT (4) (10 mM) at a 75% yield (Table 8, entry 6) (Sugiyama et al., 2016).

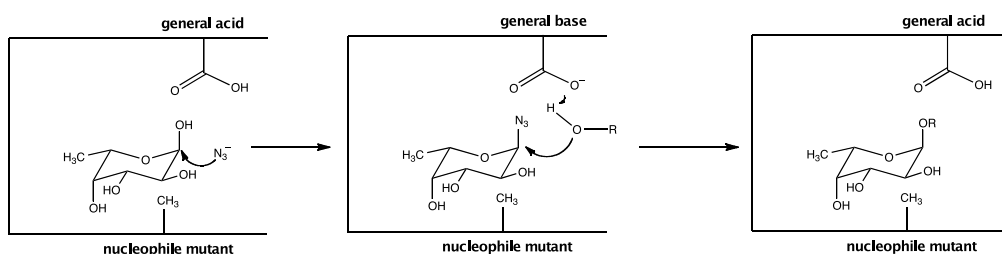
**3.1.2.4. Lacto-*N*-fucopentaose II (LNFP II, Gal $\beta$ 1,3(Fuca1,4)GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (15).** LNFP II (15) was produced using redesigned  $\alpha$ -fucosidases. As a glycosynthase, the retaining *Bifidobacterium bifidum* 1,3-1,4- $\alpha$ -fucosidase D703S mutant was able to synthesize LNFP II (15) from  $\beta$ -L-fucosyl fluoride and LNT (4) at a 41% yield based on  $\beta$ -FucF (Table 8, entry 7) (Sakurama et al., 2012). As a transfucosidase, the engineered mutants of  $\alpha$ 1,3/4 fucosidase from *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 produced LNFP II (15) from 3FL as the donor and LNT (4) as the acceptor at a 1:1 ratio with yields up to 47% (Table 8, entry 8) (Champion et al., 2016; Saumonneau et al., 2015). In most cases, the transglycosylation/hydrolysis ratio was improved more than 1000-fold compared to the wild-type enzyme.

**3.1.2.5. Lacto-*N*-fuconeopentaose III (LNFP III, Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (16).** LNFP III (16) was produced using fucosyltransferases or the transfucosidase activity of fucosidases.

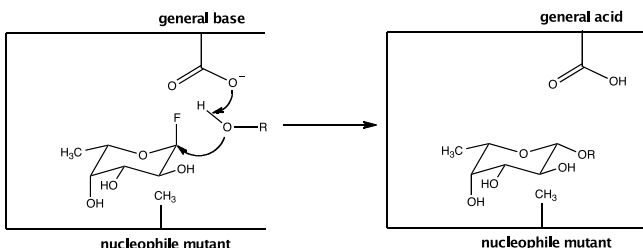
## A) Retaining fucosynthase



## B) Retaining fucosynthase through chemical rescue



## C) Inverting fucosynthase

Fig. 10. General glycosynthase strategies for retaining and inverting  $\alpha$ -L-fucosidases.

Partially purified  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase from chicken serum performed the reaction between GDP-Fuc and LNnT (5), for 10 days and produced the pentasaccharide at a 20% yield (Table 8, entry 9) (Totani et al., 2002).

The linker-conjugated version of this compound was obtained in a glycan microarray by Boons and coworkers using the human fucosyltransferase FUT9 expressed in HEK293 suspension cultures (Prudden et al., 2017).

In another approach, the  $\alpha$ 1,3/4 fucosidase from *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 not only regioselectively fucosylates the  $\alpha$ 1,4 GlcNAc of type 1 HMOs but also the  $\alpha$ 1,3 GlcNAc of type 2 HMOs (Table 8). Using transucosidase activity, the engineered mutants of  $\alpha$ 1,3/4 fucosidase from *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697, such as S168E-A174H-V221A-V282R or W135E-A174F-N216D-V221A, produced LNFP III (16) from 3FL (29) as the donor and LNnT (5) as the acceptor at a 1:1 ratio with a 50% yield (Table 8, entry 10) (Champion et al., 2016a; Saumonneau et al., 2015).

3.1.2.6. *Lacto-N-difucohexaose I (LNDFH I, Fuca1,2Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc) (17)*. LNDFH I (17) was also produced using fucosyltransferases or the transucosidase activity of fucosidases.

Commercial human fucosyltransferase III (FUT3) was able to  $\alpha$ 1,4-fucosylate LNFP I and generate LNDFH I (17) at an 85% yield (Table 8, entry 11) (Miyazaki et al., 2010). The overall yield of the synthesis reaction over the four enzymatic steps to form LNT (4) (Table 7, entry 8) followed by successive fucosylation with  $\alpha$ 1,2-linkage on Gal and  $\alpha$ 1,4 linkage on GlcNAc was 6% at the mg scale (Table 7, entry 8 and Table 8, entries 4 and 11).

This hexasaccharide has also been obtained starting from 3FL and LNFP I (14) using the engineered mutants of  $\alpha$ 1,3/4 fucosidase from *Bifidobacterium longum subsp. infantis* that functions as a transucosidase and formed the new  $\alpha$ 1,4 linkages at a 40% yield (Table 8, entry 12) (Champion et al., 2016a; Saumonneau et al., 2015).

3.1.2.7. *F-p-Lacto-N-neohexaose (F-p-LNnH or IFLNH III, Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3 Galβ1,4Glc) (18)*. This type 2 heptasaccharide was also generated using the  $\alpha$ 1,3/4 fucosidase from *Bifidobacterium longum subsp. infantis*. (Table 8, entry 13). The S168E-A174H-V221A-V282R mutant produced the heptasaccharide at a 52% yield from 3FL (13) and p-LNnH (10) (Champion et al., 2016a; Saumonneau et al., 2015).



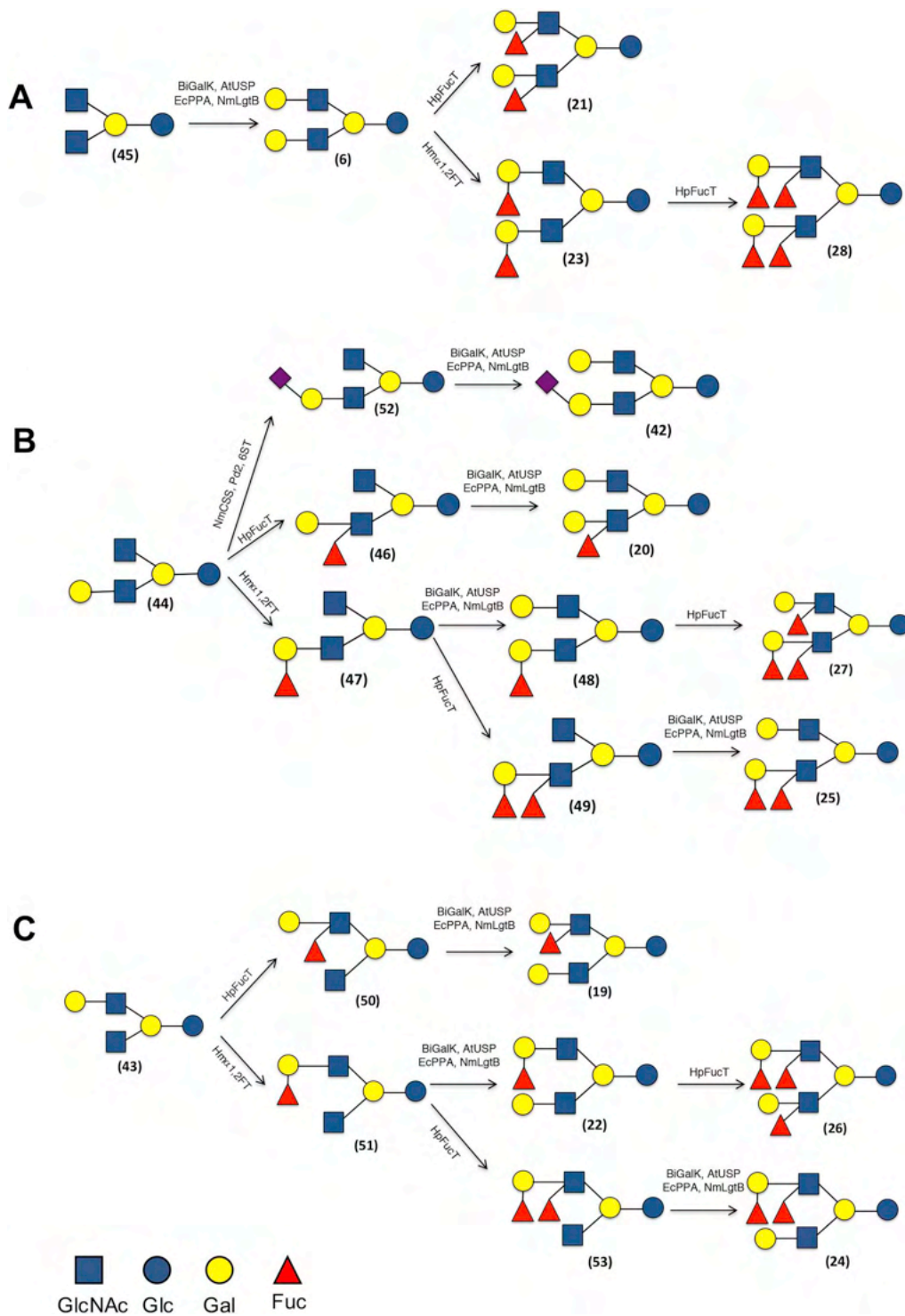


Fig. 11. Production of fucosylated LNnH derivatives using chemoenzymatic strategies. Abbreviations used: BiGalK: galactokinase from *Bifidobacterium infantis*, AtUSP: pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana*, NmLgtB:  $\beta$ 1-4-N-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*; EcPPA: inorganic pyrophosphatase from *Escherichia coli*; NmCSS: CMP-sialic acid synthetase from *Neisseria meningitidis*; Pd2,6ST:  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase from *Photobacterium damsela*; HpFucT:  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase from *Helicobacter pylori*; Hpa1,2FT:  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase from *Helicobacter mustelae*. Symbol legend indicated in Fig. 4.

**3.1.2.8. F-Lacto-N-neohexaose I (F-LNnH I, Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (19).** Approximately 1 mg of F-LNnH I (19) was obtained using the chemoenzymatic strategy reported by the Wang group (Xiao et al., 2016) (Table 8, entry 14). First, the tetrasaccharide GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc (42) was prepared using the convergent chemical synthesis from *N*-acetylglucosaminyl bromide, lactosaminyl and lactosyl derivatives at a 67% yield over four steps (85 mg). Then, it was fucosylated (49) using the *Helicobacter pylori* α1,3-fucosyltransferase (HpFucT), which interestingly is only able to add the fucosyl moiety on the GlcNAc of the lactosaminyl moiety, and subsequently galactosylated using the one-pot multienzyme reaction with *N. meningitidis* β-1,4-galactosyltransferase (Table 7, entry 12) to produce this branched fucosylated HMO (19). These enzymatic steps were achieved in yields exceeding 90%, with an overall yield of 57%.

**3.1.2.9. F-lacto-N-neohexaose II (F-LNnH II, Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (20).** F-LNnH II (20) was also obtained using the chemoenzymatic synthesis strategy (Table 8, entry 15) (Xiao et al., 2016). The pentasaccharide Galβ1,4GlcNAcβ1,3(GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc (44) was synthesized from lactosaminyl, lactosyl and *N*-acetylglucosaminyl derivatives at a 53% yield in four steps. The saccharide was then fucosylated (46) by the *H. pylori* α1,3-fucosyltransferase HpFucT and GDP-Fuc and finally galactosylated with yields greater than 90% (Fig. 11B). The overall yield was 45%.

The same strategy was performed for the linker-conjugated version in a glycan microarray with the human fucosyltransferase FUT5 expressed in HEK293 cell cultures (Prudden et al., 2017).

**3.1.2.10. DF-lacto-N-neohexaose (DF-LNnH, Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (21).** DF-LNnH (21) was obtained from LNnH (6) produced by the chemoenzymatic synthesis described above (Fig. 11A). Fucosylation with *H. pylori* α1,3-fucosyltransferase HpFucT and GDP-Fuc produced 2.3 mg of this compound at a 95% yield (Table 8, entry 16). The overall yield from *N*-acetylglucosaminyl bromide and lactosyl derivatives corresponded to 71% (Xiao et al., 2016). The same strategy was used for the azidopropyl derivative starting from the glycosyl imidate donor and the azidopropyl lactoside derivative (Han et al., 2016).

The linker-conjugated version in a glycan microarray was obtained following F-LNnH II (20) synthesis and further fucosylation using the human fucosyltransferase FUT5 (Prudden et al., 2017).

**3.1.2.11. F-LNnH I, F-LNnH II, and DF-LNnH (19, 20, 21).** The reaction between 3FL (13) and LNnH (6) using an engineered mutant of α1,3/4 fucosidase from *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, such as L321P, produced a mixture of these three fucosylated products by forming an α1,3-linkage at yields less than 20% (Table 8, entry 17) (Saumonneau et al., 2015).

**3.1.2.12. Other fucosylated branched oligosaccharides.** Other fucosylated compounds that may possibly exist in human milk (De Leoz et al., 2013; Underwood et al., 2015; Wu et al., 2010) have also been synthesized (Fig. 10). The branched LNnH can be regioselectively α1,2 and α1,3-fucosylated and some compounds were synthesized at the mg scale (Table 8) (Xiao et al., 2016). Others, such as fucosylated p-LNnH (IFLNH I, DF-p-LNnH and TF-p-LNnH), were also reported but were only obtained in a glycan microarray (Prudden et al., 2017). These three compounds correspond to Galβ1,3GlcNAcGalβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc, Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcGalβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc, and Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcGalβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3Galβ1,4(Fuca1,3)Glc, respectively.

**3.1.2.12.1. α1,2-Fucosylated lacto-N-neohexaose I (1,2F-LNnH I, Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (22).** This oligosaccharide is named 1,2F-LNnH I (22) in this review and it is one of

the possible isomers of 4120 or F-LNnH present in milk (Underwood et al., 2015) (Fig. 11C). The tetrasaccharide GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc (43) was first chemically synthesized and the *Helicobacter mustelae* α1,2-fucosyltransferase (Hmα1,2FT) was able to accept this branched HMO and add the fucosyl unit only to the Gal of the lactosaminyl moiety. Finally, the one-pot multienzyme galactosylation reaction afforded 1,2F-LNnH (22) (Table 8, entry 18). The overall yield from *N*-acetylglucosaminyl bromide, lactosaminyl and lactosyl derivatives was 55% (Xiao et al., 2016).

**3.1.2.12.2. α1,2-Difucosylated lacto-N-neohexaose (1,2DF-LNnH, Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (23).** This oligosaccharide is named 1,2DF-LNnH (23) in this review, and its synthesis was reported together with other difucosylated HMOs, although it is not clear whether this 4220 isomer is present in human milk (De Leoz et al., 2013; Underwood et al., 2015; Wu et al., 2010) (Fig. 11A). After the chemoenzymatic synthesis of LNnH (6) (Table 7, entry 16), Hmα1,2FT was able to fucosylate the two terminal Gal units at a 93% yield (Table 7, entry 19). The overall yield from *N*-acetylglucosaminyl bromide and lactosyl derivatives was 69% (Xiao et al., 2016).

**3.1.2.12.3. α1,2-1,3Difucosylated lacto-N-neohexaose I (1,2-1,3DF-LNnH I, Galβ1,4GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (24).** This oligosaccharide, here named 1,2-1,3DF-LNnH I (24), is included in this review, although it is not clear whether this 4220 isomer is present in human milk (De Leoz et al., 2013; Underwood et al., 2015; Wu et al., 2010) (Fig. 11C). After the chemical synthesis of GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc (43) and fucosylation with HpFucT on the GlcNAc of the lactosaminyl moiety (39) and finally galactosylated with the one-pot multienzyme system to produce the mixed-linked difucosylated oligosaccharide (24) (Table 8, entry 20). These three enzymatic steps resulted in a 77% yield, and the overall yield from *N*-acetylglucosaminyl bromide, lactosaminyl and lactosyl derivatives was 52% (Xiao et al., 2016).

**3.1.2.12.4. α1,2-1,3Difucosylated lacto-N-neohexaose II (1,2-1,3DF-LNnH II, Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (25).** In this case, this oligosaccharide is named 1,2-1,3DF-LNnH II (25) (Fig. 11B). It was obtained from the same sequential enzymatic reactions as 1,2-1,3-DF-LNnH II (24), but the starting oligosaccharide was the pentasaccharide Galβ1,4GlcNAcβ1,3(GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc (44) (Table 8, entry 21). The overall yield of the chemoenzymatic synthesis from lactosaminyl, lactosyl and *N*-acetylglucosaminyl bromide derivatives was 40% (Xiao et al., 2016).

**3.1.2.12.5. α1,2-1,3Trifucosylated lacto-N-neohexaose I (1,2-1,3TriF-LNnH I, Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (26).** This oligosaccharide is one of the 4320 isomers, but this structure has not been identified in human milk (Wu et al., 2010), and it is named 1,2-1,3TriF-LNnH I (26) in this review (Fig. 11C). Following 1,2F-LNnH (22) synthesis (Table 8, entry 18), HpFucT accepts this branched oligosaccharide and α1,3-fucosylates the two GlcNAc units of the lactosaminyl moieties to produce 0.4 mg of compound 26 (93% yield) (Table 8, entry 22). The overall yield from *N*-acetylglucosaminyl bromide, lactosaminyl and lactosyl derivatives, building blocks of pentasaccharide (43) was 51% (Xiao et al., 2016).

**3.1.2.12.6. α1,2-1,3Trifucosylated lacto-N-neohexaose II (1,2-1,3TriF-LNnH II, Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc) (27).** 1,2-1,3-triF-LNnH I (27) may be one of the 4320 isomers present in human milk, although it has not been identified (Wu et al., 2010) (Fig. 11B). After the chemical synthesis of Galβ1,4GlcNAcβ1,3(GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc (44), three steps were performed to produce this trifucosylated oligosaccharide (27): fucosylation with Hmα1,2FT on the terminal Gal (47), galactosylation (48) with the one-pot multienzyme system and finally α1,3-fucosylation with HpFucT on the GlcNAc of the lactosaminyl moieties (Table 8, entry 23). These enzymatic steps resulted in an 81%

yield, and the overall yield from lactosaminyl, lactosyl and *N*-acetylglucosaminyl bromide derivatives was 43% (Xiao et al., 2016).

3.1.2.12.7. *α*1,2-1,3Tetra-fucosylated lacto-*N*-neohexose (1,2-1,3TF-LNnH,

*Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,3(Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc*) (28). 1,2-1,3-TF-LNnH (28) has not been identified among the few tetra-fucosyl HMOs present in human milk (67,150,151). It has been obtained by fucosylation of 1,2DF-LNnH (23) (Table 8, entry 19) with HpFucT on GlcNAc from lactosaminyl moieties to achieve a few milligrams of 1,2-1,3TF-LNnH (28) at a 95% yield (Table 8, entry 24). The overall synthesis from *N*-acetylglucosaminyl bromide and lactosyl derivatives, the building blocks of tetrasaccharide GlcNAcβ1,3(GlcNAcβ1,6)Galβ1,4Glc (44), was 66% (Xiao et al., 2016).

### 3.1.3. Sialylated HMOs

A diverse range of sialylated HMOs was produced using either sialyltransferases with their corresponding CMP-NeuAc donor and trans-sialidases using sialylated oligosaccharide donors or sialidases exhibiting trans-sialidase activity.

While mammalian sialyltransferases expressed on HEK293 cells have been used to generate different sialyl/fucosyl oligosaccharide conjugates in glycan microarrays, different bacterial sialyltransferases have been successfully applied to produce  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-sialylated HMOs at the preparative scale (Table 9). These GTs have been extensively engineered due to their multifunctionality (McArthur et al., 2017; Schmölzer et al., 2015; Sugiarto et al., 2011, 2012; Yu et al., 2005). For example, the M144D mutant of *Pasteurella multocida* ST (PmST1) was engineered to favor  $\alpha$ 2,3 sialoside synthesis while decreasing  $\alpha$ 2,3-sialidase activity and donor hydrolysis (Sugiarto et al., 2011, 2012), and was shown to be an efficient biocatalyst for  $\alpha$ 2,3-sialylated HMOs (Jantscher-Krenn et al., 2012b; Yu et al., 2014). In addition, the P34H/M144L mutant from PmST1 and P7H and P7H/M117A from *Pasteurella dagmatis* provided a complete switch from  $\alpha$ 2,3 to  $\alpha$ 2,6 regioselectivity (McArthur et al., 2017; Schmölzer et al., 2015).

Most sialylation reactions are performed between the activated NeuAc donor and acceptors with linear structures, but, interestingly, some enzymes have been engineered to sialylate branched fucosylated oligosaccharides (Santra et al., 2016; Vogel et al., 2016). The PmST1 M144D mutant catalyzes sialyl transfer to branched fucosyl Lewis X and sulfo Lewis X derivatives at the preparative scale (Santra et al., 2016; Sugiarto et al., 2012), whereas *Photobacterium damsela* ST (Pd2,6ST) catalyzes the sialylation of branched type 2 oligosaccharides (Xiao et al., 2016). At the preparative scale, the CMP-NeuAc donor is always

produced *in situ* from GlcNAc or Man, together with nucleotide cofactor regeneration (Ichikawa et al., 1991; Li et al., 2008; Suk Woo et al., 2014).

Trans-sialidase activity has also been used to prepare  $\alpha$ -sialylated HMOs at the preparative scale (Table 9) using the  $\alpha$ 2,3-trans-sialidases from *Trypanosoma cruzi* (Pelletier, 2004; Sallomons et al., 2011) and sialidases from *Arthrobacter ureafaciens* or *Bifidobacterium infantis* (McJarrow et al., 2003). In addition, the  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase from *Photobacterium leiognathi* has been extensively engineered to increase its transglycosylating activity and thermostability (Champion et al., 2016b; Vogel et al., 2016). For example, the A218Y-N222R-G349S-S412P-D451K mutant was able to regioselectively synthesize 6'SLNnT starting from the non-activated donor 6'SL, with yields up to 45%.

The sialylated HMOs obtained at least at the mg scale are summarized in Table 9.

3.1.3.1. *α*2,3-Sialyllacto-*N*-biose (3'SLNB, *NeuAca2,3Galβ1,3GlcNAc*) (38). 3'SLNB (38) is a common moiety of sialylated HMOs, such as LST a (40) and DSLNT (*NeuAca2,3Galβ1,3(NeuAca2,6)GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc*), and it was obtained at the mg scale using a sequential two-step multienzyme reaction. The first step was LNB (2) production from galactose, as described above (Table 7, entry 2). The second step was the one-pot, three-enzyme sialylation process developed by the Chen group employing *Pasteurella multocida* sialic acid aldolase, *N. meningitidis* CMP-sialic acid synthetase, and *P. multocida*  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase, where ManNAc is converted to CMP-NeuAc for transfer to LNB (1) at a 94% yield (Table 9, entry 1) (Lau et al., 2011). The overall yield from galactose was 89%.

