

Enginyeria de quitinases de la família GH18 per a l'obtenció de polímers de quitosà amb seqüències definides

Engineering GH18 chitinases for the production of sequence-defined chitosan polymers

Cristina Alsina, Almudena Aranda-Martínez, Enea Sancho-Vaello, Xevi Biarnés, Magda Fajjes, Antoni Planas
Universitat Ramon Llull. Institut Químic de Sarrià (IQS). Laboratori de Bioquímica

Resum: Les quitinases són glicosilhidrolases (GH) que catalitzen la hidròlisi d'enllaços glicosídics $\beta(1\rightarrow4)$ de polímers de quitina i quitosà. Les quitinases de la família GH18 presenten activitat de transglicosidació i poden catalitzar la formació de nous enllaços glicosídics entre un sucre donador i un acceptor, i obtenir així quitooligòmers (COS), que tenen diferents aplicacions biotecnològiques. Amb l'objectiu d'obtenir COS amb estructures definides, s'està utilitzant les quitinases com a eina sintètica. En el present treball s'ha introduït l'estratègia *glicosintasa* sobre quitinases GH18. Mitjançant l'enginyeria del centre actiu de les quitinases es pretén eliminar/disminuir l'activitat hidrolítica natural i incrementar l'activitat de síntesi.

Paraules clau: Quitooligosacàrid, enginyeria de proteïnes, quitinasa, glicosintasa, hidròlisi, transglicosidació.

Abstract: Chitinases are glycoside hydrolases (GH) that catalyse the hydrolysis of $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic bonds of chitin and chitosan polymers. Some chitinases also have transglycosylase activity, allowing them to introduce new glycosidic bonds between donor and acceptor sugar molecules with the consequent generation of chitin-oligosaccharides (COS), which may be useful for a range of biological applications. Chitinases are used as a synthetic tool to obtain well-defined COS. We propose here the application of glycosynthase technology on GH18 chitinases. Protein engineering is used to increase the transglycosylation activity while concomitantly decreasing the hydrolysis activity.

Keywords: Chito-oligosaccharide, protein engineering, chitinase, glycosynthase, hydrolysis, transglycosylation.

Introducció

La quitina, polisacàrid lineal format per monòmers d'*N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc) units per enllaços $\beta(1\rightarrow4)$, és considerada una de les fonts renovables més abundants de la Terra, i es troba en els exoesquelets d'artròpodes (insectes i crustacis), els endoesquelets de mol·luscs, en molts invertebrats i en la paret cel·lular de fongs i algunes algues diatomees [1]. La desacetilació parcial de la quitina produeix quitosans, copolímers lineals formats per residus de GlcNAc i glucosamina (GlcNH₂). Aquesta desacetilació parcial resulta en grups amino lliures que confereixen càrrega positiva als quitosans, que esdevenen, així, els únics polisacàrids policatiònics naturals.

Com a conseqüència de les seves propietats físicoquímiques i biològiques, els quitosans tenen un elevat interès per a un gran nombre d'aplicacions en àrees tan diverses com l'agricultura, el tractament d'aigües, la indústria alimentària, la medicina i la cosmètica, entre d'altres [2-7]. Entre les diferents funcions

biològiques dins la indústria medicofarmacèutica, destaquen les següents: activitats antiinflamatòries [8-10], immunoestimulants [11, 12], antimicrobianes [13-15], antitumorals [16, 17] i de prevenció de l'obesitat i control del colesterol [18, 19], vectors per a teràpia gènica (*gene delivery*) [20-22] i promoció de la cicatriçació i la regeneració de la pell [23-25]. Els quitosans també presenten aplicacions altament interessants en l'agricultura, com a tractament antimicrobià, antifúngic i antiviral [26-28] i com a promotors del creixement [29-31] i del sistema immunitari de les plantes [32, 33]. Aquestes propietats biològiques dels quitosans són altament dependents del nombre de residus (grau de polimerització, DP), de la proporció relativa de monòmers acetilats i desacetilats (grau d'acetilació, DA) i del patró d'acetilació (PA), és a dir, de la distribució dels monòmers GlcNAc i GlcNH₂ en la cadena oligomèrica.

Avui en dia, la quitina s'obté a partir de les restes de gambes i crancs de la indústria pesquera mitjançant tractaments químics de desmineralització i desproteïnitació. El quitosà és llavors preparat a partir de des-*N*-acetilacions químiques de la quitina. Aquest procés de producció requereix l'ús d'una quantitat elevada d'àcids i bases, així com d'aigua, té un requisit energètic elevat i produeix una quantitat abundant de residus. Mitjançant aquest procés no s'aconsegueix un únic producte, sinó que s'obtenen mesclades heterogènies de quito-

sans, que difereixen en el DP, el DA i el PA, la qual cosa compromet la reproductibilitat entre lots. Un altre desavantatge per a la utilització d'aquests quitosans, principalment en cosmètica i biomedicina, és el seu origen animal. Amb l'objectiu de superar aquests desavantatges, s'ha proposat com a alternativa l'ús d'eines biotecnològiques per a la producció de quitosans a partir de precursors simples per via enzimàtica [34, 35] o per enginyeria metabòlica [36], amb l'objectiu d'obtenir oligòmers i polímers de quitosà amb estructures definides.

Per tal de desenvolupar estratègies biotecnològiques de biosíntesi de quitosans amb estructures definides quant a DP, DA i PA, el projecte europeu Nano3Bio està desenvolupant noves estratègies de producció de nous materials biomimètics formats per unitats de GlcNAc i GlcNH₂, tant *in vivo*, per enginyeria metabòlica, com *in vitro*, basades en processos biotecnològics innovadors que utilitzen tecnologies quimioenzimàtiques. Els principals enzims estudiats per al desenvolupament d'aquesta plataforma biotecnològica inclouen quitinasintases, quitina-desacetilases, quitinases i quitosanases.

El nostre grup de recerca realitza enginyeria de proteïnes amb la finalitat de generar biocatalitzadors per a la producció de quitosans amb PA definits. L'estratègia implica la desacetilació específica d'oligosacàrids de quitina (DP 2-5) per l'acció de desacetilases de quitina seleccionades i/o dissenyades per enginyeria de proteïnes, seguida de la polimerització enzimàtica per l'acció de glicosintases dissenyades per a generar nous polímers que tinguin un patró d'acetilació regular i ben definit, com a productes únics.

En el present article es presenta l'ús de quitinases com a eina de síntesi de quitooligosacàrids (COS) i es proposa i desenvolupa l'ús de la tecnologia *glicosintasa* sobre quitinases de la família GH18 de CAZy (*carbohydrate-active enzymes*), amb l'objectiu de desenvolupar nous mutants per a polimeritzar COS activats per a donar polímers de baix pes molecular amb estructures definides. Mitjançant l'enginyeria del centre actiu de quitinases, es pretén eliminar/disminuir l'activitat hidrolítica natural i incrementar l'activitat de síntesi.

Glicosilhidrolases

El conjunt d'enzims actius en carbohidrats, involucrats en la formació, la modificació i la hidròlisi d'oligosacàrids, polisacà-

rids i glicoconjugats, es classifiquen a la base de dades CAZy (www.cazy.org) [37] en funció de la similitud de seqüència i, consegüentment, de plegaments comuns en les seves estructures. Segons l'activitat del seu domini catalític, es classifiquen en: a) glicosilhidrolases o glicosidases (GH), encarregades d'hidrolitzar enllaços glicosídics; b) glicosiltransferases (GT), que catalitzen la formació d'enllaços glicosídics; c) polisacàrid-liases (PL), responsables de l'escissió no hidrolítica d'enllaços glicosídics; d) esterases de carbohidrats (CE), que hidrolitzen els èsters de carbohidrats, i e) enzims d'activitats auxiliars (AA), enzims redox que actuen conjuntament amb altres enzims actius en carbohidrats.

Algunes glicosidases, a més d'hidrolitzar enllaços glicosídics, també són capaces de catalitzar la formació d'aquests invertint la reacció d'hidròlisi o mitjançant reaccions de transglicosidació. Els enzims d'aquesta família es divideixen alhora en dues classes segons el mecanisme d'acció: enzims amb inversió de la configuració anomèrica i enzims amb retenció de la configuració. Ambdues classes actuen mitjançant un mecanisme catalític d'àcid-base general, i presenten dos residus catalítics essencials, generalment aspartats o glutamats [38].