3.1.3.2. *α*2,3-Sialyllactose (3'SL, *NeuAca2,3Galβ1,4Glc*) (37). Remarkably, the first gram-scale synthesis of 3'SL (37) was achieved using the *Neisseria meningitidis*  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase fused with the CMP-NeuAc synthetase (Gilbert et al., 1998). The one-pot, two-step reaction with lactose, sialic acid, phosphoenolpyruvate and catalytic amounts of ATP and CMP was able to regenerate CMP-NeuAc and produce 3'SL (37) with an overall yield of 68% (Table 9, entry 2).

The *Pasteurella multocida* sialyltransferase (PMST1) was also applied in a one-pot, three-enzyme sialylation reaction to obtain 3'SL (37) at a good yield (Table 9, entry 3) (Yu et al., 2005), which was subsequently improved with the E271F/R313Y and M144D mutants.

The linker-conjugated version in a glycan microarray was obtained after sialylation of the lactosyl derivative using the human sialyltransferase ST3Gal4 (Prudden et al., 2017).

**Table 9**

Sialylated HMOs produced using enzymatic synthesis.

HMO	Entry	Enzyme	Substrates	Amount (yield)	Reference
3'SLNB (38)	1	PmST1, NmCSS, <i>Pm</i> aldolase	LNB (from 2), ManNAc, pyruvate, CTP	69 mg (94%)	Lau et al. (2011)
3'SL (37)	2	$\beta$ NmST, NmCSS	Lactose, CMP, Neu5Ac, ATP	77g (68%)	Gilbert et al. (1998)
	3	<i>Ec</i> aldolase, NmCSS, PmST1	CMP-Neu5Ac, lactose, <i>N</i> -acetylmannosamine/mannose	n.p. (79%)	Yu et al. (2005)
	4	$\alpha$ 2,3-trans-sialidase	Milk	3'SL: 255 $\mu$ g/mL 3'SL per gram of solid: 0.29%	Pelletier (2004)
	5	Sialidase	Glycomacropeptide (GMP), lactose	5.5 mg	McJarrow et al. (2003)
6'SL <sup>a</sup> (39)	6 <sup>a</sup>	<i>Ec</i> aldolase, NmCSS, PdST	ManNAc, pyruvate, CTP, azidopropylactose	24.5 mg (98%) <sup>a</sup>	Yu et al. (2006)
LST a <sup>a</sup> (40)	7 <sup>a</sup>	<i>Ec</i> aldolase, NmCSS, PmST1	ManNAc, pyruvate, CTP, azidopropylLNT	n.p. (89%) <sup>a</sup>	Yao et al. (2015)
LST c (41)	8	PIST mutant, A218Y-N222R-G349S-S412P-D451K	6'SL, LNnT	n.p. (45%)	Champion et al. (2016b) and Vogel et al. (2016)
	9 <sup>a</sup>	<i>Ec</i> aldolase, NmCSS, PmST1 P34H/M144L	ManNAc, pyruvate, CTP, Azidopropyl, LNnT	37.7 mg (90%)	McArthur et al. (2017)

Abbreviations: n.p.: not provided, PmST1: multifunctional  $\alpha$ 2-3sialyltransferase from *Pasteurella multocida*; NmCSS: CMP-sialic acid synthetase from *Neisseria meningitidis*; *Pm* aldolase: sialic acid aldolase from *Pasteurella multocida*; NmST:  $\alpha$ 2-3sialyltransferase from *Neisseria meningitidis*; *Ec* aldolase: sialic acid aldolase from *Escherichia coli*; PmST1: sialyltransferase from *Pasteurella multocida*; PmST:  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase from *Pasteurella multocida*; PIST:  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase from *Photobacterium leiognathi*; 3'SLNB: *NeuAca2,3Galβ1,3GlcNAc*; 3'SL: *NeuAca2,3Galβ1,4Glc*; 6'SL: *NeuAca2,6Galβ1,4Glc*; LST a: *NeuAca2,6Galβ1,3Glcβ1,3Galβ1,4Glc*; LST c: *NeuAca2,6Galβ1,4Glcβ1,3Galβ1,4Glc*.

<sup>a</sup> Compounds obtained as conjugates instead of reducing sugars.

In another approach, 6'SL (37) was obtained using *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase (Pelletier, 2004) and the trans-sialidase activity of *Arthrobacter ureafaciens* or *Bifidobacterium infantis* sialidases (McJarrow et al., 2003). These enzymes were able to transfer the sialyl moiety from GMP (desialylated complex mixture glycomacropptide from dairy sources) as the donor to lactose as the acceptor and afford 6'SL (37) (Table 9, entries 4 and 5).

**3.1.3.3.  $\alpha$ 2,6-Sialyllactose (6'SL, NeuAca2,6Gal $\beta$ 1,4Glc) (39).** Different sialyltransferases could be applied for the synthesis of 6'SL (39) at preparative scale. The multifunctional *Photobacterium damsela*  $\alpha$ 2,6-ST enzyme catalyzes the  $\alpha$ 2,6-sialylation of both terminal and internal Gal or GalNAc moieties. It was used to prepare  $\alpha$ 2,6-sialyl azidopropylactoside (Yu et al., 2006),  $\alpha$ 2,6-sialyl- $\alpha$ 2,3-sialyllactose (Yu et al., 2014), and  $\alpha$ 2,6-disialyl derivatives of LNT (4) and LNnT (5) at the mg scale; these derivatives are not present in human milk but were shown to be as effective at protecting neonatal rats from necrotizing enterocolitis as DSLNT (Yu et al., 2014). 6'SL (39) could be obtained as the corresponding azidopropylactoside derivative (Table 9, entry 6).

Interestingly, the 2,3-sialyltransferase activity of *Pasteurella dagmatis* and PmST1 have been redesigned as a regioselective  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (McArthur et al., 2017; Schmölzer et al., 2015). When mono- $\alpha$ 2,6-sialylated HMOs and/or selective sialylation of the terminal Gal are needed, these mutants are very good biocatalysts. The P7H/M117A mutant of *P. dagmatis* ST produced 6'-sialyllactose (39) at a 72% yield (analytical scale). In addition, the *Photobacterium leiognathi* sialyltransferase was engineered as a trans-sialidase that retained its sialyltransferase activity and was able to synthesize 6'SL (39) from CMP-sialic acid and lactose (Vogel et al., 2016). These promising results at analytical scale show that these enzymes could be used to synthesize 6'SL (39) at a larger scale, as well as 6'SLNB (NeuAca2,6Gal $\beta$ 1,3GlcNAc).

The human sialyltransferase ST6GAL1 was also used to obtain the linker-conjugated version in a glycan microarray (Prudden et al., 2017).

**3.1.3.4.  $\alpha$ 2,6-Sialyllacto-N-tetraose (LST a, NeuAca2,6Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (40).** LST a (40) could be obtained using the one-pot, three-enzyme system for sialylation with PMST1 on LNT (4) (Table 9, entry 7<sup>+</sup>) as described in the chemoenzymatic synthesis of the 3-azidopropyl LST a (40) derivative (Yao et al., 2015). First, 3-azidopropyl LNT (4) was obtained using convergent synthesis and then sialylation afforded the LST a (40) derivative at an 89% yield.

**3.1.3.5.  $\alpha$ 2,6-Sialyllacto-N-neotetraose (LST c, NeuAca2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (41).** LST c (41) was successfully prepared at preparative scale using engineered mutants of  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase from *Photobacterium leiognathi* (Champion et al., 2016b; Vogel et al., 2016). The A218Y-N222R-G349S-S412P-D451K mutant, which functions as a trans-sialidase and is capable of transferring the sialyl moiety from 6'SL (39) to LNnT (5), achieved regioselective sialylation of the terminal galactose unit to generate LST c (41) as a single product when conversions were less than 45% (Table 8, entry 8). The reaction mixture containing 6'SL (39), LNnT (4) and LST c (41) was assayed as HMO combinations to evaluate their effects on modulating the microbiome in humans and preventing infections in rats (Champion et al., 2016b).

While wild-type PMST1 transfer the sialic acid residue to the terminal Gal in LNnT (5), producing the  $\alpha$ 2,3 sialyl LNnT, which is not present in the human milk and did not mimic the preventative effect on necrotizing enterocolitis (Yu et al., 2014), the PmST1 P34H/M144L mutant was highly selective and produced the  $\alpha$ 2,6-sialyl lacto-N-neotetraoside derivative (LNnT $\beta$ ProN3) at a 90% yield in the mg scale (McArthur et al., 2017). Therefore, LST c (41) could also be produced using this biocatalyst (Table 9, entry 9<sup>+</sup>).

Additionally, the human sialyltransferase ST6GAL1 was able to

perform  $\alpha$ 2,3-sialylation on a conjugated LNnT derivative in a glycan microarray (Prudden et al., 2017).

**3.1.3.6.  $\alpha$ 2,6-Sialyllacto-N-neohexaose (S-LNnH II, NeuAca2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc) (42).** This oligosaccharide has also been detected in human milk (Underwood et al., 2015; Wu et al., 2010). It was obtained at the mg scale in a reaction starting from the pentasaccharide Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc (44). Further sialylation using *Photobacterium damsela*  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (52) and subsequent galactosylation with  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase NmLgtB afforded 2 mg of S-LNnH II (42) at a 90% yield. The overall yield of this chemoenzymatic synthesis was 48% from lactosaminyl, lactosyl and N-acetylglucosaminyl derivatives.

The linker-conjugated version in a glycan microarray was obtained using ST6GAL1 human sialyltransferase and bovine milk GalT1 galactosyltransferase, starting from the same pentasaccharide derivative Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc (Prudden et al., 2017). In this case, the pentasaccharide was synthesized enzymatically from the lactosyl derivative linked to the support. First, LNnT was obtained and then GlcNAc was transferred using the GCNT2 N-acetylglucosaminide  $\beta$ 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, which adds a  $\beta$ 1,6-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) at an internal galactosyl moiety that can be further extended.

**3.1.3.7. Other sialylated oligosaccharides.** No synthesis at the mg scale has been reported for the diasialyllacto-N-tetraose DSLNT, which is present in human milk. Only the linker-conjugated version in a glycan microarray was prepared following LNT synthesis using B3GNT2 and GalT1 glycosyltransferases and further sialylation with  $\alpha$ 2,3 and  $\alpha$ 2,6 using the human sialyltransferases, first ST3Gal4 and then ST6GALNAc5 (Prudden et al., 2017).

Other sialylated oligosaccharides have been synthesized at the mg scale, such as  $\alpha$ 2,6-disialyl LNT and LNnT (5) (Xiao et al., 2016; Yu et al., 2014), which are not present in human milk (Hong et al., 2014; Thurl et al., 2017), or branched oligosaccharides such as NeuAca2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc (Xiao et al., 2016), which is only present in monkey milk.

### 3.1.4. - Sialylated and fucosylated HMOs

Mixed sialyl and fucosyl HMOs are present in milk (Underwood et al., 2015; Wu et al., 2010), but to our knowledge, only the synthesis of the linker-conjugated version in a glycan microarray of 3'S3FL (NeuAca2,3Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)Glc) and FS-LNnH I or SFLNnH (NeuAca2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4 (Fuca1,3)GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc) has been reported (Prudden et al., 2017). The 3'S3FL derivative was obtained from lactose after sialylation and subsequent fucosylation with ST3GAL4 and FUT3 human glycosyltransferases, respectively. The FS-LNnH I derivative was produced following the synthesis of the S-LNnH II (42), as described above, and then fucosylated with FUT5 human fucosyltransferase (Prudden et al., 2017).

### 3.2. Cell factory approach

Promising strategies for HMO production have also been developed using metabolically engineered microorganisms. These methods are based on the utilization of recombinant whole cells that overexpress the corresponding heterologous glycosyltransferase genes and the genes involved in the biosynthesis of the sugar-nucleotide donors. This cell factory approach takes advantage of the metabolic machinery of the microorganism and the *in vivo* regio- and stereoselective activity of the glycosyltransferases. The functional expression of the glycosyltransferases, availability of their donor and acceptor substrates for transport into the cell or synthesis *in vivo*, as well as prevention of the product-inhibitory effects of the nucleotide byproducts on the synthetic enzymes, are the main goals of this approach.

Therefore, due to advances in synthetic biology and systems biology

**Table 10**  
Neutral non-fucosylated HMOs produced using metabolic engineering.

HMOs	Entry	Strain	Plasmidic genes expression	Cultivation	Yield (g/L)	Reference
lacto-N-triose II (2)	1	<i>E. coli</i> JM109 ( <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacY</i> <sup>+</sup> )	<i>lgaA</i>	Glycerol, Lac (5 g/L) Fed-batch	6 g/L	Priem et al. (2002)
LNT + lacto-N-triose II (2 + 4)	2	<i>E. coli</i> L1100 ( <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacA</i> <sup>-</sup> , <i>lgaA</i> <sup>+</sup> , <i>lucY</i> <sup>+</sup> , <i>fucIK</i> , <i>xyiAB</i> , <i>wbgO</i> <sup>+</sup> )		Gal (10g/L), Lac Fed-batch	12.7 g/L of LNT 13.7 g/L of lacto-N-triose II	Baumgärtner et al. (2015b)
	3	<i>E. coli</i> ( <i>nadC</i> <sup>-</sup> , <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacA</i> <sup>-</sup> , <i>lacY</i> <sup>+</sup> )	Strain A: <i>lgaA</i> , $\beta$ 1,3-gal Strain C: <i>nadC</i> , $\beta$ 1,3-gal	Glc, Lac	Strain A: LNT 100 <sup>a</sup> lacto-N-triose II/LNT 100 <sup>a</sup> Strain C: LNT 102 <sup>a</sup>	Papadakis et al. (2017)
LNT + LNnH (5 + 6)	4	<i>E. coli</i> JM109 ( <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacY</i> <sup>+</sup> )		Glc, Lac (5 g/L)	n.p.	Priem et al. (2002)
LNnH + LNnO + LNnD (6 + 8 + 11)	5	<i>E. coli</i> JM109 ( <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacY</i> <sup>+</sup> )	<i>lgaB</i> , <i>lgaA</i>	Glc, Lac (1 g/L)	n.p.	Priem et al. (2002)
LNT + pLNnH + lacto-N-triose II (5 + 11 + 2)	6	<i>E. coli</i> ( <i>nadC</i> <sup>-</sup> , <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacA</i> <sup>-</sup> , <i>LacY</i> <sup>+</sup> ) Strain A: <i>lgaA</i> , $\beta$ 1,4-gal chromosomally integrated Strain C: <i>lgaA</i> chromosomally integrated non antibiotic	<i>lgaB</i> , <i>lgaA</i> Strain A: - Strain C: <i>nadC</i> , $\beta$ 1,4-gal	Glc, Lac	Strain A: pLNnH/LNnT 100 <sup>a</sup> lacto-N-triose II/LNnT 100 <sup>a</sup> Strain C: pLNnH/LNnT 45 <sup>a</sup> lacto-N-triose II/LNnT 19 <sup>a</sup>	Papadakis et al. (2017)

Abbreviations: n.p.: not provided, lacto-N-triose II: GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; 3'GalLac: Gal $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNT: Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnT: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnH: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc; LNnD: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ 1,4Glc; pLNnH: Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc; Genes: *lacZ*:  $\beta$ -galactosidase; *lgaY*:  $\beta$ -galactoside permease; *lgaA*:  $\beta$ 1,3-N-acetyl-glucosaminyltransferase from *Neisseria meningitidis*; *wbgO*:  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase; *fucI*: fucose isomerase; *fucK*: fucose-degradation genes; *lacA*: galactoside O-acetyltransferase; *nadC*: nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase; *lgaB*:  $\beta$ 1,4-N-acetyl-glucosaminyltransferase from *Neisseria meningitidis*;  $\beta$ 1,4-gal:  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase;  $\beta$ 1,3-gal:  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase.  
<sup>a</sup> Titre relative to the amounts produced by Strain A taken as 100.





tools, particularly molecular biology tools and metabolic pathway assembly, the biosynthetic pathways have been modulated and microbial cell factories have been improved to achieve the desired molecules with moderate to good efficiencies.

To date, 42 HMO structures (including building blocks) have been produced using the cell factory approach. Tables 9–11 summarize the different HMOs that have been directly produced from engineered cells. Although the first HMO preparations were developed using a mixed microbial culture to produce fucosyl- and sialyllactose (Endo et al., 2000; Koizumi et al., 2000), HMOs are currently produced in single cell cultures. *E. coli* is the most common microorganism used for HMO production (Samain and Priem, 2001).

The range of oligosaccharide products produced using this *in vivo* method is currently restricted to small oligosaccharides comprising 3 to 10 monosaccharide units. Mimicking the biosynthetic strategy in the engineered cells, the glycosyltransferases of interest require specific acceptors that are not naturally present in the cytoplasm, and lactose supplied in the medium is the starting acceptor substrate for HMO production. Cells are engineered to overexpress the  $\beta$ -galactosidase permease (*lacY*) to actively internalize lactose, are devoid of the galactosidase activity (*lacZ*) and in some cases lactose acetyltransferase (*lacA*) (Fig. 12), and use other carbon sources that do not inhibit lactose uptake during HMO synthesis to increase lactose availability in the cytoplasm (Huang et al., 2017; Petschacher and Nidetzky, 2016; Priem et al., 2002; Sprenger et al., 2017).

The intracellular sugar-nucleotide donors used by the engineered glycosyltransferases are also common precursors of other cellular structures, and their availability has often been modulated (Fig. 12). The donor substrates for the recombinant *N*-acetylglucosaminyl and galactosyltransferases UDP-GlcNAc and UDP-Gal are intracellular intermediates of *E. coli* (Neidhardt et al., 1996; Raets and Whitfield, 2002). UDP-GlcNAc, which is synthesized from fructose 6-phosphate (Barreteau et al., 2008), is a precursor in peptidoglycan, lipopolysaccharide, and enterobacterial antigen biosynthesis (Neidhardt et al., 1996), whereas UDP-Gal, which forms from glucose-6-phosphate (Frey, 1996), is a precursor substrate of lipopolysaccharide and colanic acid biosynthesis. GDP-Fuc, the donor of the fucosyltransferases, is also an intracellular intermediate that is synthesized by the *de novo* biosynthetic pathway from mannose 1-phosphate and GTP, but not by the salvage pathway that is only present in eukaryotes and *Bacteroides fragilis* (Albermann et al., 2000; Coyne et al., 2005; Han et al., 2012; Koizumi et al., 2000; Lee et al., 2012; Mattila et al., 2000; Sturla et al., 1997). In contrast, CMP-NeuAc, the donor of the sialyltransferases, is not present in nonpathogenic *E. coli* strains, and only some pathogenic microorganisms are able to synthesize it. Therefore, CMP-NeuAc is produced by the heterologous expression of the required enzymes for CMP-NeuAc biosynthesis from sialic acid supplied in the medium or from the endogenous UDP-GlcNAc.

The produced oligosaccharides are retained in the cell, except for trisaccharides that are partially or completely released. Consequently, different downstream processes have been developed.

In most cases, the cell factory approach does not produce a unique HMO but a mixture of oligosaccharides, and the different HMO combinations are indicated in this review (Tables 9–11). In addition, efforts to produce engineered strains without plasmids to avoid plasmid loss and antibiotic markers are also in progress, with the aim of fulfilling GRAS status (see the review by Sprenger et al., 2017 (Sprenger et al., 2017)).

### 3.2.1. Neutral non-fucosylated oligosaccharides

Table 10 summarizes the production of neutral non-fucosylated oligosaccharides obtained at least at the mg scale using the cell factory approach. In these engineered cells, the production of HMOs greater than lacto-*N*-triose II (2) requires at least two distinct glycosylation steps that will be successful if both GTs present different substrate affinity for lactose and for the new intermediates. Using LNT (4) as an

example, the  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase should exhibit a strong affinity for lactose but not for lacto-*N*-triose II (2), and the  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase should accept lacto-*N*-triose II (2) and not, or poorly accept, lactose.

The glycosyltransferases LgtA and LgtB, which have been applied in the *in vitro* enzymatic syntheses of lacto-*N*-triose II (2) and LNnT (5) (Table 7), are functional in *E. coli* and have been used in this approach. For LNT (4) production, the *Escherichia coli* O55:H7  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (*wbgO*) is used instead of the mammalian galactosyltransferase GalT1. In all reported cases, UDP-GlcNAc and UDP-Gal are not overproduced.

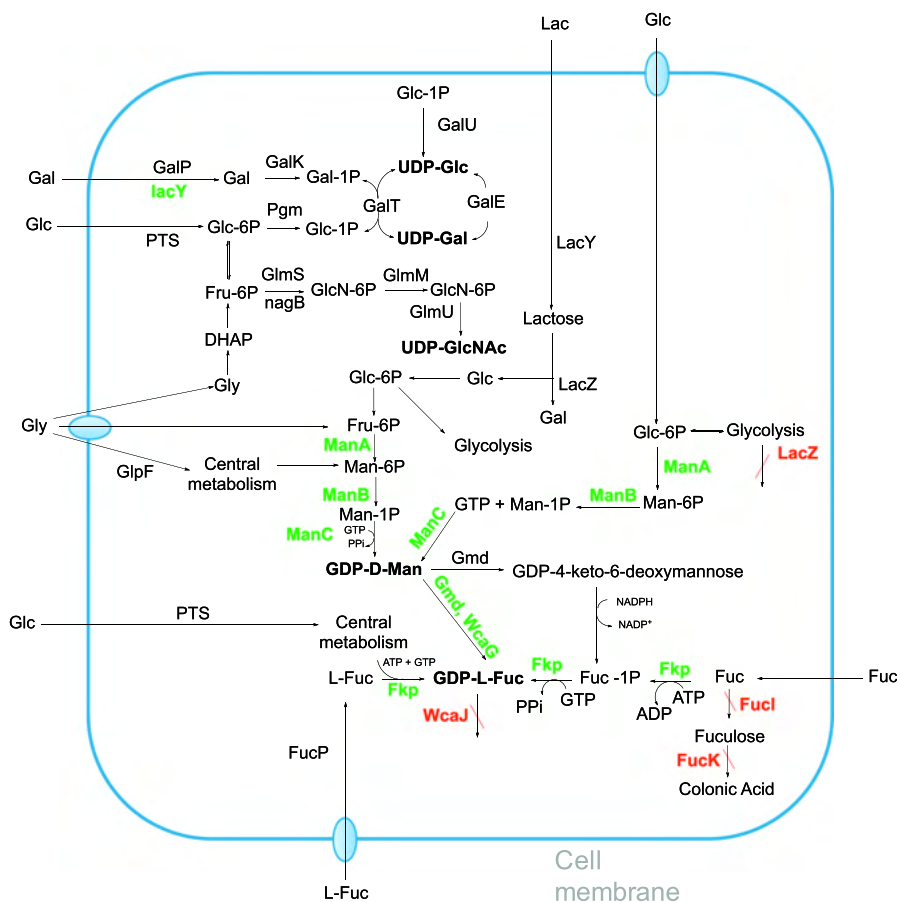
**3.2.1.1. Lacto-*N*-triose II (GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (2).** The first large-scale production of lacto-*N*-triose II (2) was reported by Priem and coworkers using engineered *E. coli* JM109 cells (*lacY*<sup>+</sup> *lacZ*<sup>-</sup>) at a 73% yield of the initial added lactose (Table 10, entry 1) (Priem et al., 2002). Lactose was transported into the cell by the  $\beta$ -galactoside permease *lacY* and intracellular lactose, which was not degraded because the cell is devoid of  $\beta$ -galactosidase activity, was glycosylated into lacto-*N*-triose II (2) by *Neisseria meningitidis*  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (NmLgtA) using the endogenous pool of UDP-*N*-acetylglucosamine. Lacto-*N*-triose II (2) was almost entirely detected in the extracellular medium.

**3.2.1.2. LNT + lacto-*N*-triose II (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc + GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (2 + 4).** Large-scale production of LNT (4) in whole cells was achieved in 2014 (Baumgärtner et al., 2014). The *E. coli* strain LJ110 (*lacY*<sup>+</sup> *lacZ*<sup>-</sup> *LacA*<sup>-</sup>) with chromosomally integrated *Neisseria meningitidis*  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (*lgtA*) and *E. coli* O55:H7  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (*wbgO*) genes was constructed. When glucose was used as the carbon source, lacto-*N*-triose II (2) was the major product, but only approximately 5% of the lactose was converted to LNT (4). Nevertheless, by substituting glucose with galactose, the yield of LNT (4) production was improved 3.6-fold, confirming that UDP-Gal conversion was the limiting step for LNT (4) synthesis (Baumgärtner et al., 2015b) (Table 10, entry 2). Remarkably, fed-batch cultivation with galactose improved the efficiency and produced 12.7 g/L of LNT (4) and 13.7 g/L of lacto-*N*-triose II (2).

With the aim of using antibiotic-free cultures, different *E. coli* strains have recently been developed by inactivating the chromosomal *nadC* gene (Papadakis et al., 2017) (Table 10, entry 3). This gene is involved in the NAD biosynthesis pathway starting from L-aspartate, and the cells can be cultured in a medium lacking salvage pathway NAD precursors such as nicotinic derivatives. The strain harboring the chromosomally integrated *lgtA* gene and a plasmid with a  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (whose origin was not reported) and *nadC* afforded the same LNT (4) productivity compared to the two-plasmid antibiotic marker strain and yielded less lacto-*N*-triose II (2) byproducts.

**3.2.1.3. LNnT + LNnH (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc + Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6Gal $\beta$ 1,4Glc) (5 + 6).** The first metabolic engineering strategy for LNnT (5) production used *E. coli* cells (*lacY*<sup>+</sup> *lacZ*<sup>-</sup>) coexpressing *Neisseria meningitidis* glycosyltransferases NmLgtA and NmLgtB. When they were grown on glucose and lactose was added at an initial concentration of 5 g/L (Table 10, entry 4), the tetra- and hexasaccharides LNnT (5) and LNnH (6) were mainly produced. Together with LNnO (8), they were mainly detected at intracellular sites (Priem et al., 2002). Yields are not depicted.

**3.2.1.4. LNnT + p-LNnH + lacto-*N*-triose II (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc + Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc + GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (2 + 5 + 10).** The second metabolic engineering strategy aimed at LNnT production without antibiotic markers and used the strains with chromosomally integrated *lgtA* and  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase genes or a plasmid carrying *nadC* and the native



**Fig. 12.** Different approaches used in *E. coli* for donor synthesis (de novo or salvage pathway) and acceptor availability: green: overexpression; red: knock-out; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; GalP: galactose permease; GalK: galactokinase; GalU: UTP-glucose 1-phosphate uridylyltransferase; GalE: UDP-glucose-4-epimerase; GalT: galactose-1-phosphate uridylyltransferase; phosphoglycerate mutase; PTS: phosphotransferase; GlmS: glutamine-fructose 6-phosphate aminotransferase; GlmM: GDP-mannose mannosyl hydrolase; nagB: glucosamine-6-phosphate deaminase; GlmU: bifunctional protein glmU; LacY: lactose permease; LacZ: galactosidase; GlpF: glycerol uptake facilitator protein; ManA: mannose 6-phosphate isomerase; ManB: phosphomannomutase; ManC: GDP-mannose pyrophosphorylase; Gmd: GDP-mannose 4,6-dehydratase; FcI: GDP-L-fucose synthase; WcaJ: UDP-glucose:undecaprenyl-phosphate glucose 1-phosphate transferase; Fkp: L-fucokinase/L-fucose 1-phosphate guanylyltransferase; Lon: Ion protease; FucI: fucose isomerase; FucK: fucokinase; FucP: L-fucose-permease; RcsA: transcriptional regulator; *wcaH*, *wcaI*, *wcaF*, *wcaK* and *wcaM*: genes involved in the colonic acid biosynthetic pathway. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

*lacY* (Papadakis et al., 2017) (Table 10, entry 5). The strain with chromosomal *lgtA* and a plasmid carrying the  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase gene yielded higher concentrations of LNnT (5) relative to LNnH (6) and lacto-*N*-triose II (3) than the strain with both genes (*lgtA*,  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase) in the chromosome and one plasmid *nadC* variant.

LNnT (5) is produced at industrial scale with proprietary strains that allow production without use of antibiotic (Sprenger et al., 2017).

**3.2.1.5. LNnH + LNnO isomer + LNnD isomer** ( $Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,3(Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,3)Gal\beta 1,4Glc + Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,3(Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,3)Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,6)Gal\beta 1,4Glc + Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,3(Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,3)Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,6)Gal\beta 1,4GlcNAc\beta 1,3)Gal\beta 1,4Glc$ ) (6 + 9 + 11). When lactose was added at 1 g/L under the same conditions as described for entry 4 (Priem et al., 2002), longer poly lactosamine products were generated and the major products were LNnH (6), LNnO (9) and LNnD (11) (Priem et al., 2002) (Table 10, entry 6). Interestingly, *in vivo* production of LNT does not

yield elongation products, in contrast to LNnT, in which elongation occurs by repetitive reactions of the *N*-acetylglucosaminyl- and galactosyltransferases.

### 3.2.2. Fucosylated HMOs

Several fucosylated oligosaccharides have also been produced using the cell factory approach (Table 11). The expression of different fucosyltransferases that are active in *E. coli* is required to achieve the desired fucosylation. *In vivo* fucosylation reactions are mainly catalyzed by recombinant *H. pylori* fucosyltransferases in *E. coli* cells. *H. pylori* Fut A, Fut B, FutC have been applied to fucosylate lactose and LNnT (5) with an  $\alpha$ 1,3-linkage and *H. pylori* FutC (whose N-terminal part is also called FucT2) has been used for the  $\alpha$ 1,2-fucosyl linkage. For the *in vivo* fucosylation of LNT (4), a few fucosyltransferases have recently been overexpressed. HpFutC is also active towards LNT (4) for  $\alpha$ 1,2-fucosylation and HpFut14 (also named as FucTIII or FucT1,4) is used for  $\alpha$ 1,4 fucosylation. Surprisingly, under *in vivo* conditions, HpFut14



also displays a significant  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase activity towards the glucosyl unit of lacto-*N*-triose II (3) and produces LNDFH II (Baumgärtner et al., 2015a). The  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase *Escherichia coli* O126 WbgL, *E. coli* O128, WbsJ and *Bacteroides fragilis* WcfW have also been assayed using lactose (Parkot et al., 2012). Recently, an *in vivo* screen of different  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferases and  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferases using lactose revealed that HpFutC and HpFutA produced the highest levels of 2'FL and 3FL, respectively (Huang et al., 2017).

The increase in intracellular GDP-L-fucose levels in *E. coli* has been studied and is crucial for the production of HMOs. Different strategies have been applied (Fig. 12): i) overproduction of the *de novo* biosynthetic enzymes involved in the conversion of mannose 1-phosphate to fructose 6-phosphate and finally to GDP-fucose (ManB, ManC, Gmd and WcaG, and in some cases, ManA and Fcl); and ii) the synthetic process that includes the overexpression of *rscA*, the *E. coli* gene encoding a positive regulator of the colanic acid operon, a fucose-containing polysaccharide, and the knock-out of the *wcaJ* gene responsible for one of the first steps in colanic acid assembly (Dumon et al., 2001). In some cases, the overexpression of *rscB* gene, an additional positive regulator of colonic acid biosynthesis, and the null mutation into the *E. coli lon* gene, which encodes a protease responsible for degrading RcsA, were also included. iii) Another pathway is the second salvage synthetic process involving the overexpression of *E. coli* L-fucose transporter (FucP) and *Bacteroides fragilis* fucose kinase/fucose-1-phosphate guanylyltransferase (Fkp) (Baumgärtner et al., 2013; Coyne et al., 2005; Huang et al., 2017). Deletion of the *fucA* gene encoding fuculose-1-phosphate aldolase (Baumgärtner et al., 2013, 2015a; Zhai et al., 2015) or the *fucf-fucI* gene cluster encoding fucose isomerase and fuculose kinase (Chin et al., 2016) were also included to block the L-fucose metabolism for cell growth.

Coupled with the salvage pathway, overexpression of some GTP biosynthetic pathway genes, such as *gsk*, *gpt*, *gmk* and *ndk*, also increased the intracellular GDP-Fuc concentration and was applied to HMO production (Lee et al., 2012; Petschacher and Nidetzky, 2016; Zhai et al., 2015). Coupled with the *de novo* pathway and redox fluxes, the overexpression of genes related to the NADPH/NADP ratio has been recently studied (Huang et al., 2017).

The fucosylated HMOs obtained at least at mg scale are summarized in Table 11.

**3.2.2.1. 2'-Fucosyllactose (2'FL, Fuca1,2Galβ1,4Glc) (12).** 2'FL was successfully produced using different strategies of cell factory approach and it is currently produced at industrial scale. The first one was developed by the Samain and Driguez group (Drouillard et al., 2006; Samain and Priem, 2001). Engineered *E. coli* cells (*lacZ*<sup>-</sup>, *wcaJ*<sup>-</sup>) overexpressing *H. pylori futC* and *rscA* genes produced 14 g/L of 2'FL (12) (3 g/L intracellular concentration and 11 g/L extracellular concentration) in a fed-batch fermentation reaction (Table 11, entry 1) (Drouillard et al., 2006).

A remarkable production of 2'FL (12) used the following metabolic engineering strategy. The null mutation of the *lon* gene and a *lacA* mutation in the lactose acetyltransferase that is only active when high levels of lactose accumulate were employed to increase the GDP-L-fucose and lactose pools in *E. coli* (Parkot et al., 2012) (Table 11, entry 2). In addition, different fucosyltransferases (*Bacteroides fragilis* WcfW, *E. coli* strain O128:B12 WbsJ, HpFutC) were explored, but the 2'FL (12) yield was only reported for HpFutC. In a fed-batch mode with glycerol and lactose in a thymidine-deficient medium and using tryptophan as inducer, this strain achieved a production of 25 g/L of 2'FL (12).

Interestingly, the combination of recombinant genes involved in the *de novo* synthesis and the salvage GDP-fucose synthetic pathways together with the *H. pylori futC* gene was studied in an engineered plasmid-free *E. coli* strain (Baumgärtner et al., 2013) (Table 11, entry 3). *E. coli* JM109, instead of *E. coli* JM109(DE3), was chosen since it has no detectable  $\beta$ -galactosidase activity. The derivative *lacZ*<sup>-</sup>, *lacY*<sup>-</sup>, *manB*<sup>+</sup>, *manC*<sup>+</sup>, *gmd*<sup>+</sup>, *wcaG*<sup>+</sup>, *fucC*<sup>+</sup> strain with additional expression

of *fkp*<sup>+</sup> and knockouts of *fucI* and *fucK* yielded approximately 10-fold higher intracellular concentrations of GDP-L-fucose, an increase in 2'FL (12) productivity of over 80% and a yield of 20.3 g/L in fed-batch fermentations.

With the aim of using antibiotic-free cultures, the strain harboring *futC* and *nadC* genes in a plasmid resulted in the improved production of 2'FL (12) compared with the strains harboring *futC* in the chromosome or *fucC* in a plasmid with an antibiotic marker (Papadakis et al., 2017) (Table 11, entry 6).

A comparison of *E. coli* cells used as 2'FL (12) producers, such as BL21, JM and DE3 derivatives, has been performed (Huang et al., 2017; Lee et al., 2012). The *E. coli* BL21 star(DE3) strain produced a small amount of 2'FL (12) since it consumed lactose for growth (Lee et al., 2012). It was engineered by deleting the whole endogenous lactose operon and introducing the modified lactose operon from the *E. coli* K12 *lacZ*<sup>-</sup> derivative (Chin et al., 2015). The overexpression of *de novo* GDP-L-Fuc biosynthetic enzymes (ManB, ManC, Gmd and WcaG) and the *H. pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase FucT2 generated 6.4 g/L of 2'FL (12) in a fed-batch fermentation (Table 11, entry 4). Recently, the same authors modulated the GDP-Fuc salvage pathway instead of the *de novo* pathway (Table 11, entry 5) (Chin et al., 2016). The engineered *E. coli* BL21star(DE3) deleting *lacZ* and *fucI-fucK*, and expressing *fkp* and *fucT2* resulted in a 23.1 g/L yield (0.39 g/L/h productivity) of extracellular 2'FL (12), indicating that the salvage pathway produces at least 7-fold higher concentrations of 2'FL than the *de novo* synthesis pathway and that a complete lack of *lacZ* activity and deletion of the *fucI-fucK* genes slightly improves 2'FL (12) production.

Engineered BL21 (DE3) cells overexpressing the *de novo* biosynthetic GDP-Fuc genes (*manA*, *manB*, *manC*, *gmd*, and *fcl*) and *lacY* exerted an important effect on 2'FL (12) production, following *lon* inactivation and overexpression of *rscA*. The *wcaJ* deletion promoted a slight increase in production (Huang et al., 2017) (Table 11, entry 7), consistent with previous studies. In addition, since the *de novo* GDP-Fuc biosynthetic pathway is influenced by the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio and related to the pentose phosphate pathway, genes involved in NADPH regeneration and redox regulation were overexpressed. The coexpression of *zwf* and *pntAB*, which converts Glc-6P to 6-phosphate-gluconate and NADH to NADPH, respectively, resulted in the highest concentrations of GDP-Fuc and 2'FL (12).

Different companies are currently producing 2'FL using these metabolic engineering strategies with proprietary strains.

(Sprenger et al., 2017)

**3.2.2.2. 2'FL + DFL (2',3-difucosyllactose), (Fuca1,2Galβ1,4Glc + Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)Glc) (12 + 13).** An engineered *E. coli* strain with enhanced availability of lactose and GDP-Fuc (*lacZ*<sup>-</sup>, *lacA*<sup>-</sup>, *lacY*<sup>+</sup>, *wcaJ*<sup>-</sup>) overexpressing genes involved in the *de novo* GDP-Fuc synthetic pathway (*manB*<sup>+</sup>, *manC*<sup>+</sup>, *gmd*<sup>+</sup>, *wcaG*<sup>+</sup>) and *futC* as the only fucosyltransferase (Dekany et al., 2016; Samain and Priem, 2001) produced 2'FL (12) and DFL (13). The fed-batch fermentation reaction using glycerol and lactose for 4-7 days produced greater than 68 g/L of 2'FL (12) and DFL (13) in a 2'FL:DFL (12:13) ratio that was typically greater than 80:20 (Dekany et al., 2016) (Table 11, entry 8). The concentration of 2'fucosyl lactulose was no more than 1%.

Next, 2'FL (12) was used as an acceptor of the fucosyltransferase, and when 2'FL (12) was added at the end of the exponential phase, DFL (13) became the major product with a 2'FL/DFL (12/13) ratio of 8:92 after a fed-batch fermentation (Table 11, entry 8) (Dekany et al., 2015).

**3.2.2.3. 3-Fucosyllactose (3FL, Galβ1,4Fuca1,3Glc) (29).** Different strategies were applied for the production of 3FL (29). The first cell factory approach used a mixed bacterial culture where *C. ammoniagenes* was utilized for GTP regeneration from GMP along with *E. coli* strains expressing the genes involved in the *de novo* biosynthesis of GDP-L-fucose from Man (*glk*, *manB*, *manC*, *gmd*, and *wcaG*), the *pgm* and *pfkB*

genes involved in Glc-1,6-diphosphate biosynthesis, the cofactor of the phosphomannomutase (*manB*) and the *H. pylori*  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase (*fucT*) (Koizumi et al., 2000). Both *C. ammoniagenes* and *E. coli* cells were permeabilized with surfactant and xylene. 3FL (29) was produced at a concentration of 21 g/L from GMP, fructose, mannose and *N*-acetylglucosamine (Table 11, entry 9).

Similar to the best strategy for 2'FL production (12) (Table 11, entry 7), 3FL (29) was also recently produced using *E. coli* BL21 (DE3) cells with inactivation of *lon* and *wcaJ* and overexpression of the *de novo* biosynthetic GDP-Fuc genes *rcsA*, *zmf* and *pntAB*, together with *futA* that was selected as the best 1,3-fucosyltransferase. The yield of 3FL (29) was 12.4 g/L (Table 11, entry 10).

**3.2.2.4. LNFP I + 2'FL and LNNT + lacto-N-triose II** (*Fuc* $\beta$ 1,2*Gal* $\beta$ 1,3*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc* + *Fuca*1,2*Gal* $\beta$ 1,4*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,3*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc* + *GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc*) (14 + 12 + 4 + 2). The strategy used for the *in vivo* production of LNFP I (14) was reported by the Albermann group (Baumgärtner et al., 2015a). Following LNT (4) synthesis (Baumgärtner et al., 2014) (Table 10, entry 2), the expression of a recombinant GDP-Fuc salvage pathway and the *H. pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase FutC were included. All genes were chromosomally integrated and the engineered *E. coli* strain led to the formation of a mixture of lacto-*N*-fucopentaose I (14), 2'FL (12), LNT (4) and lacto-*N*-triose II (3) at concentrations of 272, 265, 63 and 1578 mg/L, respectively (Table 11, entry 11).

**3.2.2.5. LNFP I + 2'FL and LNNT (Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc + Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4Glc + Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc)** (30 + 12 + 5). Although the *H. pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase (FutC) was almost inactive towards type 2 acceptors *in vitro* (Wang et al., 1999), it was assayed in living cells (Drouillard et al., 2006). The coexpression of *N. meningitidis* *lgtA* and *lgtB* genes to generate LNNT (5) from lactose (Priem et al., 2002) (Table 10, entry 4) together with the *rscA* gene required for GDP-L-fucose availability and the *H. pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase (FutC) afforded 1.7 g/L of LNFP I (30), 0.6 g/L of 2'FL (12) and 0.7 of LNNT (5) in the oligosaccharide mixture (Drouillard et al., 2006) (Table 11, entry 12).

**3.2.2.6. LNFP V + LNFP II + LNDFH II and LNNT + LNnH** (*Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*GlcNAc* $\beta$ 1,3 *Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3(*Gal* $\beta$ 1,4 *GlcNAc* $\beta$ 1,3) *Gal* $\beta$ 1,4*Glc*) (31 + 32 + 33 + 5 + 6). Following LNNT (5) synthesis (Priem et al., 2002), the *Helicobacter pylori*  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase (HpFucT) produced lacto-*N*-neofucopentaose V (31) at 3 g/L, which represented 80% of the fucosylated oligosaccharides (Dumon et al., 2001) (Table 11, entry 13). LNFP II (32) and LNDFH II (33) were also present, along with LNNT (5) and LNnH (6). Priem and coworkers revealed the need to increase the pool of GDP-Fuc for HMO synthesis.

The same metabolic engineering approach was also applied (Table 11, entry 14) to prepare 1 g/L of fucosylated oligosaccharides (expressed in Fuc) containing LNFP V (31), the difucosylated lacto-*N*-neotetraose (LNDFH II) (33), difucosylated hexasaccharide (36), and LNNT (5) (Samain and Priem, 2001).

**3.2.2.7. LNDFH II +  $\alpha$ 1,3-fucosylated lacto-N-triose II and LNT + lacto-N-triose II** (*Gal* $\beta$ 1,3(*Fuca*1,4)*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3) *Glc* + *GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,3*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc* + *GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc*) (34 + 35 + 4 + 2). Following LNT (4) synthesis (Baumgärtner et al., 2015b) (Table 10, entry 2), additional expression of the  $\alpha$ 1,4-fucosyltransferase (FucT14) mainly led to the conversion of lacto-*N*-difucohexaose II (34) via  $\alpha$ 1,4-fucosylation on GlcNAc and  $\alpha$ 1,3 on Glc (Baumgärtner et al., 2015a) (Table 11, entry 15). The plasmid-free strain with the chromosomally integrated *fucT14* gene yielded LNDFH II (34),  $\alpha$ 1,3-fucosylated lacto-*N*-triose II (35),

LNT (4) and lacto-*N*-triose II (2) at concentrations of 547, 817, 60 and 1046 mg/L, respectively.

**3.2.2.8. LNDFH II + 3FL + LNFP V and LNNT + LNnH** (*Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3(*Gal* $\beta$ 1,4 *GlcNAc* $\beta$ 1,3)*Gal* $\beta$ 1,4*Glc*) (33 + 29 + 31 + 5 + 6). Following LNNT (5) synthesis (Priem et al., 2002), the expression of *Helicobacter pylori*  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase (FutA) produced lacto-*N*-neodifucohexaose II (33) at a concentration of 1.7 g/L as the major product, 3FL (29) at 0.5 g/L, and LNFP V (31), LNNT (5) and LNnH (6) (Dumon et al., 2004) (Table 11, entry 16).

**3.2.2.9. LNDFH II + LNFP II + LNFP V and LNNT** (*Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4(*Fuca*1,3)*Glc* + *Gal* $\beta$ 1,4*GlcNAc* $\beta$ 1,3*Gal* $\beta$ 1,4*Glc*) (33 + 32 + 31 + 5). As described above, a system expressing *Helicobacter pylori*  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase FutB produced lacto-*N*-neodifucohexaose II (33) (500 mg/L), lacto-*N*-neofucopentaose V (31) and lacto-*N*-neofucopentaose II (32) (280 and 260 mg/L, respectively) as major products, together with LNNT (4) as non-fucosylated oligosaccharide (Table 11, entry 17) (Dumon et al., 2004; Priem et al., 2002).