Les glicosidases que actuen amb inversió de la configuració ho fan mitjançant un mecanisme de desplaçament únic a través d'un estat de transició de tipus oxocarbocatíonic. El residu que actua com a base general incrementa la nucleofília d'una molècula d'aigua, la qual ataca el carboni anomèric al mateix temps que el residu àcid general assisteix el trencament de l'enllaç O-glicosídic cedint un protó a l'oxigen glicosídic a escindir (figura 1A). En canvi, les glicosidases que actuen mitjançant retenció de la configuració segueixen una reacció de doble desplaçament en què es produeix la formació i la hidròlisi d'un intermedi enzim-substrat (intermedi covalent glicosil-enzim). En la primera etapa, anomenada *glicosilació*, el grup àcid/base cedeix un protó a l'oxigen glicosídic, mentre que el residu nucleòfil ataca el carboni anomèric per a formar l'intermedi covalent. En la segona etapa, la *desglicosilació*, el residu catalític prèviament desprotonat actua com a base recuperant un protó d'una molècula d'aigua, la qual ataca el carboni anomèric i genera el producte d'hidròlisi amb la mateixa configuració anomèrica que el glicòsid de partida (figura 1B). Existeix una variant del mecanisme amb retenció de la configuració, present en glicosidases que catalitzen la hidròlisi de l'enllaç glicosídic de sucres que contenen un grup acetamido (hexosaminidases). Aquestes glicosidases no presenten

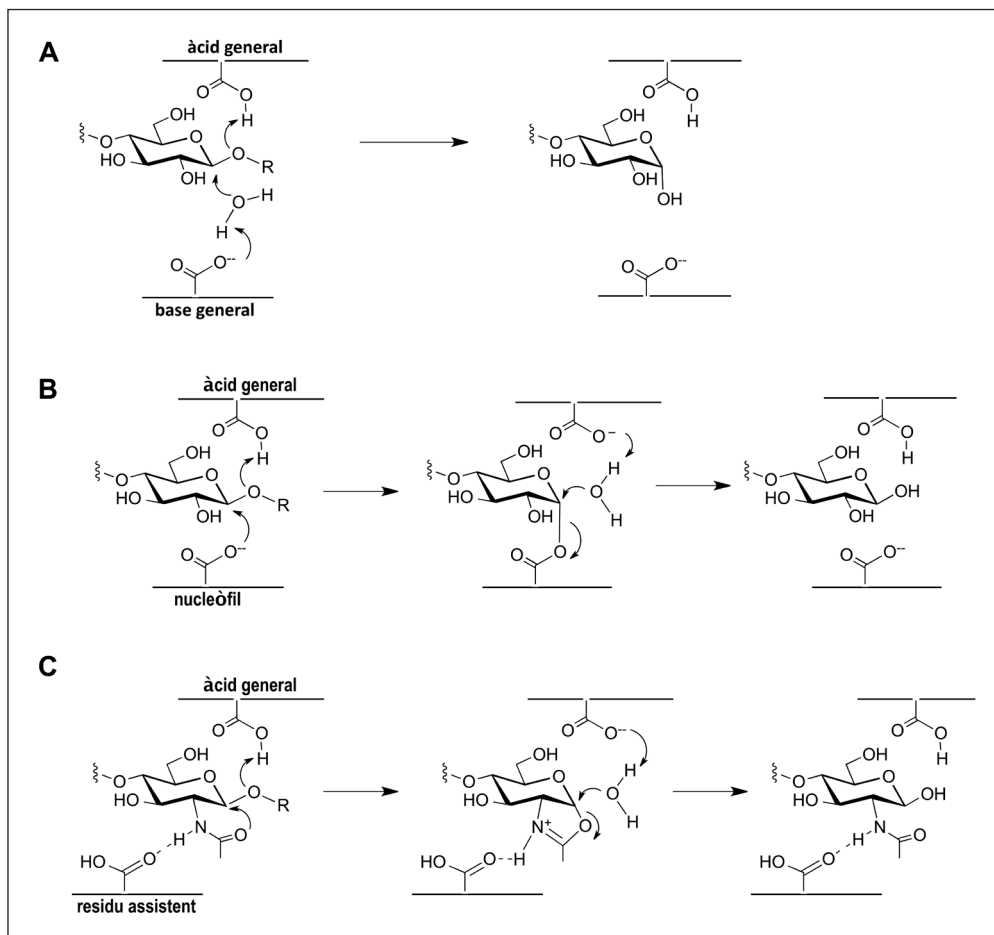


FIGURA 1. Mecanismes catalítics de les glicosidases, A) amb inversió de la configuració, B) amb retenció de la configuració i C) amb retenció de la configuració mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat. Adaptat de Planas *et al.* [68].

nucleòfil i actuen mitjançant una catàlisi assistida per substrat, en què el grup *N*-acetil del substrat actua com a nucleòfil intern i dona lloc a la formació d'un intermedi, l'oxazolina, que en el segon pas de la reacció és atacat per una molècula d'aigua, assistida per la base conjugada del residu àcid general, i dona lloc al producte amb retenció de la configuració anomèrica (figura 1C). Aquests enzims presenten un residu auxiliar que forma un pont d'hidrogen amb el NH- del grup acetamido i assisteix la formació de l'intermedi oxazolina [39].

Per altra banda, en funció de la localització de l'enllaç glicosídic hidrolitzat dins la cadena oligomèrica, les glicosidases s'agrupen en enzims *exo-*, que alliberen un monosacàrid o disacàrid d'un dels extrems de la cadena, principalment l'extrem no-reductor, o *endo-*, que actuen en els enllaços interns de la cadena.

Quitinases de la família GH18

Les quitinases són enzims de la família de les glicosilhidrolases que catalitzen la hidròlisi dels enllaços $\beta(1\rightarrow4)$ presents en homopolímers de quitina. En funció de la similitud de seqüència, les quitinases es classifiquen en dues subfamílies, 18 i 19, que difereixen en estructura i mecanisme d'acció. La majoria de quitinases presents en la major part d'organismes vius pertanyen a la família GH18. El domini catalític d'aquesta família presenta un plegament $(\beta/\alpha)_8$ (*TIM barrel*) [40-44] i es caracteritza per la presència de diferents motius de seqüència conservats [45]. El motiu més destacat és el motiu DXDXE, que conté el glutamat que actua d'àcid general. El centre actiu està envoltat de residus aromàtics que contribueixen a la unió del substrat [43, 46]. Les quitinases de la família GH18 actuen mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat. Basant-se en estudis sobre l'endoquitinasa *hevamina*,

Tews *et al.* [39] van proposar aquest mecanisme catalític, en què es forma l'intermedi oxazolina per atac nucleofílic de l'àtom d'oxigen del grup *N*-acetil sobre el carboni anomèric. Altres estudis sobre aquesta endoquitinasa [47] i sobre la quitinasa B de *Serratia marcescens* [48], juntament amb simulacions computacionals [49], donen suport a aquest mecanisme catalític. Tot i que la similitud de seqüència entre les quitinases de la família 18 no és particularment elevada (un 21 % d'identitat), els seus centres actius contenen diversos residus conservats, amb funcions catalítiques conegudes [47, 50–52]. D'entre aquests residus destaca el segon aspartat localitzat en el motiu DXDXE, que actua de residu auxiliar en la catàlisi i assisteix la formació de l'intermedi oxazolina [48, 50].

Diverses quitinases de la família GH18, a més d'hidrolitzar els enllaços glicosídics, presenten activitat de transglicosidació (TG), és a dir, són capaces d'establir nous enllaços glicosídics entre un sucre donador i un sucre acceptor [53–57]. En aquest article es presenta l'ús d'aquestes quitinases de la família GH18 com a eina de síntesi de quitooligosacàrids.

Activitat de transglicosidació de les quitinases de la família GH18

El potencial de les glicosidases amb retenció de la configuració com a eina per a la síntesi regio- i estereoespecífica de glicòsids s'està explotant des dels anys vuitanta. Les dues estratègies clàssiques més destacades en la síntesi enzimàtica d'enllaços glicosídics es basen a invertir la reacció d'hidròlisi desplaçant l'equilibri cap a la formació de l'enllaç (control termodinàmic) o utilitzant donadors glicosídics activats (control cinètic). L'estratègia de control termodinàmic es basa en el desplaçament de l'equilibri de reacció mitjançant l'alteració de les condicions d'aquesta, per exemple, utilitzant concentracions elevades de substrat, augmentant la temperatura o afegint solvents orgànics. Per altra banda, l'estratègia de control cinètic més comuna es basa a accelerar la formació de l'intermedi de reacció i afavorir que un sucre acceptor ataquí ràpidament aquest intermedi, abans que una molècula d'aigua. Per a aquesta estratègia s'utilitzen donadors glicosídics activats, amb l'objectiu d'augmentar la concentració de l'intermedi enzim-substrat un cop finalitzada la primera reacció del mecanisme catalític.

En el cas de les glicosidases amb retenció de la configuració que actuen mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat, com és el cas de les quitinases de la família GH18, el donador glicosídic per a la transglicosidació és un oligosacàrid (GlcNAc-R) o bé un oligosacàrid activat (GlcN-oxazolina) (figura 2). L'eficiència de transglicosidació és dependent de com l'enzim pot acomodar el sucre acceptor per competir contra una molècula d'aigua. S'han desenvolupat diferents estratègies per afavorir la transglicosidació respecte de la hidròlisi, amb un èxit variable en funció de l'enzim i del donador/acceptor utilitzats.