### 3.2.3. Sialylated HMOs

Sialylated HMOs have also been produced using the cell factory approach following the additional expression of different sialyltransferases and the enzymes in the metabolic pathways required to generate CMP-NeuAc (Table 12). Since *E. coli* cells (with the exception of pathogenic K1 strains) do not produce CMP-NeuAc, different metabolic pathways have been introduced (Drouillard et al., 1997; Priem et al., 2002) (Fig. 13). i) The salvage synthesis pathway involves the exogenous expression of NeuAc, transport into the cell by the nanT permease, protection from degradation by nanA aldolase inactivation, and activation by the CMP-Neu5Ac synthase. ii) The *de novo* synthesis pathway involves the conversion from UDP-GlcNAc to CMP-NeuAc, and therefore genes encoding *N*-acetylglucosamine-6-phosphate-epimerase (*neuA*), sialic acid synthase (*neuB*) and CMP-Neu5Ac synthetase (*neuC*) were coexpressed and simultaneously Neu5Ac aldolase (*nanA*) and ManNAc kinase (*nanK9*) activities were knocked out to ensure a higher yield.

The sialylated HMOs obtained at least at the mg scale are summarized in Table 12.

**3.2.3.1. 3'SL (NeuAca2,3Gal $\beta$ 1,4Glc) (37)**. Different metabolic engineering strategies had been applied for production of 3'SL (36). The first large-scale production was performed using a mixed culture coupling the CMP-NeuAc production system based on a recombinant *C. ammonia* strain overexpressing CTP synthetase genes and *E. coli* cells overexpressing the CMP-NeuAc synthetase to produce CMP-NeuAc from orotic acid and NeuAc, together with *E. coli* cells overexpressing the  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase of *N. gonorrhoeae* (Table 12, entry 1). Notably, 33 g/L of 3'SL (37) were produced from orotic acid, NeuAc and lactose (Endo et al., 2000).

Using single engineered cells (Table 12, entry 2), 3'SL (37) was initially produced at a concentration of 2.6 g/L (Priem et al., 2002). *E. coli* cells were engineered to contain the CMP-NeuAc salvage pathway (*lacY*<sup>+</sup>, *lacZ*<sup>+</sup>, *nanT*<sup>+</sup>, *nanA*<sup>-</sup>) and expressed the CMP-NeuAc synthase and the  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase genes from *Neisseria meningitidis*.

The most remarkable production used the *de novo* biosynthetic pathway, mutant strains coexpressing the  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase gene from *Neisseria meningitidis* and *Campylobacter jejuni neuABC* genes and lacking Neu5Ac aldolase (*nanA*), ManNAc kinase (*nanK*), and  $\beta$ -

**Table 12**  
Sialylated oligosaccharides produced using metabolic engineering.

Products	Entry	Strain	Plasmidic genes expression	Cultivation	Yield (g/L)	Reference
3'SL(37)	1	<i>E. coli</i> NM522 <i>E. coli</i> NM 294 ( <i>pyrG</i> <sup>+</sup> ) <i>C. ammoniagenes</i> DN510	<i>pyrG</i> , <i>CjneuA</i> , $\alpha$ -2,3-SiaT	Fru, Lac, NeuAc, orotic acid	33 g/L	Endo et al. (2000)
	2	<i>E. coli</i> JM107 ( <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacY</i> <sup>+</sup> , <i>nanT</i> <sup>+</sup> , <i>nanA</i> <sup>-</sup> )	<i>lgtA</i> , CMP-NeuAc synthase gene from <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Nmnst</i> , <i>CjneuA</i> , <i>CjneuB</i> , <i>CjneuC</i> ( <i>neuBCA</i> )	Glycerol, Lac, Neu5Ac Fed-batch	2.6 g/L (55% intracellular)	Priem et al. (2002)
	3	<i>E. coli</i> DG ( <i>DH1</i> , <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacA</i> <sup>-</sup> , <i>nanKETA</i> <sup>-</sup> )	Strain A: –	Glycerol, Lac Fed-batch	25.5 g/L (40% intracellular)	Fierfort and Samain (2008)
	4	<i>E. coli</i> ( <i>nadC</i> <sup>-</sup> , <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacA</i> <sup>-</sup> , <i>lacY</i> <sup>+</sup> , <i>nanA</i> <sup>-</sup> , <i>nanK</i> <sup>-</sup> ) Strain A: <i>nst</i> and <i>neuBCA</i> chromosomally integrated, non antibiotic	Strain A: –	Glc, Lac, glycerol, thiamine, UDP-GlcNAc	Strain A: 100 <sup>a</sup>	Papadakis et al. (2017)
6'SL(39)	5	Strain B: <i>nst</i> chromosomally integrated, antibiotic Strain C: <i>nst</i> chromosomally integrated, non antibiotic <i>E. coli</i> ( <i>nadC</i> <sup>-</sup> , <i>lacZ</i> <sup>-</sup> , <i>lacA</i> <sup>-</sup> , <i>lacY</i> <sup>+</sup> , <i>nanA</i> <sup>-</sup> , <i>nanK</i> <sup>-</sup> ) Strain A: $\alpha$ -2,6-SiaT and <i>neuBCA</i> chromosomally integrated, non antibiotic Strain B: $\alpha$ -2,6-SiaT chromosomally integrated, antibiotic Strain C: $\alpha$ -2,6-SiaT chromosomally integrated, non antibiotic	Strain B: <i>neuBCA</i> Strain C: <i>neuBCA</i> , <i>nadC</i> Strain A: 100 <sup>a</sup> Strain B: <i>neuBCA</i> Strain C: <i>neuBCA</i> , <i>nadC</i>	Glc, Lac, glycerol, thiamine, UDP-GlcNAc	Strain B: 261 <sup>a</sup> Strain C: 330 <sup>a</sup> Strain A: – Strain B: 122 <sup>a</sup> Strain C: 140 <sup>a</sup>	Papadakis et al. (2017)

Abbreviations: 3'SL: 3'-sialyllactose; Genes: *pyrG*: CTP synthetase from *Escherichia coli*; *neuA*: CMP-NeuAc synthetase from *Escherichia coli*;  $\alpha$ 2,3-SiaT:  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase from *Neisseria gonorrhoeae*; *lacZ*:  $\beta$ -galactosidase; *lacY*: galactoside permease; *nadC*: nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase; *lacA*: galactose-6-phosphate isomerase; *lgtA*:  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase from *Neisseria meningitidis*; CMP-NeuAc synthase from *Neisseria meningitidis*; *nst*:  $\alpha$ 2,3-NeuAc transferase from *Neisseria meningitidis*; *neuA*: CMP-NeuAc synthase from *Campylobacter jejuni*; *neuB*: sialic acid synthase from *Campylobacter jejuni*; *neuC*: GlcNAc-6-phosphate 2-epimerase from *Campylobacter jejuni*; *nanI*: sialic acid transporter; *nanA*: N-acetylneuraminate lyase; *nanK*: N-acetylmannosamine kinase; *nank*: N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase;  $\alpha$ 2,6-SiaT:  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase.

<sup>a</sup> Titre relative to the amounts produced by strain A taken as 100.





- Barreute, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., Blanot, D., 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *32*, 168–207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x>.
- Baumgärtner, F., Seitz, L., Sprenger, G.A., Albermann, C., 2013. Construction of *Escherichia coli* strains with chromosomally integrated expression cassettes for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Microb. Cell Factories* **12**, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-40>.
- Baumgärtner, F., Conrad, J., Sprenger, G.A., Albermann, C., 2014. Synthesis of the human milk oligosaccharide lacto-N-tetraose in metabolically engineered, plasmid-free *E. coli*. *Chembiochem* **15**, 1896–1900. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402070>.
- Baumgärtner, F., Jurzitza, L., Conrad, J., Beifuss, U., Sprenger, G.A., Albermann, C., 2015a. Synthesis of fucosylated lacto-N-tetraose using whole-cell biotransformation. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 6799–6806. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.005>.
- Baumgärtner, F., Sprenger, G.A., Albermann, C., 2015b. Galactose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for the production of lacto-N-tetraose. *Enzym. Microb. Technol.* **75–76**, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.04.009>.
- Bayón, C., Cortés, Á., Berenguer, J., Hernáiz, M.J., 2013. Highly efficient enzymatic synthesis of Galβ-(1→3)-GalNAc and Galβ-(1→3)-GlcNAc in ionic liquids. *Tetrahedron* **69**, 4973–4978. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.04.015>.
- Bissaro, B., Saurer, O., Arab-Jaziri, F., Saulnier, L., Milon, A., Tenkanen, M., Monsan, P., O'Donohue, M.J., Fauré, R., 2014. Mutation of a pH-modulating residue in a GH51 α-L-arabinofuranosidase leads to a severe reduction of the secondary hydrolysis of transfuranosylation products. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1840**, 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.013>.
- Bissaro, B., Monsan, P., Fauré, R., O'Donohue, M.J., 2015. Glycosynthesis in a water-world: new insights into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycosylidase hydrolyses. *Biochem. J.* **467**, 17–35. <https://doi.org/10.1042/BJ20141412>.
- Blank, D., Dozt, V., Geyer, R., Kunz, C., 2012. Human milk oligosaccharides and Lewis blood group: individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from. *Adv. Nutr.* **3**, 440–449. <https://doi.org/10.3945/an.111.001446>.
- Bode, L., 2006. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides. *J. Nutr.* **136**, 2127–2130. <https://doi.org/10.1093/jn/136.8.2127>.
- Bode, L., 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* **22**, 1147–1162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws074>.
- Bode, L., 2015. Early human development the functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum. Dev.* **1–4**. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>.
- Bode, L., Jantscher-krenn, E., 2012. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv. Nutr.* **3**, 383–391. <https://doi.org/10.3945/an.111.001404>.
- Bode, L., Rudloff, S., Kunz, C., Strobel, S., Klein, N., 2004. Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil β2 integrin expression. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 820–826. <https://doi.org/10.1189/jlb.0304198.1>.
- Boehm, G., Stahl, B., 2007. Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.* **137**, 847S–849S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.847S>.
- Bohn, M.L., Colombo, M.L., Storz, C.A., Ruvéda, E.A., 2006. A comparative study of the influence of some protecting groups on the reactivity of d-glucosamine acceptors with a galactofuranosyl donor. *Carbohydr. Res.* **341**, 1096–1104. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.030>.
- Bunesova, V., Lacroix, C., Schwab, C., 2016. Fucosyllactose and L-fucose utilization of infant *Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium kashiwanohense*. *BMC Microbiol.* **16**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0867-4>.
- Cantarel, B.I., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, 233–238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>.
- Castany-Muñoz, E., Martín, M.J., Prieto, P.A., 2013. 2'-fucosyllactose: an abundant, genetically determined soluble glycan present in human milk. *Nutr. Rev.* **71**, 773–789. <https://doi.org/10.1111/nure.12079>.
- Champion, E., Andreas, V., Sebastian, B., Dekany, G., 2016a. Mutated Fucosidase. *WO 2016/063261 A1*.
- Champion, E., Mcconnell, B., Dekany, G., 2016b. Ternary Mixtures of 6'-SL, LNnT and LST c. *WO 2016/199071 A1*.
- Chaturvedi, P., Warren, C.D., Altaye, M., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G., Pickering, L.K., Newburg, D.S., 2001. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* **11**, 365–372. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.5.365>.
- Chen, X., 2015. Human Milk Oligosaccharides (HMOS): structure, function, and enzyme-catalyzed synthesis. *1st ed.* *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2015.08.002>.
- Chernyak, A., Oscarson, S., Turek, D., 2000. Synthesis of the Lewis b hexasaccharide and sialate acid-HSA conjugates thereof with various saccharide loadings. *Carbohydr. Res.* **329**, 309–316. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00189-0).
- Chin, Y.W., Kim, J.Y., Lee, W.H., Seo, J.H., 2015. Enhanced production of 2'-fucosyllactose in engineered *Escherichia coli* BL21star(DE3) by modulation of lactose metabolism and fucosyltransferase. *J. Biotechnol.* **210**, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.biotech.2015.06.431>.
- Chin, Y.W., Seo, N., Kim, J.H., Seo, J.H., 2016. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce 2'-fucosyllactose via salvage pathway of guanosine 5'-diphosphate (GDP)-l-fucose. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 2443–2452. <https://doi.org/10.1002/bit.26015>.
- Cobucci-Ponzano, B., Moracci, M., 2012. Glycosyntheses as tools for the production of glycan analogs of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 697–709. <https://doi.org/10.1039/c2np20032e>.
- Coppa, G.V., Pierani, P., Zampini, L., Carloni, I., Carlucci, A., Gabrielli, O., 1999. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Paediatr. Suppl.* **88**, 89–94.
- Coppa, G.V., Zampini, L., Galeazzi, T., Facinelli, B., Ferrante, L., Capretti, R., Orazio, G., 2006. Human milk oligosaccharides inhibit the adhesion to Caco-2 cells of diarrheal pathogens: *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella typhi*. *Pediatr. Res.* **59**, 377–382. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000200805.45593.17>.
- Coyne, M.J., Reinap, B., Lee, M.M., Comstock, L.E., 2005. Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* **307**, 1778–1781. <https://doi.org/10.1126/science.1106469>. (80).
- Danby, P.M., Withers, S.G., 2016. Advances in enzymatic glycoside synthesis. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1784–1794. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00340>.
- De Bruyn, F., Beauprez, J., Maertens, J., Soetaert, W., De Mey, M., 2013. Unraveling the leloir pathway of *Bifidobacterium bifidum*: Significance of the uridylyltransferases. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 7028–7035. <https://doi.org/10.1128/AEM.02460-13>.
- De Leoz, M.L.A., Wu, S., Strum, J.S., Niño-nuevo, M.R., Gaerlan, S.C., Mirmiran, M., Underwood, M.A., 2013. A Quantitative and Comprehensive Method to Analyze Human Milk Oligosaccharide Structures in the Urine and Feces of Infants 4089–4105. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6817-1>.
- Dekany, G., Peltier-Pain, P., Molnár-Gábor, D., Hederes, M., 2015. Fermentative Production of Oligosaccharides. *WO 2015/032413 A1*.
- Dekany, G., Osztrovsky, G., Matwiejuk, M., Chassagne, P., Hederes, M., 2016. Separation of 2'-f from a Fermentation Broth. *WO2016095924A1*.
- Difilippo, E., Willems, H.A.M., Vendrig, J.C., Fink-Gremmels, J., Gruppen, H., Schols, H.A., 2015. Comparison of milk oligosaccharides pattern in colostrum of different horse breeds. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4805–4814. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01127>.
- Donald, A.S.R., Feeney, J., 1988. Separation of human milk oligosaccharides by recycling chromatography. First isolation of lacto-N-neo-di-fucosylactose II and 3'-galactosylactose from this source. *Clin. Res.* **178**, 79–91.
- Drouillard, S., Armand, S., Davies, G.J., Vorgias, C.E., Henrissat, B., 1997. *Serratia marcescens* chitinase is a retaining glycosylase utilizing substrate acetamido group participation. *Biochem. J.* **328**, 945–949.
- Drouillard, S., Driguez, H., Samain, E., 2006. Large-scale synthesis of H-antigen oligosaccharides by expressing *Helicobacter pylori* α1,2-fucosyltransferase in metabolically engineered *Escherichia coli* cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1778–1780. <https://doi.org/10.1002/anie.200503427>.
- Dumon, C., Priem, B., Martin, S.L., Heyraud, A., Bosso, C., Samain, E., 2001. In vivo fucosylation of lacto-N-neotetraose and lacto-N-neohexaose by heterologous expression of *Helicobacter pylori* α-1,3 fucosyltransferase in engineered *Escherichia coli*. *Glycoconj. J.* **18**, 465–474. <https://doi.org/10.1023/A:1016086118274>.
- Dumon, C., Samain, E., Priem, B., 2004. Assessment of the two *Helicobacter pylori* α-1,3-fucosyltransferase ortholog genes for the large-scale synthesis of Lewis x human milk oligosaccharides by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **20**, 412–419. <https://doi.org/10.1021/bp0342194>.
- EGge, H., Dell, A., Von Nicolai, H., 1983. Fucose-containing oligosaccharides from human milk. Separation and Identification of new constituents. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 235–253. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90207-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90207-2).
- Elison, E., Vignsnaes, L.K., Krosgaard, L.R., Rasmussen, J., Sørensen, N., Mcconnell, B., Hennet, T., Sommer, M.O.A., Bytzer, P., Glycom, A.S., Lyngby, D.-K., 2016. Oral supplementation of healthy adults with 2'-O-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose is well tolerated and shifts the intestinal microbiota. *Br. J. Nutr.* **116**, 1356–1368. <https://doi.org/10.1017/S0007114516003354>.
- Endo, T., Koizumi, S., Tabata, K., Ozaki, A., 2000. Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 257–261. <https://doi.org/10.1007/s002530050017>.
- Engels, L., Elling, L., 2014. Wbgl: A novel bacterial α1,2-fucosyltransferase for the synthesis of 2'-fucosyllactose. *Glycobiology* **24**, 170–178. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt096>.
- Engfer, M.B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., Daniel, H., 2000. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1589–1596.
- Escherich, T., 1886. Die darmbakterien des säuglings und ihre beziehungen zur physiologie der verdauung.
- Fierfort, N., Samain, E., 2008. Genetic engineering of *Escherichia coli* for the economical production of sialylated oligosaccharides. *J. Biotechnol.* **134**, 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.02.010>.
- Frey, A., 1996. The Leloir pathway: a mechanistic imperative three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* **10**, 461–470.
- Fuhrer, A., Sprenger, N., Kurakevich, E., Borsig, L., Chassard, C., Hennet, T., 2010. Milk sialyllactose influences colitis in mice through selective intestinal bacterial colonization. *J. Exp. Med.* **207**, 2843–2854. <https://doi.org/10.1084/jem.20101098>.
- Fukuda, K., Yamamoto, A., Ganzorig, K., Khuukhenbaatar, J., Senda, A., Saito, T., Urashima, T., 2010. Chemical characterization of the oligosaccharides in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) milk and colostrum. *J. Dairy Sci.* **93**, 5572–5587. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3151>.
- Fushinobu, S., 2010. Unique sugar metabolic pathways of bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2374–2384. <https://doi.org/10.1271/bbb.100494>.
- Gabrielli, O., Zampini, L., Galeazzi, T., Padella, L., Santoro, L., Peila, C., Giuliani, F., Bertino, E., Fabris, C., Coppa, G.V., 2011. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics* **128**, e1520–e1531. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1206>.
- Garrido, D., Barile, D., Mills, D. a., 2012. A molecular basis for bifidobacterial enrichment in the infant gastrointestinal tract. *Adv. Nutr.* **3**, 415–421. <https://doi.org/10.3945/an.111.001586.4155>.
- Garrido, D., Dallas, D.C., Mills, D.A., 2013. Consumption of human milk glycoconjugates by infant-associated bifidobacteria: mechanisms and implications. *Microbiology* **159**, 649–664. <https://doi.org/10.1099/mic.0.064113-0>.
- Garrido, D., Ruiz-Moyano, S., Kirmiz, N., Davis, J.C., Totten, S.M., Lemay, D.G., Ugalde, J.A., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2016. A novel gene cluster allows

- preferential utilization of fucosylated milk oligosaccharides in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* SC596. *Sci. Rep.* 6, 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep35045>.
- Gilbert, M., Bayer, R., Cunningham, A.M., DeFrees, S., Gao, Y., Watson, D.C., Young, N.M., Wakarchuk, W.W., 1998. The synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion. *Nat. Biotechnol.* 16, 769–772. <https://doi.org/10.1038/nbt0898-769>.
- Goehring, K.C., Kennedy, A.D., Prieto, P.A., Buck, R.H., 2014. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PLoS One* 9, e101692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101692>.
- György, P., Norris, R.F., Rose, C.S., 1954. Bifidus factor. I. A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 48, 193–201. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(54\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(54)90323-9).
- Han, N.S., Kim, T.J., Park, Y.C., Kim, J., Seo, J.H., 2012. Biotechnological production of human milk oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* 30, 1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.003>.
- Han, Z., Chen, C., Meng, C., Gao, T., Peng, P., Chen, X., Wang, F., Cao, H., 2016. Chemoenzymatic synthesis of tumor-associated antigen N3 minor octasaccharide. *J. Carbohydr. Chem.* 35, 412–422. <https://doi.org/10.1080/07328303.2017.1315123>.
- Hayes, M.R., Pietruszka, J., 2017. Synthesis of glycosides by glycosynthases. *Molecules* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22091434>.
- He, Y.Y., Liu, S.B., Kling, D.E., Leone, S., Lawlor, N.T., Huang, Y., Feinberg, S.B., Hill, D.R., Newburg, D.S., 2016. The human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose modulates CD14 expression in human erythrocytes, thereby attenuating LPS-induced inflammation. *Gut* 65, 33–46. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307544>.
- Hidaka, M., Nishimoto, M., Kitaoka, M., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu, S., 2009. The crystal structure of galacto-N-biose/lacto-N-biose I phosphorylase. A large deformation of a trim barrel scaffold. *J. Biol. Chem.* 284, 7273–7283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808525200>.
- Hoeflinger, J.L., Davis, S.R., Chow, J., Miller, M.J., 2015. In vitro impact of human milk oligosaccharides on Enterobacteriaceae growth. *J. Agric. Food Chem.* 63, 3295–3302. <https://doi.org/10.1021/jf505721p>.
- Hong, Q., Ruhaak, L.R., Totten, S.M., Smilowitz, J.T., German, J.B., Lebrilla, C.B., 2014. Label free absolute quantitation of oligosaccharides using multiple reaction monitoring. *Anal. Chem.* 86, 2640–2647. <https://doi.org/10.1021/ac404006z>.
- Hsu, C.H., Chu, K.C., Lin, Y.S., Han, J.L., Peng, Y.S., Ren, C.T., Wu, C.Y., Wong, C.H., 2010. Highly alpha-selective sialyl phosphate donors for efficient preparation of natural sialosides. *Chem. Eur. J.* 16, 1754–1760. <https://doi.org/10.1002/chem.200903035>.
- Hsu, Y., Lu, X., Zulueta, M.M.L., Tsai, C., Lin, K., Hung, S., Wong, C., 2012. Acyl and silyl group effects in reactivity-based one-pot glycosylation: synthesis of embryonic stem cell surface carbohydrates Lc 4 and IV 2 Fuc-Lc 4. *J. Am. Chem. Soc.* 3, 4549–4552.
- Huang, D., Yang, K., Liu, J., Xu, Y., Wang, Y., Wang, R., Liu, B., Feng, L., 2017. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose through modular pathway enhancement. *Metab. Eng.* 41, 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.03.001>.
- Ichikawa, Y., Shen, G.J., Wong, C.H., 1991. Enzyme-catalyzed synthesis of sialyl oligosaccharide with in situ regeneration of CMP-Sialic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4698–4700. <https://doi.org/10.1021/ja00012a058>.
- James, K., Motherway, M.O.C., Bottacini, F., Van Sinderen, D., 2016. *Bifidobacterium breve* UCC2003 metabolises the human milk oligosaccharides lacto-N-tetraose and lacto-N-tetraose through overlapping, yet distinct pathways. *Nat. Publ. Gr.* 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep38560>.
- Jantscher-Krenn, E., Lauwaet, T., Bliss, L.A., Reed, S.L., Gillin, F.D., Bode, L., 2012a. Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity in vitro. *Br. J. Nutr.* 108, 1839–1846. <https://doi.org/10.1017/S0007114511007392>.
- Jantscher-Krenn, E., Zherebtsov, M., Nissan, C., Goth, K., Guner, Y.S., Naidu, N., Choudhury, B., Grishin, A.V., Ford, H.R., Bode, L., 2012b. The human milk oligosaccharide disialyllacto-N-tetraose prevents necrotising enterocolitis in neonatal rats. *Gut* 61, 1417–1425. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301404>.
- Jennum, C.A., Hauch Penger, T., Bruun, L.M., Madsen, R., 2014. One-pot glycosylations in the synthesis of human milk oligosaccharides. *Eur. J. Org. Chem.* 2014, 3232–3241. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201400164>.
- Kitaoka, M., Tian, J., Nishimoto, M., 2005. Novel putative galactose operon involving lacto-N-biose phosphorylase in *Bifidobacterium longum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3158–3162. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3158>.
- Kobata, A., 2003. Possible application of milk oligosaccharides for drug development. *Chang Gung Med. J.* 6, 620–636.
- Kobata, A., 2010. Structures and application of oligosaccharides in human milk. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86, 731–747. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.731>.
- Koizumi, S., Endo, T., Tabata, K., Nagano, H., Ohnishi, J., Ozaki, A., 2000. Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25, 213–217. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000055>.
- Kovács, I., Bajza, I., Hederos, M., Dekny, G., Demiko, S., Khanzahn, N., 2013. WO 2013/044928 A1.
- Kuhn, R., Baer, H.H., Gauhe, A., 1956. Kristallisierte Fucosido-lactose. *Chem. Ber.* 89, 2513.
- Kuntz, S., Rudloff, S., Kunz, C., 2008. Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *Br. J. Nutr.* 99, 462–471. <https://doi.org/10.1017/S0007114507824068>.
- Kuntz, S., Kunz, C., Rudloff, S., 2009. Oligosaccharides from human milk induce growth arrest via G2/M by influencing growth-related cell cycle genes in intestinal epithelial cells. *Br. J. Nutr.* 101, 1306–1315. <https://doi.org/10.1017/S0007114508079622>.
- Kunz, C., 2012. Historical aspects of human milk oligosaccharides. *Adv. Nutr.* 3, 430S–439S. <https://doi.org/10.3945/an.111.001776>.
- Kunz, C., Rudloff, S., Schad, W., Braun, D., 1999. Lactose-derived oligosaccharides in the milk of elephants: comparison with human milk. *Br. J. Nutr.* <https://doi.org/10.1017/S0007114599001798>.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baie, r.W., Klein, N., Strobel, S., 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 699–722. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.699>.
- Kunz, C., Kuntz, S., Rudloff, S., 2014. Bioactivity of human milk oligosaccharides. In: Moreno, F.J., Sanz, M.L. (Eds.), *Food Oligosaccharides*. 1. John Wiley & Sons, pp. 5–20. <https://doi.org/10.1002/9781118817360>.
- Lau, K., Yu, H., Thon, V., Khedri, Z., Leon, M.E., Tran, B.K., Chen, X., 2011. Sequential two-step multienzyme synthesis of tumor-associated sialyl T-antigens and derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 9, 2784–2789. <https://doi.org/10.1039/c0ob01269f>.
- Lee, J.C., Wu, C.Y., Apon, J.V., Siuzdak, G., Wong, C.H., 2006. Reactivity-based one-pot synthesis of the tumor-associated antigen N3 minor octasaccharide for the development of a photocleavable DIOS-MS sugar array. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 2753–2757. <https://doi.org/10.1002/anie.200504067>.
- Lee, W.H., Pathanibul, P., Quarterman, J., Jo, J.H., Han, N.S., Miller, M.J., Jin, Y.S., Seo, J.H., 2012. Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2'-fucosyllactose, using engineered *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* 11 (1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-48>.
- Li, Y., Yu, H., Cao, H., Lau, K., Muthana, S., Tiwari, V.K., Son, B., Chen, X., 2008. *Pasteurella multocida* sialic acid aldolase: A promising biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 963–970. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1506-2>.
- Li, L., Liu, Y., Li, T., Wang, W., Yu, Z., Ma, C., Qu, J., Zhao, W., Chen, X., Wang, P.G., 2015. Efficient chemoenzymatic synthesis of novel galacto-N-biose derivatives and their sialylated forms. *Chem. Commun.* 51, 10310–10313. <https://doi.org/10.1039/C5CC03746H>.
- Li, Y., Xue, M., Sheng, X., Yu, H., Zeng, J., Thon, V., Chen, Y., Muthana, M.M., Wang, P.G., Chen, X., 2016. Donor substrate promiscuity of bacterial  $\beta$ 1-3-N-acetylglucosaminyltransferases and acceptor substrate flexibility of  $\beta$ 1-4-galactosyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 1696–1705. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.02.043>.
- Lin, S.-W., Yuan, T.-M., Li, J.-R., Lin, C.-H., 2006. Carboxyl terminus of *Helicobacter pylori* alpha1,3-fucosyltransferase determines the structure and stability. *Biochemistry* 45, 8108–8116. <https://doi.org/10.1021/bi0601297>.
- Liu, X. wei, Xia, C., Li, L., Guan, W. yi, Pettit, N., Zhang, H. cheng, Chen, M., Wang, P.G., 2009. Characterization and synthetic application of a novel  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase from *Escherichia coli* O55:H7. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 4910–4915. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.06.005>.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZY) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, 490–495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- Mackenzie, L.F., Wang, Q., Warren, R.A.J., Withers, S.G., 1998. Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 7863, 5583–5584.
- Malet, C., Planas, A., 1998. From  $\beta$ -glucanase to  $\beta$ -glucanase: glycosyl transfer to  $\alpha$ -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Lett.* 440, 208–212. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01448-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01448-3).
- Marcobal, A., Barboza, M., Froehlich, J.W., Block, D.E., German, J.B., Lebrilla, C.B., Mills, D.A., 2010. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5334–5340. <https://doi.org/10.1021/jf9044205>.
- Martin, S.L., Edbrooke, M.R., Hodgman, T.C., van den Eijnden, D.H., Bird, M.I., 1997. Lewis X biosynthesis in *Helicobacter pylori*. Molecular cloning of a novel  $\alpha$ 1(3)-fucosyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* 272, 21349–21356. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21349>.
- Martinez-Ferez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C. a., Pohlentz, G., Boza, J.J., Guadix, E.M., Kunz, C., 2006. Goats' milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: Isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.* 16, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.idairy.2005.02.003>.
- Martin-Sosa, S., Martin, M.-J., Hueso, P., 2002. The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *J. Nutr.* 132, 3067–3072.
- Matsuo, I., Kim, S., Yamamoto, Y., Ajsaka, K., Maruyama, J., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2003. Cloning and overexpression of beta-N-acetylglucosaminidase encoding gene nagA from *Aspergillus oryzae* and enzyme-catalyzed synthesis of human milk oligosaccharide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 646–650. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.646>.
- Mattila, P., Rabinä, J., Hortling, S., Helin, J., Renkonen, R., 2000. Functional expression of *Escherichia coli* enzymes synthesizing GDP-L-fucose from inherent GDP-D-mannose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* 10, 1041–1047. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.10.1041>.
- McArthur, J.B., Yu, H., Zeng, J., Chen, X., 2017. Converting *Pasteurella multocida*  $\alpha$ 2-3-sialyltransferase 1 (PmST1) to a regioselective  $\alpha$ 2-6-sialyltransferase by saturation mutagenesis and regioselective screening. *Org. Biomol. Chem.* 15, 1700–1709. <https://doi.org/10.1039/c6ob02702d>.
- McJarrow, P., Garman, J., Harvey, S., Van Amelsfort, A., 2003. Dairy Process and Product. WO 03/049547 A2.
- Meredith-Dennis, L., Xu, G., Goonatileke, E., Lebrilla, C.B., Underwood, M.A., Smilowitz, J.T., 2017. Composition and variation of macronutrients, immune proteins, and human milk oligosaccharides in human milk from nonproft and commercial milk banks. *J. Hum. Lact.* 1–10. <https://doi.org/10.1177/0890334417110635>.
- Merighi, M., McCoy, J.M., Heidtman, M., 2012. Biosynthesis of Human Milk Oligosaccharides in Engineered Bacteria. WO 2012/112777 A2.
- Mimura, Y., Katoh, T., Salvado, F., Flaherty, R.O., Izumi, T., Mimura-kimura, Y., Utsunomiya, T., Mizukami, Y., Yamamoto, K., Matsumoto, T., Rudd, P.M., 2018. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell* 9, 47–62. <https://doi.org/10.1007/s12328->

- 017-0433-3.
- Mine, T., Miyazaki, T., Kajiwara, H., Naito, K., Ajisaka, K., Yamamoto, T., 2010. Enzymatic synthesis of unique sialylglycosaccharides using marine bacterial  $\alpha$ -(2→3)- and  $\alpha$ -(2→6)-sialyltransferases. *Carbohydr. Res.* 345, 1417–1421. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.03.036>.
- Miwa, M., Horimoto, T., Kiyohara, M., Katayama, T., Kitaoka, M., Ashida, H., Yamamoto, K., 2010. Cooperation of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology* 20, 1402–1409. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq101>.
- Miyazaki, T., Sato, T., Furukawa, K., Ajisaka, K., 2010. Enzymatic synthesis of Lacto-N-difucosylhexose which binds to *Helicobacter pylori*. *Methods Enzymol.* 480, 511–524. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)80023-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)80023-0).
- Montreuil, J., 1956. Structure de Deux Triholosides Isoles du Lait de Femme. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 242, 192–193.
- Morozov, V., Hansman, G., Hanisch, F.G., Schrotten, H., Kunz, C., 2018. Human milk oligosaccharides as promising antivirals. *Mol. Nutr. Food Res.* 62 1700679.
- Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Jiang, X., Newburg, D.S., 2005. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J. Nutr.* 135, 1304–1307. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1304>.
- Murata, T., Inukai, T., Suzuki, M., Yamagishi, M., Usui, T., 1999. Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose. *Glycoconj. J.* 16, 189–195. <https://doi.org/10.1023/A:1007020219275>.
- Neidhardt, F., Curtiss III, R., Ingraham, J., Lin, E., Low, J.K., Magasanik, B., 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2nd ed. ed. Washington, DC, USA.
- Ninonuevo, M.R., Bode, L., 2008. Infant formula oligosaccharides opening the gates (for speculation): commentary on the article by Barrat et al. on page 34. *Pediatr. Res.* 64, 8–10. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181752c2f>.
- Ninonuevo, M.R., Park, Y., Yin, H., Zhang, J., Ward, R.E., Clowers, B.H., German, J.B., Freeman, S.L., Killeen, K., Grimm, R., Lebrilla, C.B., 2006. A strategy for annotating the human milk glycome. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7471–7480. <https://doi.org/10.1021/jf0615810>.
- Nishimoto, M., Kitaoka, M., 2007. Practical preparation of lacto-N-biose I, a candidate for the bifidus factor in human milk. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2101–2104. <https://doi.org/10.1271/bbb.70320>.
- Nyffenegger, C., Nordvang, R.T., Zeuner, B., Lęzyk, M., Difilippo, E., Logtgen, M.J., Schols, H.A., Meyer, A.S., Mikkelsen, J.D., 2015. Backbone structures in human milk oligosaccharides: trans-glycosylation by metagenomic  $\beta$ -N-acetylhexosaminidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 7997–8009. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6550-0>.
- Olivares, M., Albrecht, S., De Palma, G., Ferrer, M.D., Castillejo, G., Schols, H.A., Sanz, Y., 2015. Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur. J. Nutr.* 54, 119–128. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0692-1>.
- Palcic, M.M., 2011. Glycosyltransferases as biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.022>.
- Papadakis, M., Pedersen, M., Bych, K., 2017. Fermentative Production of Oligosaccharides. *WO 2017/101958 A1*.
- Parkot, J., Huefner, E., Jenne-Wein, S., 2012. Novel Fucosyltransferases and their Applications. *WO 2012/09795 A1*.
- Pelletier, M., 2004. Methods for Producing Sialyloligosaccharides in a Dairy Source. *US 6,706,497 B2*.
- Petschacher, B., Nidetzky, B., 2016. Biotechnological production of fucosylated human milk oligosaccharides: prokaryotic fucosyltransferases and their use in biocatalytic cascades or whole cell conversion systems. *J. Biotechnol.* 235, 61–83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.052>.
- Planas, A., Fajjes, M., Codera, V., Llull, U.R., 2015. When enzymes do it better: enzymatic glycosylation methods. In: *Carbohydrate Chemistry: State of the Art and Challenges for Drug Development*, pp. 213–244.
- Polonovski, M., Montreuil, J., 1954. Etude chromatographique des polysides du lait de femme. *OMPTES RENDUS Hebd. DES SEANCES L Acad. DES S DES Sci 2*, 2263–2264.
- Priem, B., Gilbert, M., Wakarchuk, W.W., Heyraud, A., Samain, E., 2002. A new fermentation process allows large-scale production of human milk oligosaccharides by metabolically engineered bacteria. *Glycobiology* 12, 235–240. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.235>.
- Prudden, A.R., Liu, L., Capicciotti, C.J., Wolfert, M.A., Wang, S., Gao, Z., Meng, L., Moremen, K.W., Boons, G.-J., 2017. Synthesis of asymmetrical multiantennary human milk oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 6954–6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701785114>.
- Raets, C.R.H., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>.
- Rasko, D.A., Wang, G., Palcic, M.M., Taylor, D.E., 2000. Cloning and characterization of the  $\alpha$  (1,3/4) Fucosyltransferase of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 275, 4988–4994.
- Renaudie, L., Daniellou, R., Augé, C., Le Narvor, C., 2004. Enzymatic supported synthesis of lacto-N-neotetraose using dendrimeric polyethylene glycol. *Carbohydr. Res.* 339, 693–698. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.11.017>.
- Roussel, F., Knerr, L., Schmidt, R.R., 2001a. Solid-phase synthesis of lactose-containing oligosaccharides. *Eur. J. Org. Chem.* 2067–2073. [https://doi.org/10.1002/1099-0690\(200106\)2001:11<2067::AID-EJOC2067>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1099-0690(200106)2001:11<2067::AID-EJOC2067>3.0.CO;2-9).
- Roussel, F., Takhi, M., Schmidt, R.R., 2001b. Solid-phase synthesis of a branched hexaaccharide using a highly efficient synthetic strategy. *J. Organomet. Chem.* 66, 8540–8548. <https://doi.org/10.1021/jo016018p>.
- Rudloff, C., Sabine, K., Kuntz, S., 2014. Food oligosaccharides: production, analysis and bioactivity. In: *Moreno, F.J., Luz Sanz, M. (Eds.), Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, pp. 5–20.
- Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B., Newburg, D.S., 2003. Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fuca1, 2Gal1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J. Biol. Chem.* 278, 14112–14120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207744200>.
- Saito, T., Itoh, T., Adachi, S., 1987. Chemical structure of three neutral trisaccharides isolated in free form from bovine colostrum. *Carbohydr. Res.* 165, 43–51. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80076-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80076-9).
- Sakurama, H., Fushinobu, S., Hidaka, M., Yoshida, E., Honda, Y., Ashida, H., Kitaoka, M., Kumagai, H., Yamamoto, K., Katayama, T., 2012. 1,3-1,4- $\alpha$ -L-Fucosyltransferase that specifically introduces Lewis a/x antigens into type-1/2 chains. *J. Biol. Chem.* 287, 16709–16719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333781>.
- Sakurama, H., Kiyohara, M., Wada, J., Honda, Y., Yamaguchi, M., Fukiya, S., Yokota, A., Ashida, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K., Katayama, T., 2013. Lacto-N-biosidase encoded by a novel gene of *Bifidobacterium longum* subspecies longum shows unique substrate specificity and requires a designated chaperone for its active expression. *J. Biol. Chem.* 288, 25194–25206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484733>.
- Sallomons, E., Hotse Wilbrink, M., Sanders, P., Paulis Kamerling, J., Van Vuure, A.C., Hage, J.A., 2011. Methods for Providing Sialylated Oligosaccharides. *US 2014/0336140 A1*. <https://doi.org/US 2014/0336140 A1>.
- Samain, E., Priem, B., 2001. Method for Producing Oligopolysaccharides. *WO 01/04341 A1*.
- Santra, A., Yu, H., Tasnima, N., Muthana, M.M., Li, Y., Zeng, J., Kenyon, N.J., Louie, A.Y., Chen, X., 2016. Systematic chemoenzymatic synthesis of O-sulfated sialyl Lewis x antigens. *Chem. Sci.* 7, 2827–2831. <https://doi.org/10.1039/C5SC04104J>.
- Sarnesto, A., Köhlin, T., Hindsgaul, O., Thurin, J., Blaszczyk-Thurin, M., 1992. Purification of the secretor-type beta-galactosidase alpha 1-2-fucosyltransferase from human serum. *J. Biol. Chem.* 267, 2737–2744.
- Saumonneau, A., Champion, E., Peltier-Pain, P., Molnar-Gabor, D., Hendrickx, J., Tran, V., Hederes, M., Dekany, G., Tellier, C., 2015. Design of an  $\alpha$ -L-transfucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs. *Glycobiology* 26, 261–269. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv099>.
- Schmidt, D., Thiem, J., 2010. Chemical synthesis using enzymatically generated building units for construction of the human milk pentasaccharides sialyl-lacto-N-tetraose and sialyl-lacto-N-neotetraose epimer. *Beilstein J. Org. Chem.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.3762/bjoc.6.18>.
- Schmölzer, K., Czabany, T., Luley-Goedl, C., Pavkov-Keller, T., Ribitsch, D., Schwab, H., Gruber, K., Weber, H., Nidetzky, B., 2015. Complete switch from  $\alpha$ -2,3- to  $\alpha$ -2,6-regioselectivity in Pasteurella dagmatis  $\beta$ -d-galactosidase sialyltransferase by active-site redesign. *Chem. Commun.* 51, 3083–3086. <https://doi.org/10.1039/c4cc09772f>.
- Schönfeld, H., 1926. Über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jahrb. Der Kinderh* 16–90.
- Sela, D.A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J.H., Chen, F., Whitehead, T.R., Lapidus, A., Rokhsar, D.S., Lebrilla, C.B., German, J.B., Price, N.P., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 18964–18969. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809584105>.
- Smilowitz, J.T., O'Sullivan, A., Barile, D., German, J.B., Lönnnerdal, B., Slupsky, M.C., 2013. The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles. *J. Nutr.* 8, 1709–1718. <https://doi.org/10.3945/jn.113.178772>.
- Smilowitz, J., Lebrilla, C., Mills, D., German, J., Freeman, S., 2014. Breast milk oligosaccharides: structure-function relationships in the neonate. *Annu. Rev. Nutr.* 34, 143–169. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105721>.
- Sprenger, G.A., Baumgärtner, F., Albermann, C., 2017. Production of human milk oligosaccharides by enzymatic and whole-cell microbial biotransformations. *J. Biotechnol.* 258, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.030>.
- Stein, D.B., Lin, Y.N., Lina, C.H., 2008. Characterization of *Helicobacter pylori*  $\alpha$ 1,2-fucosyltransferase for enzymatic synthesis of tumor-associated antigens. *Adv. Synth. Catal.* 350, 2313–2321. <https://doi.org/10.1002/adsc.200800435>.
- Sturla, L., Bisso, A., Zanardi, D., Benatti, U., De Flora, A., Tonetti, M., 1997. Expression, purification and characterization of GDP-D-mannose 4,6-dehydratase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 412, 126–130. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00762-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00762-X).
- Sugiarto, G., Lau, K., Li, Y., Khedri, Z., Yu, H., Le, D.-T., Chen, X., 2011. Decreasing the sialidase activity of multifunctional *Pasteurella multocida*  $\alpha$ 2-3-sialyltransferase 1 (PmST1) by site-directed mutagenesis. *Mol. Biosyst.* 7, 3021. <https://doi.org/10.1039/c1mb05182b>.
- Sugiarto, G., Lau, K., Qu, J., Li, Y., Lim, S., Mu, S., Ames, J.B., Fisher, A.J., Chen, X., 2012. A sialyltransferase mutant with decreased donor hydrolysis and reduced sialidase activities for directly sialylating Lewis. *ACS Chem. Biol.* 7, 1232–1240. <https://doi.org/10.1021/cb300125k>.
- Sugiyama, Y., Gotoh, A., Katoh, T., Honda, Y., Yoshida, E., Kurihara, S., Ashida, H., Kumagai, H., Yamamoto, K., Kitaoka, M., Katayama, T., 2016. Introduction of H-antigens into oligosaccharides and sugar chains of glycoproteins using highly efficient 1,2- $\alpha$ -L-fucosyltransferase. *Glycobiology* 26, 1235–1247. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv085>.
- Suk Woo, J., Kyung Sohg, J., Gee Kim, B., Youp Kang, D., Soon Jang, K., Young Yang, J., Soo Jung, Y., Min Seo, W., Geon Gil, T., Hee Shim, S., Kang Hur, I., 2014. N-Acetylglucosamine-2-Epimerase and Method for Producing CMP-Neuraminic Acid Using the Same. *US 8,852,891 B2*. <https://doi.org/10.1016/j.73>.
- Thurl, S., Muller-Werner, B., Sawatzki, G., 1996. Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography. *Anal. Biochem.* 235, 202–206. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0113>.
- Thurl, S., Munzert, M., Boehm, G., Matthews, C., Stahl, B., 2017. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutr. Rev.* 75, 920–933. <https://doi.org/10.1093/nutrir/nux044>.
- Totani, K., Shimizu, K., Harada, Y., Murata, T., Usui, T., 2002. Enzymatic synthesis of