Com a conseqüència de les potencials aplicacions de la quitina i el quitosà en els sectors de l'agricultura i la medicina, ha sorgit un gran interès per l'obtenció de quitooligosacàrids amb estructures definides. Per aquest motiu, la utilització de quitinases de la família GH18 per a aquesta síntesi està essent àmpliament estudiada.

Kobayashi *et al.* reporten el primer exemple de glicosidació enzimàtica utilitzant un derivat oxazolina com a donador glicosídic [58, 59]. Per reacció del derivat oxazolina de GlcNAc com a donador i GlcNAc com a acceptor, catalitzada per una endoquitinasa de *Bacillus sp.*, obtenen quitobiosa (GlcNAc β 1,4GlcNAc). També s'ha utilitzat l'oxazolina de la quitobiosa com a donador per a obtenir polímers de quitina artificial [60, 61]. En tots aquests experiments s'utilitza un anàleg de l'estat de transició (oxazolina) com a substrat, de manera que disminueix l'energia d'activació i es permet que l'etapa de glicosidació es produeixi a un pH en què es minimitza la hidròlisi, la qual cosa desplaça la reacció cap a la síntesi de polímers. Més recentment, també s'ha utilitzat l'oxazolina del disacàrid GlcN β (1 \rightarrow 4)GlcNAc per a l'obtenció de polisacàrids de quitosà amb una estructura formada per unitats de GlcNAc i GlcNH₂ alternants. S'han utilitzat les quitinases de *Bacillus sp.* i *Serratia marcescens* per a la poliaddició del derivat oxazolina i s'han obtingut polímers de fins a 8–10 (un 70 % de rendiment) i 10–12 monòmers (un 75 % de rendiment), respectivament [62].

Recentment, dins el projecte europeu Nano3Bio, s'ha demostrat l'elevada activitat de transglicosidació de la quitinasa D del bacteri gramnegatiu *Serratia proteamaculans* (*SpChiD*). *SpChiD* és una quitinasa de la família GH18 que presenta activitat de TG utilitzant oligòmers de quitina (DP 3–6) com a substrat i dona lloc a oligòmers amb un DP de fins a 13 quan

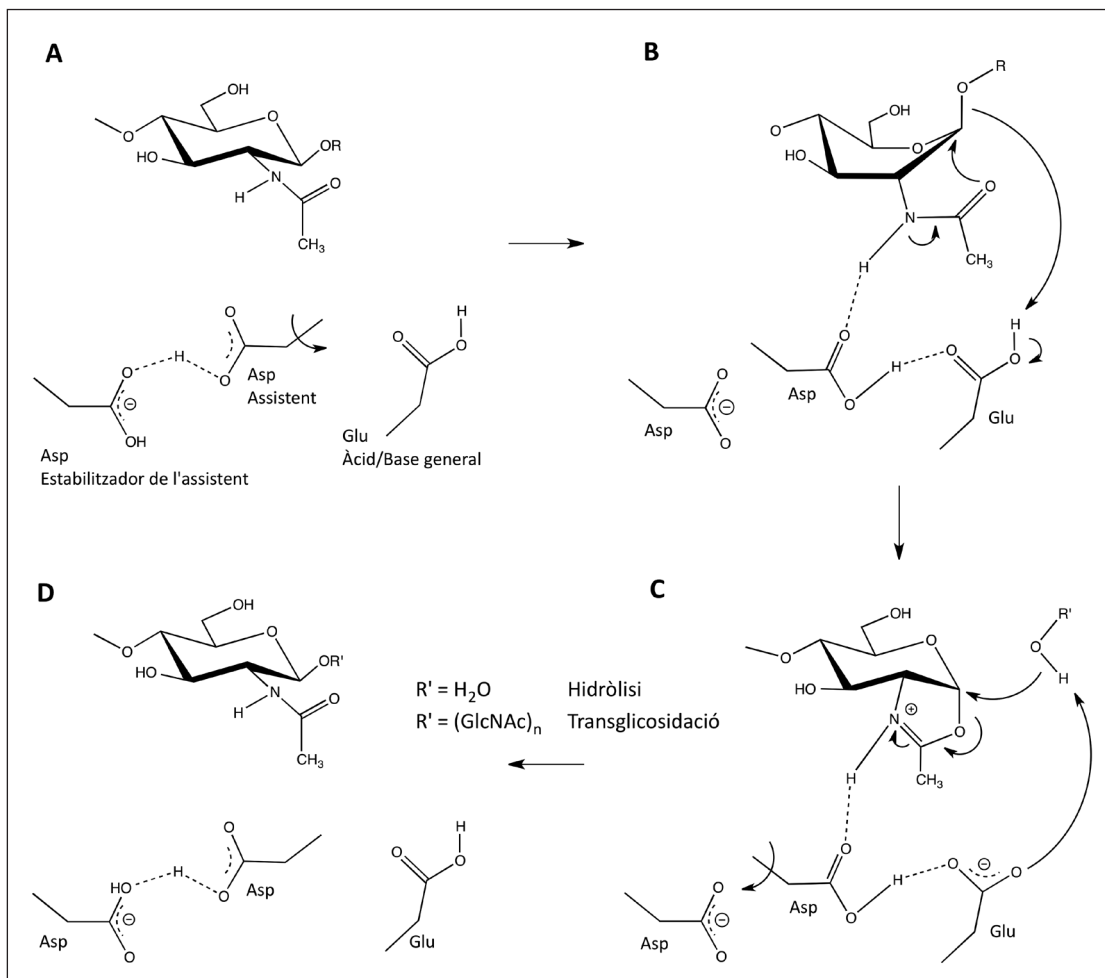


FIGURA 2. Mecanisme catalític assistit per substrat present en les quitinases de la família GH18. Els dos residus Asp del domini DXDXE interaccionen mitjançant un enllaç d'hidrogen quan l'enzim està lliure (A). Quan s'uneix el substrat, hi ha un moviment del residu Asp auxiliar per formar un pont d'hidrogen amb el residu àcid general (Glu), el qual protona l'oxigen glicosídic (B). Consegüentment, es produeix l'atac nucleofílic del grup acetamido de la unitat GlcNAc situada en el subseti -1, la qual cosa dona lloc a la formació de l'intermedi oxazolina (C). El residu assistent Asp estabilitza l'intermedi oxazolona/oxazoloni. En la segona etapa, el residu Glu actua de base general (D). En funció de l'acceptor (R'OH), es produirà hidròlisi o transglicosidació.

s'utilitza l'hexàmer com a substrat [53]. L'eficiència de TG, considerant el nombre i la concentració dels productes de TG, depèn majoritàriament de la relació entre la concentració d'enzim i la de substrat. La formació dels productes de TG és inversament proporcional a la concentració d'enzim i directament proporcional a la concentració de substrat [53]. Tot i que *SpChiD* és una quitinasa amb una important activitat de TG en comparació amb altres quitinases de la família GH18, els rendiments obtinguts no són gaire elevats com a conseqüència de l'activitat hidrolítica predominant de l'enzim salvatge. Amb l'objectiu d'augmentar l'activitat de TG de quitinases bacterianes de la família GH18 s'està duent a terme enginyeria de proteïnes seguint un disseny racional, mutant els residus conservats i/o els residus aromàtics que poden te-

nir un paper important en la catàlisi [54, 63]. S'han substituït diferents residus del centre catalític de la *SpChiD*, propers a la tríada catalítica DXDXE, i residus de regions més externes, i s'ha aconseguit augmentar l'activitat de TG (figura 3).

Els mutants M226A, Y228A i R284A mostren un increment de l'activitat de TG, tot i l'augment de l'activitat hidrolítica. En canvi, els mutants W120A, F64W, G119S, S116G, F125A, W247A i Y28A mostren una disminució de l'activitat hidrolítica i, alhora, un increment de l'activitat de TG (taula 1). S'ha aconseguit doblar la concentració de DP5 i DP6 provinents de TG respecte de l'enzim salvatge [63, 64]. Així mateix, amb la hipòtesi d'augmentar l'activitat de TG incrementant el temps de retenció del substrat en el centre catalític, s'han substituït

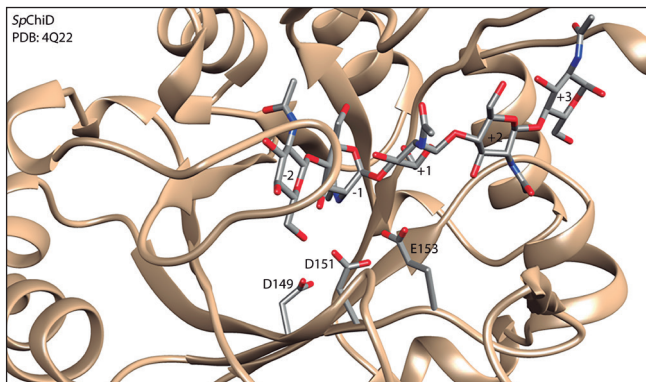


FIGURA 3. Centre actiu de la quitinasa *SpChiD* (PDB: 4Q22). Model del complex amb DP5 per *docking*.