- oligosaccharide containing Le(x) unit by using partially purified chicken serum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 636–640. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.636>.
- Tsuchida, A., Okajima, T., Furukawa, K., Ando, T., Ishida, H., Yoshida, A., Nakamura, Y., Kannagi, R., Kiso, M., Furukawa, K., 2003. Synthesis of disialyl Lewis x (Lea) structure in colon cancer cell lines by a sialyltransferase, ST6GalNAc VI, responsible for the synthesis of  $\alpha$ -series gangliosides. *J. Biol. Chem.* 278, 22787–22794. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211034200>.
- Underwood, M.A., Gaerlan, S., De Leoz, M.L.A., Dimapasoc, L., Kalanetra, K.M., Lemay, D.G., German, J.B., Mills, D.A., Lebrilla, C.B., 2015. Human milk oligosaccharides in premature infants: absorption, excretion, and influence on the intestinal microbiota. *Pediatr. Res.* 78, 670–677. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.162>.
- Urashima, T., Saito, T., Nishimura, J., Ariga, H., 1989. New galactosyltransferase containing  $\alpha$ -glycosidic linkage isolated from ovine (*Booroola dorset*) colostrum. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 992, 375–378. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(89\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90099-8).
- Urashima, T., Kawai, Y., Nakamura, T., Arai, I., Saito, T., Namiki, M., Yamaoka, K. ichi, Kawahawa, K., Messer, M., 1999. Chemical characterisation of six oligosaccharides in a sample of colostrum from the brown capuchin, *Cebus apella* (Cebidae: Primates). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 124, 295–300. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00080-8).
- Urashima, T., Asakuma, S., Leo, F., Fukuda, K., Messer, M., Oftedal, O.T., 2012. The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Adv. Nutr.* 3, 473–482. <https://doi.org/10.3945/an.111.001412.473S>.
- Urashima, T., Taufik, E., Fukuda, K., Asakuma, S., 2013. Recent advances in studies on milk oligosaccharides of cows and other domestic farm animals. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 455–466. <https://doi.org/10.1271/bbb.120810>.
- Urashima, T., Fujita, S., Fukuda, K., Nakamura, T., Saito, T., Cowan, P., Messer, M., 2014. Chemical characterization of milk oligosaccharides of the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Glycoconj. J.* 31, 387–399. <https://doi.org/10.1007/s10719-014-9533-y>.
- Urashima, T., Sun, Y., Fukuda, K., Hirayama, K., Taufik, E., Nakamura, T., Saito, T., Merchant, J., Green, B., Messer, M., 2015. Chemical characterization of milk oligosaccharides of the eastern quoll (*Dasyurus viverrinus*). *Glycoconj. J.* 32, 361–370. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9600-z>.
- Varki, A., Cummings, R.D., Aebi, M., Packer, N.H., Seeberger, P.H., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G., Darvill, A., Kinoshita, T., Prestegard, J.J., Schnaar, R.L., Freeze, H.H., Marth, J.D., Bertozzi, C.R., Etlzer, M.E., Frank, M., Vliegenthart, J.F.G., Lütke, T., Perez, S., Bolton, E., Rudd, P., Paulson, J., Kanehisa, M., Toukach, P., Aoki-Kinoshita, K.F., Dell, A., Narimatsu, H., York, W., Taniguchi, N., Kornfeld, S., 2015. Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. *Glycobiology* 25, 1323–1324. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv091>.
- Vázquez, E., Barranco, A., Ramírez, M., Gruart, A., Delgado-García, J.M., Martínez-Lara, E., Blanco, S., Martín, M.J., Castany, E., Buck, R., Prieto, P., Rueda, R., 2015. Effects of a human milk oligosaccharide, 2'-fucosyltransferase, on hippocampal long-term potentiation and learning capabilities in rodents. *J. Nutr. Biochem.* 26, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.11.016>.
- Vogel, A., Schmiedel, R., Champion, E., Dekany, G., 2016. Mutated Sialidas. *WO 2016/199069 A1*.
- Wada, J., Ando, T., Kiyohara, M., Ashida, H., Kitaoka, M., Yamaguchi, M., Kumagai, H., Katayama, T., Yamamoto, K., 2008a. *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3996–4004. <https://doi.org/10.1128/AEM.00149-08>.
- Wada, J., Honda, Y., Nagae, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Katayama, T., Taniguchi, H., Kumagai, H., Kitaoka, M., Yamamoto, K., 2008b. 1,2- $\alpha$ -L-Fucosynthase: a glycosynthase derived from an inverting  $\alpha$ -glycosidase with an unusual reaction mechanism. *FEBS Lett.* 582, 3739–3743. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.09.054>.
- Wang, B., 2009. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 177–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155515>.
- Wang, L.-X., Davis, B.G., 2013. Realizing the promise of chemical glycobiology. *Chem. Sci.* 4, 3381–3394.
- Wang, L., Huang, W., 2009. Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.08.014>.
- Wang, G., Rasko, D.A., Sherburne, R., Taylor, D.E., 1999. Molecular genetic basis for the variable expression of Lewis Y antigen in *Helicobacter pylori*: analysis of the  $\alpha$ (1,2) fucosyltransferase gene. *Mol. Microbiol.* 31, 1265–1274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01268.x>.
- Weston, B.W., Nair, R.P., Larsen, R.D., Lowe, J.B., 1992. Isolation of a novel human  $\alpha$ (1,3)fucosyltransferase gene and molecular comparison to the human Lewis blood group  $\alpha$ (1,3/1,4)fucosyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* 267, 4152–4160.
- Wu, S., Tao, N., German, J.B., Grimm, R., Lebrilla, C.B., 2010. Development of an annotated library of neutral human milk oligosaccharides. *J. Proteome Res.* 9, 4138–4151. <https://doi.org/10.1021/pr100362f>.
- Xiao, Z., Guo, Y., Liu, Y., Li, L., Zhang, Q., Wen, L., Wang, X., Kondengaden, S.M., Wu, Z., Zhou, J., Cao, X., Li, X., Ma, C., Wang, P.G., 2016. Chemoenzymatic synthesis of a library of human milk oligosaccharides. *J. Organomet. Chem.* 81, 5851–5865. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b00478>.
- Yamada, A., Hatano, K., Koyama, T., Matsuoka, K., Esumi, Y., Terunuma, D., 2006. Syntheses of a series of lacto-N-neotetraose clusters using a carboxilane dendrimer scaffold. *Carbohydr. Res.* 341, 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.037>.
- Yamada, C., Gotoh, A., Sakanaka, M., Hattie, M., Stubbs, K.A., Katayama-Ikigami, A., Hirose, J., Kurihara, S., Arakawa, T., Kitaoka, M., Okuda, S., Katayama, T., Fushinobu, S., 2017. Molecular insight into evolution of symbiosis between breast-fed infants and a member of the human gut microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chem. Biol.* 24, 515–524.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.012>.
- Yao, W., Yan, J., Chen, X., Wang, F., Cao, H., 2015. Chemoenzymatic synthesis of lacto-N-tetraosaccharide and sialyl lacto-N-tetraosaccharides. *Carbohydr. Res.* 401, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.10.017>.
- Yu, H., Chokhawala, H., Karpel, R., Yu, H., Wu, B., Zhang, J., Zhang, Y., Jia, Q., Chen, X., 2005. A multifunctional *Pasteurella multocida* sialyltransferase: a powerful tool for the synthesis of sialoside libraries. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 17618–17619. <https://doi.org/10.1021/ja0561690>.
- Yu, H., Chokhawala, H.A., Huang, S., Chen, X., 2006. One-pot three-enzyme chemoenzymatic approach to the synthesis of sialosides containing natural and non-natural functionalities. *Nat. Protoc.* 1, 2485–2492. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.401>.
- Yu, H., Thon, V., Lau, K., Cai, L., Chen, Y., Mu, S., Li, Y., Wang, P.G., Chen, X., 2010. Highly efficient chemoenzymatic synthesis of  $\beta$ 1–3-linked galactosides. *Chem. Commun.* 46, 7507. <https://doi.org/10.1039/c0cc02850a>.
- Yu, Z.T., Chen, C., Kling, D.E., Liu, B., McCoy, J.M., Merighi, M., Heidtman, M., Newburg, D.S., 2013. The principal fucosylated oligosaccharides of human milk exhibit prebiotic properties on cultured infant microbiota. *Glycobiology* 23, 169–177. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws138>.
- Yu, H., Lau, K., Thon, V., Autran, C.A., Jantscher-Krenn, E., Xue, M., Li, Y., Sugiarto, G., Qu, J., Mu, S., Ding, L., Bode, L., Chen, X., 2014. Synthetic disialyl hexasaccharides protect neonatal rats from necrotizing enterocolitis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6687–6691. <https://doi.org/10.1002/anie.201403588>.
- Zeuner, B., Jers, C., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2014. Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9615–9631. <https://doi.org/10.1021/jf502619p>.
- Zhai, Y., Han, D., Pan, Y., Wang, S., Fang, J., Wang, P., Liu, X. wei, 2015. Enhancing GDP-fucose production in recombinant *Escherichia coli* by metabolic pathway engineering. *Enzym. Microb. Technol.* 69, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.001>.
- Zhao, C., Wu, Y., Yu, H., Shah, I.M., Li, Y., Zeng, J., Liu, B., Mills, D.A., Chen, X., 2016. The one-pot multienzyme (OPME) synthesis of human blood group H antigens and a human milk oligosaccharide (HMOS) with highly active *Thermosynechococcus elongatus*  $\alpha$ 1-2-fucosyltransferase. *Chem. Commun.* 52, 3899–3902. <https://doi.org/10.1039/c5cc10646j>.







Article

# Transglycosylation Activity of Engineered *Bifidobacterium* Lacto-*N*-Biosidase Mutants at Donor Subsites for Lacto-*N*-Tetraose Synthesis

Mireia Castejón-Vilatersana , Magda Faijes \* and Antoni Planas \*

Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, University Ramon Llull, 08017 Barcelona, Spain; mireiacastejonv@iqs.edu

\* Correspondence: magda.faijes@iqs.edu (M.F.); antoni.planas@iqs.edu (A.P.)

**Abstract:** The health benefits of human milk oligosaccharides (HMOs) make them attractive targets as supplements for infant formula milks. However, HMO synthesis is still challenging and only two HMOs have been marketed. Engineering glycoside hydrolases into transglycosylases may provide biocatalytic routes to the synthesis of complex oligosaccharides. Lacto-*N*-biosidase from *Bifidobacterium bifidum* (LnbB) is a GH20 enzyme present in the gut microbiota of breast-fed infants that hydrolyzes lacto-*N*-tetraose (LNT), the core structure of the most abundant type I HMOs. Here we report a mutational study in the donor subsites of the substrate binding cleft with the aim of reducing hydrolytic activity and conferring transglycosylation activity for the synthesis of LNT from *p*-nitrophenyl  $\beta$ -lacto-*N*-bioside and lactose. As compared with the wt enzyme with negligible transglycosylation activity, mutants with residual hydrolase activity within 0.05% to 1.6% of the wild-type enzyme result in transglycosylating enzymes with LNT yields in the range of 10–30%. Mutations of Trp394, located in subsite -1 next to the catalytic residues, have a large impact on the transglycosylation/hydrolysis ratio, with W394F being the best mutant as a biocatalyst producing LNT at 32% yield. It is the first reported transglycosylating LnbB enzyme variant, amenable to further engineering for practical enzymatic synthesis of LNT.

**Keywords:** *Bifidobacterium*; biocatalysis; human milk oligosaccharides; lacto-*N*-biosidase; protein engineering; transglycosylation

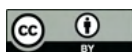


Citation: Castejón-Vilatersana, M.; Faijes, M.; Planas, A. Transglycosylation Activity of Engineered *Bifidobacterium* Lacto-*N*-Biosidase Mutants at Donor Subsites for Lacto-*N*-Tetraose Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3230. <https://doi.org/10.3390/ijms22063230>

Academic Editor: Gianfranco Gilardi

Received: 16 February 2021  
Accepted: 19 March 2021  
Published: 22 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Human milk oligosaccharides (HMOs) furnish breast-fed infants with a number of health benefits. Their unique composition, differing from other mammal's milk, drives active research to synthesize and produce the main HMO structures as supplements for infant formula milks (for recent reviews, see [1–5]). Various beneficial effects are critically important for early development and infant health, functioning as prebiotics and antimicrobial agents as well as exerting immunomodulation effects [6,7]. All HMOs are composed of a lactose unit at the reducing end that is extended with lacto-*N*-biose or *N*-acetyllactosamine through  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6 linkages as linear or branched oligosaccharides to generate at least 13 different core structures from tetra to dodecasaccharides, which are further fucosylated and/or sialylated at different positions. The first two core structures are lacto-*N*-tetraose (LNT, Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4Glc) core-type 1 and lacto-*N*-neotetraose (LNnT, Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,3 Gal $\beta$ 1,4Glc) core-type 2 oligosaccharides [1]. While there are over 150 HMO structures identified, 2'-fucosyllactose (2'-FL) and LNnT are the only commercially available HMOs for supplementing infant formula, produced by fermentation of metabolically engineered *E. coli* strains [2,8]. Since LNT is more abundant in human milk than LNnT (which is mainly found in other mammal's milks), it is a current target for designing efficient production strategies. Chemical synthesis, enzymatic synthesis (biocatalysis) and fermentation (cell factory) approaches are current focus of research.

LNT production in whole cells was first reported in 2014 with an engineered *E. coli* strain with chromosomal integration of two transferases, the *Neisseria meningitidis*  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (LgtA) and *E. coli*  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (WbgO) [9], and further improved in antibiotic-free cultures [10]. However, mixtures of lacto-*N*-triose and LNT were produced in these systems, which will require additional metabolic engineering refinement.

LNT chemical and enzymatic syntheses can be grouped in two general strategies: the “linear approach” that mimics the biosynthetic pathway by sequential addition of two monosaccharide units on the non-reducing end of lactose, and the “convergent approach” through coupling of lacto-*N*-biose (LNB) and lactose as disaccharide building blocks. Recent chemical synthesis of LNT includes both strategies, the linear [11] and convergent [12] approaches, where the protecting-leaving group combinations were critical to achieve successful glycosylations. The low yields and multistep pathways currently limit the scalability of the chemical synthesis.

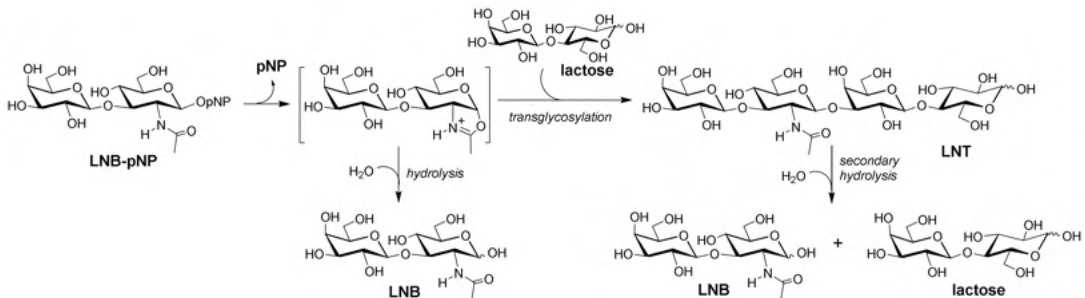
To overcome the limitations of chemical synthesis and develop green and sustainable technologies, current efforts are addressed to enzymatic synthesis, with two competing strategies: the use of hydrolytic glycosidases endowed with some natural transglycosylating activity but often requiring further enzyme engineering to improve the transglycosylation over hydrolysis ratio, and the use of glycosyltransferases with sugar nucleotide donors, which are highly efficient but often difficult to isolate and require expensive donors or complex regeneration systems.

With glycosyltransferases mimicking the biosynthetic pathway, GlcNAc transfer from UDPGlcNAc to lactose catalyzed by *N. meningitidis* LgtA produced lacto-*N*-triose at 87% yield [13]. Next, galactosyl transfer from UDPGal using the  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase WbgO from *E. coli* afforded benzyl-LNT at 87% at the mg scale [14]. An improved strategy has been recently reported by the Chen group using two sequential one-pot multienzyme (OPME) systems [15]. Thanks to the identification of a highly efficient  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase from *Chromobacterium violaceum* (Cv $\beta$ 3GalT), multigram scale synthesis of LNT at 99% yield from lactose was achieved. Although highly efficient, the use of glycosyltransferases for preparative and large scale synthesis is hampered by the need for expensive sugar nucleotide donors. Glycosyl hydrolases able to catalyze the synthesis of glycosidic bonds by kinetically-controlled transglycosylation from cheap and stable arylglycoside donor substrates are an attractive alternative for industrial applications, but such an approach is not yet well developed for LNT synthesis.

Grounded on the “linear approach” starting from lactose, a transglycosylating mutant of *Bifidobacterium bifidum* *N*-acetylhexosaminidase (*BbH1*) has been recently reported to give 84% yield in lacto-*N*-triose using GlcNAc-*p*NP (*p*NP: *p*-nitrophenyl) as donor substrate [16]. However, elongation with *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase-catalyzed transglycosylation of *o*-nitrophenyl  $\beta$ -galactoside to lacto-*N*-triose rendered a poor 22% yield in LNT [17,18]. With regard to the “convergent approach”, direct coupling of lacto-*N*-biose (LNB) to lactose through a  $\beta$ -1,3 linkage has been attempted by transglycosylation reactions using lacto-*N*-biosidases. The first lacto-*N*-biosidase-mediated transglycosylation used an enzyme from *Aureobacterium* sp., although it was rather inefficient, with LNT yields of 1–3% [17]. When lacto-*N*-biosidase was discovered from *B. bifidum* (LnbB) showing its metabolic function to hydrolyze LNT to LNB and lactose for uptake by bifidobacteria, the authors also detected some transglycosylation activity when using LNB-*p*NP and lactose as donor and acceptor substrates [19]. A different strategy based on the glycosynthase-like technology has been recently reported by the Nidetzky group using a mutant with compromised hydrolase activity and lacto-*N*-biose 1,2-oxazoline as activated donor substrate [20]. Whereas the mutant D320A showed very low synthase activity, the D320E mutant produced LNT up to 30% yield, which was stable over extended reaction times, but the enzyme still retained high activity for hydrolysis of the intrinsically labile oxazoline donor.

The originally detected transglycosylation activity of LnbB [19] prompted us to initiate a protein engineering program to enhance the synthetic capabilities of the enzyme with

a stable arylglycoside donor substrate amenable for scaling up LNT synthesis. Here we explore the ability of LnbB mutants to perform direct transglycosylation reactions using LNB-*p*NP as donor substrate (Figure 1). Based on the crystal structure of LnbB in complexes with LNB and LNB-thiazoline [21] and our previous study on the conservation of active site topologies in family GH20 (*N*-acetylhexosaminidases including LnbB) [22], a series of donor subsite mutants were designed and evaluated for their transglycosylation activity and diminished hydrolase activity. We report the first transglycosylating LnbB variant for LNT synthesis.



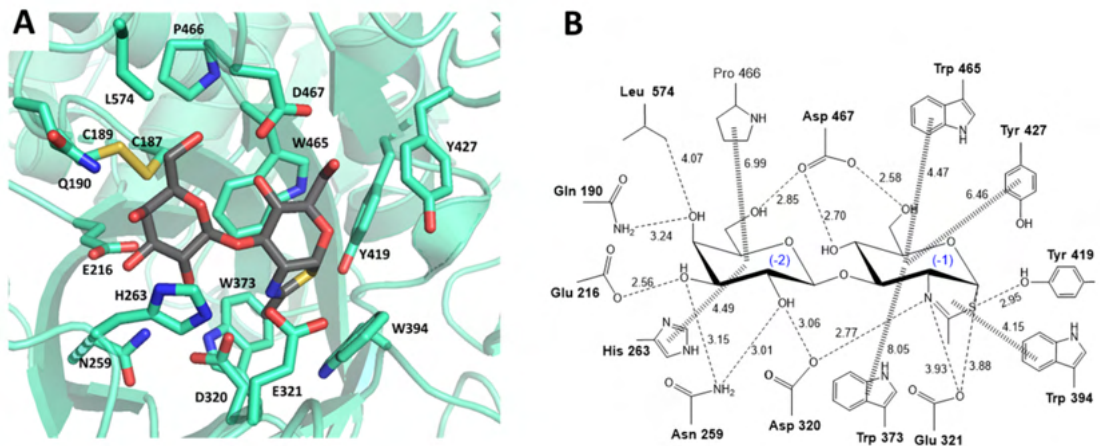
**Figure 1.** Synthesis of lacto-*N*-tetraose (LNT) by transglycosylation with engineered lacto-*N*-biosidase (LnbB) variants. Hydrolysis: primary hydrolysis of the donor substrate; secondary hydrolysis: hydrolysis of the product.

## 2. Results

### 2.1. LnbB Mutants Design

*Bifidobacterium bifidum* LnbB [19,22] is a member of family GH20 in the Carbohydrate Active Enzymes (CAZy) classification [23] that operates by substrate-assisted catalysis. The 2-acetamido group of the substrate acts as an intramolecular nucleophile leading to an oxazoline/oxazolonium intermediate that is attacked by a nucleophilic water to render the final hydrolysis product with net retention of the anomeric configuration [24–26] (Figure 1, detailed mechanism in Figure S1, Supplementary Materials). In retaining glycoside hydrolases, transglycosylation (T) takes place in competition to hydrolysis (H), and a number of studies on diverse GH families are addressing different strategies to modify the T/H ratio. Not only the donor substrate but also the transglycosylation product can be hydrolyzed (secondary hydrolysis) as it is the natural substrate of the hydrolytic activity of the enzyme, thus requiring tight kinetic control. Protein engineering approaches to modulate the T/H ratio towards improved transglycosylation can be grouped in three complementary strategies (reviewed in [3,27]): (i) decrease hydrolysis by mutations at the donor (negative) subsites of the active site that reduce transition state stabilization, (ii) enhance acceptor binding to compete with water by mutations that increase affinity to the acceptor (positive) subsites, and (iii) modify the hydrophilic/hydrophobic balance at the active site to reduce the accessibility or reactivity of the nucleophilic water. A promising approach towards reducing the hydrolase activity while enhancing transglycosylation (strategy (i) above) is based on replacing the enzyme's most conserved residues by structural analogues in the donor subsites [28].

Inspection of the X-ray structure of LnbB in complex with LNB and LNB-thiazoline [21] identifies the amino acid residues that directly interact with the ligand in the donor subsites (-2 and -1) (Figure 2). Most of them are highly conserved among GH20 enzymes (see sequence alignment in Figure S2) and were selected for mutational analysis.



**Figure 2.** (A) X-ray structure of *Bifidobacterium bifidum* lacto-*N*-biosidase (LnbB) complexed with LNB-thiazoline inhibitor (PDB ID: 4JAW). First shell residues shaping the donor subsites in the active site are shown in sticks. (B) Enzyme-ligand interactions map at donor subsites (-2, -1). Amino acid residues mutated in this work are in bold.

First shell residues in subsite -1, Trp373, Trp394, Tyr419 and Trp465 are conserved in GH20 enzymes and were replaced by Phe. Other mutations for Trp394 were also analyzed since it is located in a position not only interacting with the substrate but also close to the catalytic acid/base Glu321. Tyr427, although not conserved, is also in the first shell and was mutated to Phe. Subsite -2 is dominated by hydrogen-bonding interactions with the substrate, and both conserved (Asp320, Asp467, Asn259 and His263) and non-conserved (Gln190, Glu216 and Leu 574) residues were replaced by structural analogues or alanine (Table 1). The residues of the catalytic machinery, the acid/base Glu321 and Asp320 as assisting residue, were also mutated as controls to evaluate the residual hydrolase activity due to knocking out these essential residues.

## 2.2. Hydrolase Activity of LnbB Mutants

To evaluate the impact of the mutations on the hydrolytic activity of the enzyme, specific activities ( $SA_H$ ) with 250  $\mu$ M LNB-*p*NP substrate at pH 4.5 (optimum pH of the wt enzyme [22]) and 30 °C were determined by monitoring the release of *p*NP (discontinuous assay, see Methods). Under these conditions of substrate concentration below  $K_M$  ( $\approx$ 500  $\mu$ M for the wt enzyme, see below),  $SA_H$  reflects  $k_{cat}/K_M$  in order to compare the effect of the mutations on catalytic efficiency. As summarized in Table 1, all mutations decreased the hydrolase activity, with residual activities ranging from 60 to 0.1% relative to the wild type enzyme, except the mutant D320A at the catalytic assisting residue that was highly inactive and retained less than 0.04% of the wt activity ( $10^4$ -fold decrease), and W394K that was inactive probably due to the destabilizing positive charge introduced close to the anomeric carbon (strongly destabilizing the oxocarbenium-like transition state). In general, mutations at residues located in the -1 subsite had a larger impact than those located in subsite-2.

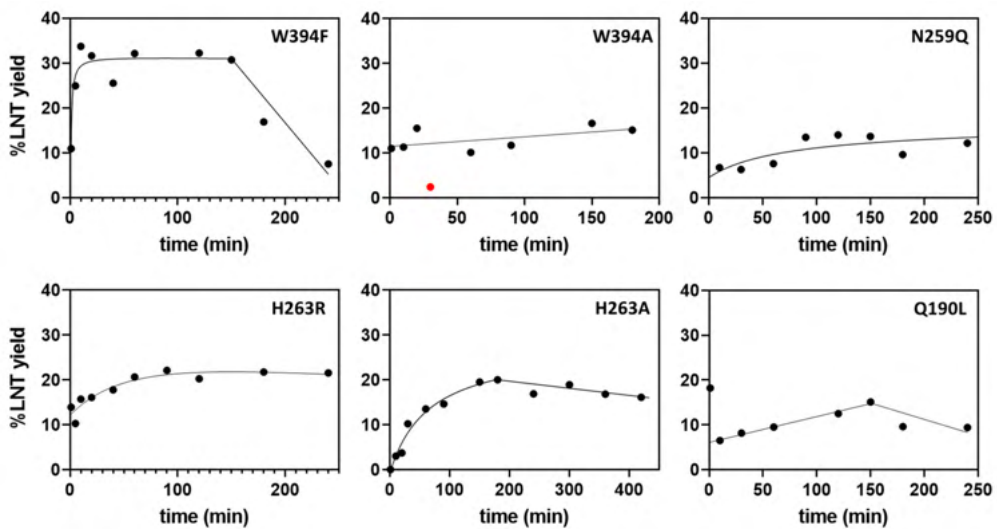
**Table 1.** Hydrolase activity on LNB-*p*NP and transglycosylation yields for LNT by LnbB mutants.

RESIDUE (Subsite)	MUTANT	SA <sub>H</sub> <sup>1</sup> (s <sup>-1</sup> )	%H <sup>2</sup> (mut/wt)	% LNT <sup>3</sup> Yield (max)	t (min) <sup>4</sup> Max Yield	t Interval <sup>5</sup> (min)
WT	WT	24 ± 1.8	100	n.d. <sup>6</sup>		
Trp373 (-1)	W373F	3.7 ± 0.2	15.4	0.5	30	30–120
	W394F	0.07 ± 0.01	0.28	32	105	60–150
Trp394 (-1)	W394A	0.030 ± 0.001	0.13	16.6	150	90–180
	W394K	<0.01	<0.04	n.d.		
	W394E	0.031 ± 0.002	0.12	5.6	180	20–360
	W394Q	0.011 ± 0.001	0.04	6.8	1440	1434–45
Tyr419 (-1)	Y419F	0.13 ± 0.09	0.6	1.8	1	1–10
Tyr427 (-1)	Y427F	15.4 ± 0.8	64	2.1	1	1–3
Trp465 (-1)	W465F	0.06 ± 0.03	0.3	4.1	300	1–360
Glu321 *(-1)	E321A	0.80 ± 0.08	3	-		
Asp320 ** (-1/-2)	D320A	<0.01	<0.04			
	D320E	0.24 ± 0.02	1.0	3.3	90	60–120
Gln190 (-2)	Q190L	0.14 ± 0.02	0.6	15	150	120–180
	Q190H	10 ± 1	43.3	1.4	240	1–240
Glu216 (-2)	E216A	4.3 ± 0.2	18.0	4.3	5	1–10
	E216D	8.7 ± 0.5	36	3.5	10	1–60
Asn259 (-2)	N259A	0.4 ± 0.1	1.6	10.6	20	10–30
	N259Q	0.017 ± 0.002	0.07	16.3	360	90–360
His263 (-2)	H263R	0.20 ± 0.01	0.8	17	90	40–240
	H263A	0.14 ± 0.03	0.6	21	240	90–360
Asp467 (-1/-2)	D467A	0.34 ± 0.03	1.4	0.5	30	30–120
	D467E	2.5 ± 0.6	10.4	2.8	5	3–30
Leu574 (-2)	L574V	15 ± 3	65	1.9	1	1–5

\* General acid/base. \*\* Assisting residue <sup>1</sup> SA<sub>H</sub>: specific hydrolytic activity: Conditions 250 μM LNB-*p*NP, 50 mM citrate / 50 mM phosphate buffer, pH 4.5 and 30 °C. <sup>2</sup> %H: percentage of hydrolase activity relative to wt. <sup>3</sup> %LNT yield (max): maximum yield (%) from donor substrate. Conditions: 2.5 mM of LNB-*p*NP, 200 mM of lactose, 50 mM citrate / 50 mM phosphate buffer, pH 4.5 and 30 °C. <sup>4</sup> Reaction time at which the yield of LNT is maximum. <sup>5</sup> Time interval in which %LNT is within ±5% than %LNTmax. <sup>6</sup> n.d.: not detected.

### 2.3. Formation of LNT by Transglycosylating LnbB Mutants

Wild-type LnbB has negligible transglycosidase activity [19]. The ability of the mutant enzymes to perform transglycosylation was first assayed by monitoring the time course of LNT product formation (by HPLC-MS, see methods) using 2.5 mM LNB-*p*NP donor and 200 mM lactose acceptor at pH 4.5 and 30 °C, corresponding to saturating donor concentration and high acceptor/donor ratio. Results are summarized in Table 1 and expressed as maximum yield in LNT product (%LNT). For those mutants showing transglycosylation, LNT is initially formed to reach a maximum value, but then it is hydrolyzed due to secondary hydrolysis. Figure 3 presents the time course of LNT formation of representative transglycosylating mutants. Two features are considered in these plots: the maximum LNT yield and the time interval in which the product lasts before it is hydrolyzed.

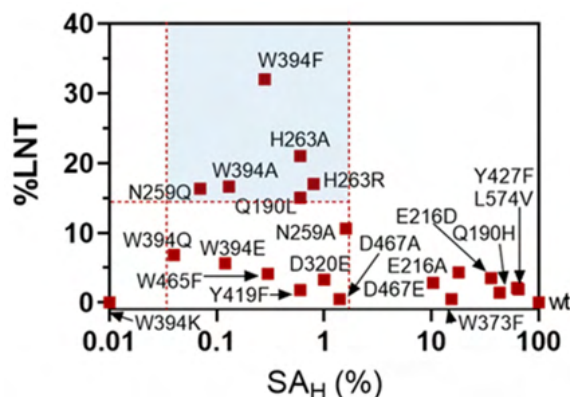


**Figure 3.** Time course monitoring of LNT formation by HPLC-MS for selected mutants (%LNT max >15%).

When plotting LNT maximum yield of the transglycosylation reaction (%LNT) against hydrolase activity on LNB-*p*NP ( $SA_H$  in the absence of acceptor), the different mutants can be clustered in three groups (Figure 4): mutant enzymes with residual hydrolase activity ( $SA_H$ ) >1.6% of the wt, which do not have (or have low) transglycosylation activity, highly inactive mutants with  $SA_H$  <0.05% of the wt, and mutants that lay in between, with  $0.05\% < SA_H < 1.6\%$ , which present significant transglycosylation activity. In this last group, six mutants show a maximum LNT yield higher than 15% (W394F, W394A, Q190L, N259Q, H263R, H263A), highlighting the role of these residues in the donor subsites, Trp394 in subsite -1, and Gln190, Asn259 and His263 in subsite -2, whose mutation strongly reduces the hydrolase activity and enhances the transglycosylation capability in the presence of acceptor. Larger enzyme inactivation, as in the mutants with  $SA_H$  lower than 0.05% of the wt enzyme, leads to essentially dead enzymes unable to catalyze neither hydrolysis nor transglycosylation. Therefore, a window of strongly reduced but not abolished hydrolase activity (in the range of 0.05 to 1.6% of the wt activity) seems to furnish the mutant with transglycosylating activity. Of all mutants, W394F was the most promising with 32% yield in LNT formation and a significant life-time of the product before secondary hydrolysis became significant (Figure 3).

Reactions were performed at pH 4.5, that is, the pH optimum of the hydrolase activity of the wt enzyme [22]. To evaluate the effect of pH on the transglycosylation activity, the two best mutants in terms of %LNT (W394F and H263A) were analyzed at higher pH values with the aim of reducing the hydrolase activity that may result in increased transglycosylation yield. However, no significant effect was observed in the range of pH 4.5 to 7, and a decrease in %LNT at pH 9 (data not shown).





**Figure 4.** Transglycosylation yields (%LNT) vs. hydrolase activity ( $SA_H$ ) plot for LnbB mutants at donor subsites. Transglycosylating mutants are those with a  $SA_H$  between 0.05 and 1.6 % of the wt enzyme.

When combining the best transglycosylating single mutants (at positions Trp394, His263 and Gln190) with other mutations with significant activity (Table 2), none of them gave higher %LNT than the parental single mutants. Therefore, no synergistic effects were observed with these combinations.

**Table 2.** Hydrolase activity on LNB-*p*NP and transglycosylation yields for LNT by LnbB double mutants.

MUTANT	$SA_H$ <sup>1</sup> (s <sup>-1</sup> )	% H <sup>2</sup> (mut/wt)	% LNT <sup>3</sup> Yield (max)
W394F_Y419F	0.014 ± 0.009	0.06	4.7
W394F_N259A	0.0060 ± 0.0008	0.02	2.9
W394F_N259Q	0.0053 ± 0.0003	0.02	n.d
W394F_H263A	0.044 ± 0.003	0.2	5.2
H263R_Y419F	<0.01	<0.04	0.7
H263A_Y419F	0.05 ± 0.005	0.2	1
Q190L_Y419F	0.17 ± 0.01	0.7	9.7

<sup>1</sup>  $SA_H$ : specific hydrolytic activity: Conditions 250  $\mu$ M LNB-*p*NP, 50 mM citrate/50 mM phosphate buffer, pH 4.5 and 30 °C. <sup>2</sup> %H: percentage of hydrolase activity relative to wt. <sup>3</sup> %LNT yield (max): maximum yield (%) from donor. Conditions: 2.5 mM of LNB-*p*NP, 200 mM of lactose, 50 mM citrate/50 mM phosphate buffer, pH 4.5 and 30 °C.

#### 2.4. Transglycosylation Activity of Selected Mutants

Mutants showing a maximum LNT yield >15% were selected to determine the specific activity in transglycosylation mode ( $SA_T$ ) and calculate an apparent T/H ratio. Release of *p*NP relates to the first step in the double displacement mechanism and therefore the specific activities calculated from the rate of *p*NP release are an aggregate value that accounts for the global activity. In the absence of an acceptor,  $SA_H$  is the hydrolase activity (since no self-condensation occurs due to the substrate specificity of the enzyme), whereas in the presence of an acceptor the initial rate of *p*NP release reflects transglycosylation but also includes donor hydrolysis at initial reaction times ( $SA_T$ ). Using a constant donor concentration (250  $\mu$ M LNB-*p*NP, not saturating concentration), initial rates were determined in the absence and presence of lactose acceptor (concentration varying from 100 to 600 mM) (Figure S3). For W394F, H263R and N259Q rates increased with lactose concentration up to a maximum at 200–400 mM lactose, whereas for mutants W394A and Q160L, the opposite effect was observed (inhibition of *p*NP release by lactose) and H263A showed essentially no dependence with lactose concentration.  $SA_T$  was calculated at 200 mM lactose in order to compare the apparent T/H ratio among mutants.



Initial rates of hydrolysis ( $SA_H$ , in the absence of acceptor) and transglycosylation at 200 mM lactose ( $SA_T$ ) are summarized in Table 3. Mutant W394F displayed the highest  $SA_T/SA_H$  ratio (1.41), consistent with its higher maximum yield (32%) in LNT formation (%LNT, Table 1), followed by N259Q and H263R. For the other mutants, no correlation between the apparent T/H ratio and %LNT was observed since all of them rendered essentially the same maximum yield of LNT (%LNT in the range of 15 to 21%).

**Table 3.** Specific activities ( $SA_H$ ,  $SA_T$ ) for transglycosylating LnbB mutants.

MUTANT	$SA_H$ <sup>1</sup> (s <sup>-1</sup> )	$SA_T$ <sup>2</sup> (s <sup>-1</sup> )	App.T/H Ratio <sup>3</sup>
wt	27.7 ± 1.54	27.96 ± 2.63	1.0
W394F	0.069 ± 0.003	0.098 ± 0.0001	1.4
W394A	0.024 ± 0.004	0.018 ± 0.002	0.8
H263R	0.169 ± 0.003	0.22 ± 0.02	1.3
H263A	0.135 ± 0.001	0.13 ± 0.02	0.9
N259Q	0.017 ± 0.001	0.023 ± 0.005	1.3
Q190L	0.135 ± 0.003	0.122 ± 0.004	0.9

<sup>1</sup>  $SA_H$  at 250  $\mu$ M LNB-*p*NP. <sup>2</sup>  $SA_T$  at 250  $\mu$ M LNB-*p*NP, 200 mM lactose. <sup>3</sup> Apparent T/H ratio as  $SA_T/SA_H$  ratio in the presence and absence of lactose acceptor determined from the rates of *p*NP release. Conditions: 50 mM citrate/50 mM phosphate buffer, pH 4.5 and 30 °C.

#### 2.5. Kinetic Parameters for Donor Substrate in Hydrolysis and Transglycosylation Modes

To further understand the effect of the mutations at the donor subsites on the apparent T/H ratio, the kinetic parameters for hydrolysis and transglycosylation reactions of the selected mutants were evaluated. Donor kinetic constants were determined from the initial rates of *p*NP release when varying the donor concentration (1 to 1000  $\mu$ M LNB-*p*NP) in the absence of an acceptor (hydrolase activity) and at fixed saturation concentration of an acceptor (200 mM lactose). Kinetics followed a hyperbolic dependence with the donor substrate and data were fitted to a Michaelis-Menten equation to calculate the apparent kinetic constants (Table 4 and Figure S5).

**Table 4.** Kinetic parameters (donor substrate) of LnbB-catalyzed hydrolysis and transglycosylation reactions.

MUTANT	Hydrolysis Mode			Transglycosylation Mode			
	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )	T/H ( $k_{cat}/K_M$ ) <sup>1</sup>
WT	80 ± 8	520 ± 120	1.53 · 10 <sup>5</sup>	90 ± 13	750 ± 200	1.20 · 10 <sup>5</sup>	0.8
W394F	0.186 ± 0.008	260 ± 30	7.18 · 10 <sup>2</sup>	0.26 ± 0.02	240 ± 52	1.09 · 10 <sup>3</sup>	1.5
W394A	0.041 ± 0.003	87 ± 22	4.58 · 10 <sup>2</sup>	0.06 ± 0.01	530 ± 190	1.19 · 10 <sup>2</sup>	0.3
H263R	1.0 ± 0.2	780 ± 310	1.29 · 10 <sup>3</sup>	1.0 ± 0.2	720 ± 300	1.44 · 10 <sup>3</sup>	1.1
H263A	0.67 ± 0.03	670 ± 60	9.82 · 10 <sup>2</sup>	1.08 ± 0.18	1280 ± 320	8.93 · 10 <sup>2</sup>	0.9
N259Q	0.034 ± 0.002	235 ± 42	1.45 · 10 <sup>2</sup>	0.07 ± 0.01	490 ± 150	1.50 · 10 <sup>2</sup>	1.0
Q190L	0.201 ± 0.009	34 ± 7	5.93 · 10 <sup>3</sup>	0.41 ± 0.02	78 ± 14	5.24 · 10 <sup>3</sup>	0.9

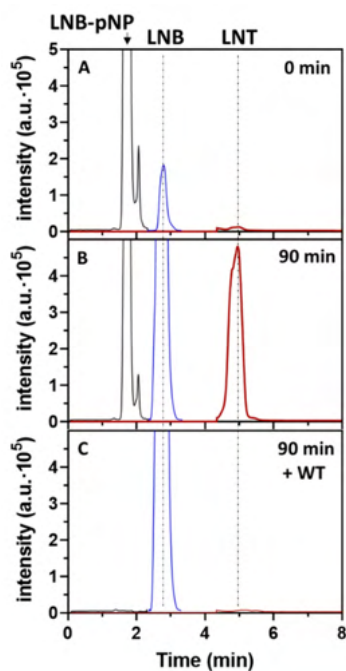
<sup>1</sup> Apparent T/H ratio calculated as the ratio of  $k_{cat}/K_M$  values. Conditions: hydrolysis 10–1000  $\mu$ M LNB-*p*NP, transglycosylation 10–1000  $\mu$ M LNB-*p*NP, 200 mM lactose, in 50 mM citrate/50 mM phosphate buffer, pH 4.5 and 30 °C.

Mutants H263R and Q190L still retain significant residual hydrolase activity, with  $k_{cat}/K_M$  values of 2-orders of magnitude lower than the wt enzyme, whereas the other mutants (including the best transglycosylating mutant W394F) showed a 3-orders of magnitude reduction of hydrolase activity. In the presence of a lactose acceptor, a significant increase of apparent  $K_M$  of the donor is only observed for W394A (about 6-fold), whereas the other mutants show a minor effect of lactose on apparent  $K_M$  values ( $\leq 2$ -fold) for the donor substrate. Significantly, the apparent  $K_M$  for the best transglycosylating mutant (W394F) is not altered but  $k_{cat}$  (for *p*NP release) is doubled in the presence of lactose, consistent with its higher yield in LNT product. Since  $K_M$  values are different among mutants, the apparent T/H ratios were recalculated from  $k_{cat}/k_M$  values (Table 4, Figure S4),

but they followed the same trend as the apparent T/H ratios at 250  $\mu$ M donor concentration shown in Table 3. These data also confirm that transglycosylation reactions of all selected TG mutants at 2.5 mM donor, 200 mM acceptor to determine %LNT (Table 1) were at saturating conditions of the donor substrate.

### 2.6. Regioselectivity of Tetrasaccharide Formation by LnbB W394F Mutant

Mutant W394F is the best transglycosylating mutant to synthesize LNT. The protein is produced with similar expression yields to the wt enzyme and has the same thermal stability (Figure S6). To assess the regioselectivity of glycoside bond formation, the reaction product was treated with wt LnbB to monitor hydrolysis. As shown in Figure 5, a standard reaction with 2.5 mM LNB-*p*NP + 200 mM lactose and 1  $\mu$ M W394F enzyme was left until the product was accumulated, followed by enzyme heat inactivation at 100 °C. Then, wt enzyme was added, showing a rapid hydrolysis of the product back to LNB and lactose. The remaining LNB-*p*NP donor still present in the heat-inactivated reaction was also immediately hydrolyzed by the wt enzyme. Since wt LnbB is specific for hydrolysis of the central  $\beta$ 1,3 linkage of LNT (inactive on a  $\beta$ 1,4 linkage [19]) and the retention time of the transglycosylation product is identical to that of a LNT standard, these results are in agreement with  $\beta$ 1,3 glycosidic bond formation in the TG reaction.



**Figure 5.** HPLC-MS monitoring of the transglycosylation reaction catalyzed by LnbB W394F. Reaction conditions: 1  $\mu$ M enzyme, 2.5 mM LNB-*p*NP, 200 mM lactose, citrate-phosphate buffer pH 4.5. (A)  $t = 0$  min; (B)  $t = 90$  min, followed by heat inactivation; (C) After addition of wt LnbB (1  $\mu$ M) for 15 min. Detection by EI-MS. Lactose acceptor is not shown since it is in large excess.

### 3. Discussion

With the aim of engineering TG activity into LnbB, selection of donor subsite residues was based on the emerging concept that mutation of conserved residues interacting with the substrate may unbalance the T/H ratio towards transglycosylation [28]. We selected residues located in subsites -1 and -2 (donor subsites) of LnbB that interact with the substrate according to the X-ray structure of an enzyme-ligand complex (Figure 2, ref [21]),

most of them conserved within family GH20 *N*-acetylhexosaminidases. Destabilizing enzyme-donor interactions at the transition state will reduce hydrolytic activity but eventually improve TG activity. Similar mutations have been analyzed in few related GH20 enzymes. To compare results, targeted residues can be grouped as follows:

### 3.1. Assisting Residue

In LnbB, mutation D320A has a drastic effect on hydrolase activity, resulting in an essentially dead enzyme, whereas D320E has a significant effect (1% hydrolase activity) but induces poor TG activity (3.3% LNT, Table 1). Equivalent mutations in GH20 *N*-acetylhexosaminidases showed different results. *B. bifidus* BbH1 has a quite high native TG activity (45% in [16], 16% in [28] depending on the experimental conditions) to produce lacto-*N*-triose (LNT-II) from GlcNAc-*p*NP and lactose as donor and acceptor substrates. Upon mutation of the assisting residue, D746T (also labeled as D714T depending on the sequence numbering) exhibited improved TG activity with 84.4% yield in LNT-II [16]. Likewise, mutations of the assisting residue in *T. flavus* TfHex (D370G, A, L or N) showed a large decrease of hydrolase activity but, surprisingly, D370V had higher activity. Those mutants with reduced hydrolase activity all presented some TG activity with GlcNAc-*p*NP as a donor and acceptor substrate to produce a mixture of chito oligosaccharides [29]. From the results reported here, LnbB mutants at the assisting residue strongly reduce the hydrolytic activity but, as opposed to other GH20 enzymes, have no impact on TG activity. Assisting residue mutations have also been assayed in glycosynthase-type reactions using oxazoline donors. In BbH1 with GlcNAc-oxazoline as activated donor and lactose acceptor, LNT-II was produced in 86% yield with mutant D746E [30]. The yield was further improved with an immobilized version of the enzyme packed into a fixed bed for continuous production of LNT II [31]. The high yields with the BbH1 enzyme mutants both with GlcNAc-*p*NP and GlcNAc-oxazoline donors do not translate to LnbB. With LnbB D320E using LNB-oxazoline as donor and lactose as an acceptor, LNT product reached a significantly lower 30% yield due to the high hydrolysis of the oxazoline donor [20] and, as shown here, the same mutant with LNB-*p*NP donor showed poor TG activity.