diferents residus ubicats en els punts d'entrada i sortida del centre actiu. La substitució del residu G201, situat a la sortida del centre actiu (subseti +2), per un Trp resulta en l'augment de l'activitat de TG, a causa d'un increment d'afinitat pel substrat i/o per la introducció d'un impediment hidrofòbic a la sortida que dificulta el trànsit de molècules d'aigua, la qual cosa desfavoreix la hidròlisi i, alhora, incrementa el temps de retenció de l'intermedi oxazolina o del substrat en el centre actiu [65]. S'ha demostrat la importància dels residus aromàtics presents en el centre actiu per a l'activitat de TG, com a conseqüència de la hidrofobicitat que aquests aporten, que disminueix l'accés de molècules d'aigua al centre actiu [64, 65].

Diverses substitucions de residus en el centre catalític incrementen substancialment l'activitat de TG. Tot i així, l'activitat d'hidròlisi predominant en aquest tipus d'enzims resulta en la degradació dels productes de transglicosidació. Amb l'objectiu de vèncer aquestes limitacions en la síntesi d'oligosacàrids i glicoconjugats, es va introduir el concepte *glicosintasa*.

Estratègia *glicosintasa*

Les glicosintases són glicosilhidrolases amb retenció de la configuració en què s'ha substituït el residu que actua de nucleòfil per un residu no nucleofílic, la qual cosa dona lloc a un enzim hidrolíticament inactiu. L'estratègia *glicosintasa* va ser introduïda l'any 1998 tant en una exoglicosidasa, pel grup de Withers [66], com en una endoglicosidasa, pel nostre grup [67]. Aquests enzims, a causa de l'absència de nucleòfil, no poden formar l'intermedi glicosil-enzim, però són capaços de catalitzar la reacció de transglicosidació a partir d'un donador

TAULA 1. Taula resum dels mutants de *SpChiD* caracteritzats per Podile *et al.* [63–65].

Mutant	Activitat específica relativa (%)	Activitat de TG		
		Activitat relativa (%)	Concentració de DP5 (%)	Concentració de DP6 (%)
<i>SpChiD wt</i>	100	10,0 ^a	6,0	4,0
E159D	49,8	–	–	–
Y160A	151,3	7,5 ^a	5,0	2,5
M226A	204,9	17,0 ^b	12,0	5,0
Y228A	168,9	19,0 ^b	13,6	5,4
R284A	190,5	15,0 ^a	6,0	9,0
F64W	160,7	17,5 ^a	12,9	4,6
S116G	74,9	18,0 ^b	11,7	6,3
F125A	71,8	17,5 ^b	10,4	7,8
W247A	75,8	16,0 ^b	8,8	7,2
G119S	72,8	17,0 ^b	8,6	8,4
G119W	11,2	–	–	–
W120A	830,6	–	–	–
G201W	113,6	16,3 ^b	9,9	6,4
W160A	> <i>wt</i>	–	–	–
W290A	> <i>wt</i>	10,6 ^a	4,3	6,3
W395A	≈ <i>wt</i>	16,7 ^d	12,4	4,3
Y28A	< <i>wt</i>	16,1 ^c	9,3	6,8

Condicions de reacció: 2 mM de DP4, 250 nM d'enzim, 20 mM d'acetat de sodi, pH 5,6, 40 °C. La quantificació dels productes de TG (DP5 i DP6) es determina al cap de 30 minuts, 6 hores, 8 hores^c o 12 hores^d de reacció.

glicosídic activat amb configuració anomèrica oposada a la del substrat de la reacció d'hidròlisi, que mimetza l'intermedi de reacció (figura 4A). A causa de la mutació del nucleòfil carboxilat per un residu més petit, la cavitat creada en el centre actiu permet la unió del donador activat. La transferència del glicòsid a un sucre acceptor és afavorida respecte de la hidròlisi, i el producte de TG no pot ser hidrolitzat per l'enzim com a conseqüència de la manca del nucleòfil catalític, la qual cosa incrementa el rendiment de transglicosidació [68]. S'han desenvolupat diverses glicosintases de diferents famílies de glicosidases [69–71].