### 3.2. Hydrophobic Platform

Three conserved tryptophan residues (Trp373, Trp394 and Trp465) in subsite -1 of LnbB, when mutated to reduce the hydrolase activity, have different impacts on TG activity (Table 2). Trp394 and Trp465 are both located in subsite -1. Trp465 establishes a stacking interaction with the GlcNAc ring whereas Trp394 is perpendicular to the sugar ring and close to C1 and C2, stabilizing the oxazoline/oxazolonium intermediate (Figure 2). W465F mutant reduces the hydrolase activity (0.3% of the wt) but has minor effect on TG activity (4.1% yield in LNT, Table 1). Remarkable is the W394F mutant, with 0.3% hydrolase activity but with outstanding TG activity, reaching 32% LNT yield. An Ala mutation (W394A) also showed a significant TG activity (16.6% LNT yield), while polar mutations in this position (W394K, E, Q) were detrimental (Table 1). Conserved Trp residues in other GH20 *N*-acetylhexosaminidases also impact the T/H ratio. In BbH1, mutation W882H (position equivalent to Trp465 in LnbB) significantly improved TG activity with 66% yield in LNT-II formation (compared to 16% for the WT), whereas W801H (position equivalent to Trp394 in LnbB) retained the same TG activity as the WT (17%). These results are opposed to those obtained here for LnbB mutants, since W394F in LnbB gave the highest TG yield while mutation of the equivalent position in BbH1 (W801H) had no effect on TG activity, and mutant BbH1 W882H gave high TG activity whereas the equivalent LnbB residue (W465F) had a minor effect on TG activity. Although equivalent positions in the sequence alignment, these results may reflect the different relative orientation of the side chains in the 3D structures (not solved for BbH1). Finally, Trp373 in LnbB was also mutated, but to the best of our knowledge, the equivalent position has not been studied in other GH20 enzymes [32]. Although close to the sugar ring in subsite -1, W373F retained 15% of the wt

hydrolase activity and had almost no effect on TG activity. The Phe substitution seems to maintain the stacking interaction with little effect on activity.

### 3.3. Catalytic Tyrosine

Tyr419 in LnbB is a conserved essential residue in GH20 enzymes as well as in GH18 chitinases and GH85 endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidases, which is located in subsite -1 interacting with the oxazoline intermediate [24,25]. Mutation of this Tyr residue in *TfHex* (Y470F, H, N) drastically reduced the hydrolase activity (0.5 to 4% of the wt) but conferred TG activity with GlcNAc-*p*NP as substrate leading to chitooligosaccharides with moderate yields [33]. In *BhH1*, mutant Y827F was used in glycosynthase-type reactions with GlcNAc-oxazoline donor and lactose as an acceptor reaching up to 80% yield in LNT-II at a short reaction time, but the product was degraded by the residual hydrolase activity of the enzyme [30]. However, the equivalent mutation Y419F in LnbB, although it only retained 0.5% hydrolase activity, showed low (1.8%) TG activity. This mutant was also tested in a glycosynthase-type reaction with LNB-oxazoline, but the residual hydrolase activity rapidly degraded the product [20].

### 3.4. Mutations in Subsite -2

We also evaluated the effect of mutations at residues interacting with the donor substrate in subsite -2 that have no equivalent in *N*-acetylhexosaminidases where the binding cleft is restricted to subsite -1. Residues Gln190, Glu216, Asn259, His263, Asp467 and Leu574 shape subsite -2 for accommodation of the  $\beta$ 1,3-linked Gal unit of the substrate by establishing a network of H-bonding interactions with all the hydroxyl groups of the substrate. Mutants that reduce the hydrolase activity to about 1% than that of the wt (Q190L, N259A,Q; H263A,R, Table 1) do show TG activity with LNT yields in the range of 10–20%. Asp467 is an exception; it interacts with both sugar units in subsites -1 and -2 but D467A, with 1.4% hydrolase activity, is not a transglycosylating mutant. This is in agreement with mutation of the equivalent residue Asp884 of *BhH1*, where the D884N mutant even reduced the wt TG activity (12% for D884N compared to 16% for wt) [28].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Substrates

*p*-Nitrophenyl lacto-*N*-bioside (LNB-*p*NP) and lacto-*N*-tetraose (LNT) were obtained from Biosynth Carbosynth. Lacto-*N*-biose (LNB) was kindly provided by Dr. M. Kitaoka (National Agriculture and Food Research Organization, NARO, Tsukuba, Ibaraki, Japan). Lactose and all general chemicals were from Sigma-Aldrich.

### 4.2. Mutants Preparation by Site Directed Mutagenesis

The full-length LnbB gene was previously cloned into a pET24b vector (Novagen, Madison, WI, USA) obtaining the expression plasmid pET24b-LnbB-FL [22]. This construct was used as template to introduce single and double mutants by PCR Site-Directed Mutagenesis (Quik Change protocol, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For each single mutant, a sense/antisense partially overlapping primers pair was designed (Table S1). Double mutants were prepared on the previous single mutant as template in a second mutagenesis reaction. The PCR reactions were performed with Iproof polymerase in a final volume of 40  $\mu$ L containing 5 ng of template DNA, 0.5  $\mu$ M of each sense/antisense primer and Iproof High-fidelity 2 $\times$  mix (0.04U/ $\mu$ L, Bio-Rad). PCR conditions consisted of an initial denaturalization (98  $^{\circ}$ C for 3 min) followed by 30 cycles of denaturalization (95  $^{\circ}$ C for 30 s), annealing (30 s at different annealing temperatures depending of the primer), extension (72  $^{\circ}$ C for 4 min), and final extension (72  $^{\circ}$ C for 3 min). PCR products were purified with GenElute<sup>TM</sup> PCR Clean-Up Kit from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, then digested with *DpnI* during 1.5–3 h at 37  $^{\circ}$ C. After enzyme inactivation at 80  $^{\circ}$ C for 20 min, *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cells were transformed with the mutagenesis reactions. Isolated

plasmids from the transformants were verified by DNA sequencing (Stab Vida, Caparica, Portugal) and used to transform *E. coli* BL21 (DE3) Star cells for protein expression.

#### 4.3. Expression and Purification of Lacto-N-Biosidase Mutants

*E. coli* BL21 (DE3) Star cells harboring the mutated pET24b-Lnb-FL plasmids were grown following an autoinduction protocol [34] in Luria Broth (LB) media supplemented with kanamycin (30 µg/mL), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (25 mM), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (25 mM), NH<sub>4</sub>Cl (50 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM), MgSO<sub>4</sub> (2 mM), glycerol (0.5% *w/v*), glucose (0.05% *w/v*) and lactose (0.2% *w/v*) in a 30 mL final volume. Cultures were grown at 250 rpm, 30 °C for 24 h.

Cells were harvested by centrifugation and resuspended with 800 µL of resuspension buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.5) supplemented with 1 mM of PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride). Cells were disrupted by sonication in a Soniprep 150 sonifier at 4 °C (7 min, 10 s ON/ 20 s OFF, 50% amplitude); the soluble fraction was separated by centrifugation (14,000 rpm, 30 min, 4 °C). Proteins were purified using His SpinTrap columns (immobilized metal ion affinity chromatography) (GE Healthcare) following the manufacture's guidelines. Proteins were eluted with 50 mM imidazole in 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.5. The buffer was exchanged to resuspension buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl at pH 7.5) using a 30kDa Amicon ultrafiltration unit (Merk, Kenilworth, NJ, USA). Protein concentrations were determined with BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

#### 4.4. Hydrolase Activity Assay

The enzymatic reactions were performed at 30 °C in a total volume of 250 µL. The enzyme (different concentrations depending of the mutant) in 50 mM citrate-phosphate buffer at pH 4.5 was pre-incubated for 5 min at 30 °C. Then the reaction was initiated by adding LNB-*p*NP to 250 µM. At regular time intervals, 20 µL of reaction were added to 150 µL stop buffer (500 mM glycine at pH 11) using a Bravo liquid handling Robot (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The released *p*NP was measured at 405 nm in a microplate reader BioTec EL × 808. Chromophore concentrations were calculated by interpolation to a standard curve in the same buffer (1.3–300 µM *p*NP).

#### 4.5. Transglycosylation Activity Assay

Transglycosylation reactions were done using 1 µM enzyme, 2.5 mM LNB-*p*NP as a donor and 200 mM lactose as an acceptor in 50 mM citrate/50 mM phosphate buffer at pH 4.5 (or buffer at pH 4.5 to 9 for pH studies) in a total volume of 250 µL. All components except enzyme were pre-incubated at 30 °C for 5 min and the reaction started by adding the enzyme. At different time intervals 20 µL of reaction were extracted and mixed with 60 µL of stop solution (propanol-H<sub>2</sub>O (1:1)) and stored at 4 °C. Samples were analyzed by HPLC-MS (Infinity 1260 HPLC, ESI-MS 6100 series SQ, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using ACQUITY UPLC BEH Amide column 130 Å, 1.7 µm 2.1 × 100 mm (Waters) coupled to ACQUITY UPLC® BEH Amide VanGuard Pre-column 130 Å, 1.7 µm 2.1 × 5 mm (Waters) with 3 µL injection and isocratic elution with acetonitrile/water (65:35), 1% formic acid at 40 °C at a flow rate of 0.2 mL/min. MS detection was done in SIM mode monitoring different ion masses: [LNB-*p*NP + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> and [LNB-*p*NP + Na]<sup>+</sup> (*m/z* 522 and 527); [LNB + H]<sup>+</sup> and [LNB + Na]<sup>+</sup> (*m/z* 384 and 406); [LNT + H]<sup>+</sup> and [LNT + Na]<sup>+</sup> (*m/z* 708 and 730). External standards were used to quantify LNB, LNB-*p*NP and LNT.

#### 4.6. Enzyme Kinetics

Kinetics were carried out at 30 °C in a final volume of 250 µL using a Bravo liquid handling Robot (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Enzymatic reactions were done with different LNB-*p*NP concentrations (between 0 and 1 mM) and lactose (0 to 600 mM) in 50 mM citrate / 50 mM phosphate buffer, pH 4.5. Solutions were pre-incubated at 30 °C for 5 min, then the enzyme was added to give a final concentration ranging from 10 nM to 1 µM depending on the mutant. At different time intervals, 20 µL were withdrawn and

mixed with 150  $\mu\text{L}$  of stop buffer (0.5 M of glycine pH 11). The *p*-nitrophenol released was detected by absorbance at 405 nm in a microplate reader BioTec ELx808. *p*-Nitrophenol standard curve was performed under the same reaction conditions.

#### 4.7. W394F Thermal Stability

Purified protein (W394F or wt LnbB; 4  $\mu\text{M}$ ) in PBS (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, pH 7.5) was mixed with the commercial dye Sypro Orange (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:5000 dilution according to the manufacturer's protocol) in a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . The samples were subjected to a thermal gradient in a thermocycler (Rotogene 3000, Corbett Research, Cambridge, UK), consisting of 1 min at 25  $^{\circ}\text{C}$  followed by 1  $^{\circ}\text{C}$  increments (30 s at each temperature) up to 95  $^{\circ}\text{C}$ . The fluorescence was measured (ex 483 nm, em 560 nm), and  $T_m$  was determined by fitting the data to a Boltzmann sigmoidal equation using Prism (Prism v.8.3.0 Software, GraphPad, San Diego, CA, USA).

#### 4.8. Regioselectivity of Glycoside Bond Formation by W394A

A solution of donor and acceptor substrates in buffer at pH 4.5 was incubated at 30  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min and LnbB W394F enzyme was added to a final reaction volume of 150  $\mu\text{L}$  with final concentrations: 2.5 mM LNB-*p*NP, 200 mM lactose and 1  $\mu\text{M}$  W394F in 50 mM citrate-phosphate buffer at pH 4.5. At different time intervals (1, 30, 60 and 90 min), 10  $\mu\text{L}$  aliquots were withdrawn and mixed with 30  $\mu\text{L}$  of stop solution propanol- $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) stored at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Samples were analyzed by HPLC-MS (see transglycosylation assay method section). After 90 min, the enzyme was inactivated by heating at 100  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min and the reaction was analyzed by HPLC-MS following the same procedure. Then, to 30  $\mu\text{L}$  of the inactivated reaction at 30  $^{\circ}\text{C}$ , 2  $\mu\text{L}$  of WT enzyme (71.8  $\mu\text{M}$  stock) were added. After 5 and 15 min, 10  $\mu\text{L}$  aliquots were withdrawn, mixed with 30  $\mu\text{L}$  of stop solution and analyzed by HPLC-MS (SIM mode): LNB-*p*NP (donor substrate) at  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  ( $m/z$  522) +  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  527); LNB (hydrolysis product) at  $[\text{LNB}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  384) +  $[\text{LNB}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  406); LNT (TG product) at  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  708) +  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  730).

## 5. Conclusions

The comparative analysis of different GH20 mutant enzymes indicates that the background TG activity already present in the parental wt enzymes correlates with the improvement that can be achieved by the targeted mutations. Wt *BhH1* and *TfHex N*-acetylhexosaminidase already possess some TG activity and the selected mutations (assisting residue, conserved Trps and catalytic Tyr) result in a significant improvement of transglycosylation activity. On the other hand, wt LnbB has negligible TG activity (detected in [19] and in this work, but below the quantification limit) and most targeted mutations only afford low LNT product yields. As shown here, only mutants whose residual hydrolyase activity is in the range of 0.05 to 1.6% of the wt enzyme acquire some TG activity, with LNT maximum yields of 15–30%. In this framework, the W394F mutant is outstanding since this single mutation confers TG activity of up to 32% yield in LNT product. Compared with reported glycosynthase-type mutants with the labile LNB-oxazoline donor, the transglycosylating W394F mutant has the advantage of using a stable *p*NP-glycoside as donor substrate and therefore the reaction is amenable to be scaled up. A follow-up of this work will be the introduction of additional mutations in the acceptor subsites with the goal of adding beneficial binding interactions for the lactose acceptor that may result in even further enhanced TG efficiency.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/3230/s1>.

**Author Contributions:** M.C.-V. experimental investigation and data analysis; M.F., conceptualization, experimental design, data analysis and reviewing the manuscript, A.P. conceptualization, data analysis, supervision, writing and reviewing the manuscript, and funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.



**Funding:** Work supported by grants BFU2016-77427-C2-1-R and PID2019-104350RB-I00 from MICINN, Spain, and AGAUR grant 2017SGR-727 from the Generalitat de Catalunya (to A.P.).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** M.C-V. acknowledges a predoctoral contract from Institut Químic de Sarrià (IQS).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Fajjes, M.; Castejón-Vilatersana, M.; Val-Cid, C.; Planas, A. Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 667–697. [[CrossRef](#)]
2. Bych, K.; Mikš, M.H.; Johanson, T.; Hederos, M.J.; Vignsnaes, L.K.; Becker, P. Production of HMOs using microbial hosts—From cell engineering to large scale production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 130–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zeuner, B.; Teze, D.; Muschiol, J.; Meyer, A.S. Synthesis of Human Milk Oligosaccharides: Protein Engineering Strategies for Improved Enzymatic Transglycosylation. *Molecules* **2019**, *24*, 2033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Chen, X. Human Milk Oligosaccharides (HMOS): Structure, Function, and Enzyme-Catalyzed Synthesis. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; Volume 72, pp. 113–190. ISBN 9780128021415.
5. Walsh, C.; Lane, J.A.; Van Sinderen, D.; Hickey, R.M. From lab bench to formulated ingredient: Characterization, production, and commercialization of human milk oligosaccharides. *J. Funct. Foods* **2020**, *72*, 104052. [[CrossRef](#)]
6. Triantis, V.; Bode, L.; van Neerven, J.R.J. Immunological effects of human milk oligosaccharides. *Front. Pediatr.* **2018**, *6*, 190. [[CrossRef](#)]
7. Kunz, C.; Kuntz, S.; Rudloff, S. Bioactivity of Human Milk Oligosaccharides. In *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*; Moreno, F.J., Sanz, M.L., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2014; Volume 9781118426, pp. 5–20. ISBN 9781118817360.
8. Bode, L.; Contractor, N.; Barile, D.; Pohl, N.; Prudden, A.R.; Boons, G.J.; Jin, Y.S.; Jennewein, S. Overcoming the limited availability of human milk oligosaccharides: Challenges and opportunities for research and application. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 635–644. [[CrossRef](#)]
9. Baumgärtner, F.; Conrad, J.; Sprenger, G.A.; Albermann, C. Synthesis of the Human Milk Oligosaccharide Lacto-N-Tetraose in Metabolically Engineered, Plasmid-Free *E. coli*. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1896–1900. [[CrossRef](#)]
10. Baumgärtner, F.; Sprenger, G.A.; Albermann, C. Enzyme and Microbial Technology Galactose-limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* for the production of lacto-N-tetraose. *Enzym. Microb. Technol.* **2015**, *75–76*, 37–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Craft, K.M.; Townsend, S.D. Synthesis of lacto-N-tetraose. *Carbohydr. Res.* **2017**, *440–441*, 43–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bandara, M.D.; Stine, K.J.; Demchenko, A.V. The chemical synthesis of human milk oligosaccharides: Lacto-N-tetraose (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc). *Carbohydr. Res.* **2019**, *486*, 107824. [[CrossRef](#)]
13. Blixt, O.; Van Die, I.; Norberg, T.; Van Den Eijnden, D.H. High-level expression of the *Neisseria meningitidis* lgtA gene in *Escherichia coli* and characterization of the encoded N-acetylglucosaminyltransferase as a useful catalyst in the synthesis of GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal and GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal linkages. *Glycobiology* **1999**, *9*, 1061–1071. [[CrossRef](#)]
14. Liu, X.W.; Xia, C.; Li, L.; Guan, W.Y.; Pettit, N.; Zhang, H.C.; Chen, M.; Wang, P.G. Characterization and synthetic application of a novel  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase from *Escherichia coli* O55:H7. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4910–4915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. McArthur, J.B.; Yu, H.; Chen, X. A Bacterial  $\beta$ 1-3-Galactosyltransferase Enables Multigram-Scale Synthesis of Human Milk Lacto-N-tetraose (LNT) and its Fucosides. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 10721–10726. [[CrossRef](#)]
16. Chen, X.; Jin, L.; Jiang, X.; Guo, L.; Gu, G.; Xu, L.; Lu, L.; Wang, F.; Xiao, M. Converting a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase into two trans- $\beta$ -N-acetylhexosaminidases by domain-targeted mutagenesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 661–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Murata, T.; Inukai, T.; Suzuki, M.; Yamagishi, M.; Usui, T. Facile enzymatic conversion of lactose into lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose. *Glycoconj. J.* **1999**, *16*, 189–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Miyazaki, T.; Sato, T.; Furukawa, K.; Ajisaka, K. Enzymatic synthesis of Lacto-N-difucohexaose i which binds to *Helicobacter pylori*. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2010; Volume 480, pp. 511–524. [[CrossRef](#)]
19. Wada, J.; Ando, T.; Kiyohara, M.; Ashida, H.; Kitaoka, M.; Yamaguchi, M.; Kumagai, H.; Katayama, T.; Yamamoto, K. *Bifidobacterium bifidum* lacto-N-biosidase, a critical enzyme for the degradation of human milk oligosaccharides with a type 1 structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 3996–4004. [[CrossRef](#)]
20. Schmölder, K.; Weingarten, M.; Baldenius, K.; Nidetzky, B. Lacto-N-tetraose synthesis by wild-type and glycosynthase variants of the  $\beta$ -N-hexosaminidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 5661–5665. [[CrossRef](#)]

21. Ito, T.; Katayama, T.; Hattie, M.; Sakurama, H.; Wada, J.; Suzuki, R.; Ashida, H.; Wakagi, T.; Yamamoto, K.; Stubbs, K.A.; et al. Crystal structures of a glycoside hydrolase family 20 lacto-N-biosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 11795–11806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Val-Cid, C.; Biarnés, X.; Faijes, M.; Planas, A. Structural-functional analysis reveals a specific domain organization in family GH20 hexosaminidases. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128075. [[CrossRef](#)]
23. Lombard, V.; Golaconda-Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P.M.; Henrissat, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 490–495. [[CrossRef](#)]
24. Tews, I.; Terwisscha Van Scheltinga, A.C.; Perrakis, A.; Wilson, K.S.; Dijkstra, B.W. Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7954–7959. [[CrossRef](#)]
25. Mark, B.L.; Vocadlo, D.J.; Knapp, S.; Triggs-Raine, B.L.; Withers, S.G.; James, M.N.G. Crystallographic Evidence for Substrate-assisted Catalysis in a Bacterial  $\beta$ -Hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10330–10337. [[CrossRef](#)]
26. Vocadlo, D.J.; Withers, S.G. Detailed comparative analysis of the catalytic mechanisms of  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases from families 3 and 20 of glycoside hydrolases. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12809–12818. [[CrossRef](#)]
27. Bissaro, B.; Monsan, P.; Fauré, R.; O'Donohue, M.J. Glycosynthesis in a waterworld: New insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases. *Biochem. J.* **2015**, *467*, 17–35. [[CrossRef](#)]
28. Teze, D.; Jiao, Z.; Wiemann, M.; Gulshan Kazi, Z.; Lupo, R.; Rønne, M.E.; Carlström, G.; Duus, J.Ø.; Sanejouand, Y.-H.; O'Donohue, M.J.; et al. Rational Enzyme Design Without Structural Knowledge: A Sequence-Based Approach for Efficient Generation of Glycosylation Catalysts. *ChemRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
29. Kapešová, J.; Petrásková, L.; Kulik, N.; Straková, Z.; Bojarová, P.; Markošová, K.; Rebroš, M.; Křen, V.; Slámová, K. Transglycosidase activity of glycosynthase-type mutants of a fungal GH20  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *161*, 1206–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Schmölzer, K.; Weingarten, M.; Baldenius, K.; Nidetzky, B. Glycosynthase Principle Transformed into Biocatalytic Process Technology: Lacto-N-triose II Production with Engineered exo-Hexosaminidase. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 5503–5514. [[CrossRef](#)]
31. Ruzic, L.; Bolivar, J.M.; Nidetzky, B. Glycosynthase reaction meets the flow: Continuous synthesis of lacto-N-triose II by engineered  $\beta$ -hexosaminidase immobilized on solid support. *Biotechnol. Bioeng.* **2020**, *117*, 1597–1602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Muschiol, J.; Vuillemin, M.; Meyer, A.S.; Zeuner, B.  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidases for Carbohydrate Synthesis via Trans-Glycosylation. *Catalysts* **2020**, *20*, 365. [[CrossRef](#)]
33. Slámová, K.; Krejzová, J.; Marhol, P.; Kalachova, L.; Kulik, N.; Pelantová, H.; Cvačka, J.; Křen, V. Synthesis of derivatized chitooligomers using transglycosidases engineered from the fungal GH20  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1941–1950. [[CrossRef](#)]
34. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *41*, 207–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