Les quitinases de la família GH18 actuen mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat, i per tant no tenen residu nucleòfil. L'estratègia utilitzada per a aplicar aquesta tecnologia *glicosintasa* a aquests enzims és diferent, ja que se

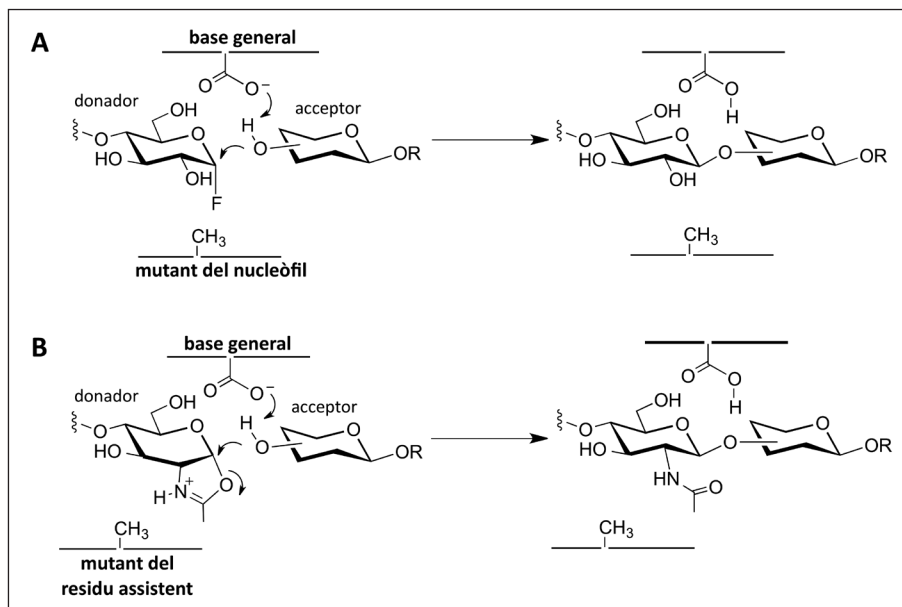


FIGURA 4. Enzims glicosintasa. A) Mutant del residu nucleòfil d'una glicosidasa amb retenció de la configuració, amb un fluorur de glicosil com a donador. B) Mutant del residu assistent d'una glicosidasa amb retenció de la configuració que actua mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat, amb un derivat oxazolina com a donador.

substitueix el residu assistent del centre actiu, que té un paper important en la formació de l'intermedi de reacció (figura 4B). El primer exemple d'intent de generació d'una glicosintasa sobre una glicosidasa amb mecanisme catalític assistit per substrat va ser amb l'enzim endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa (endo-M), que pertany a la família GH85. L'enzim resultant de la mutació del residu assistent era capaç de dur a terme la reacció de TG a partir d'un donador oxazolina, i el glicopèptid resultant no era hidrolitzat [72]. Aquesta metodologia s'ha estès a altres enzims de les famílies GH85 i GH18.

En les quitinases GH18, el residu auxiliar que assisteix la formació de l'intermedi de reacció és el segon Asp del motiu DX-DXE, altament conservat en aquesta família. Fins al moment, la tecnologia *glicosintasa* en quitinases GH18 només ha estat aplicada a les quitinases A1 de *Bacillus circulans* (*BcChiA*) i a la quitinasa 42 de *Trichoderma harzanium* (*ThChit42*). S'han obtingut quitooligòmers amb un DP d'entre 3 i 13 amb el mutant D202A (corresponent al residu assistent) de *BcChiA*, utilitzant el derivat oxazolina de quitobiosa. El rendiment màxim de TG s'obté al cap de 24–30 hores de reacció, tot i que al cap de cinc dies d'incubació encara es detecten productes de transglicosidació. La barreja de productes de TG indica que no només hi ha una autocondensació del donador, sinó que també hi ha reaccions de desproporció. S'han realitzat també experiments de TG utilitzant l'oxazolina de β -*D*-galactopirano-

sil-(1,4)-quitobiosa com a donador i quitobiosa o quitopentaosa com a acceptor, i en els dos casos també s'ha obtingut una barreja de productes de TG. En el cas de la quitinasa *ThChit42*, els dos mutants del residu assistent, D170A i D170N, donen lloc a una barreja de productes de TG amb un DP entre 4 i 10 [73]. El conjunt d'experiments demostra com la mutació del residu Asp assistent produeix enzims amb activitat de transglicosidació. Tot i així, aquesta estratègia no elimina la capacitat de l'enzim de realitzar la reacció de transglicosidació a partir de quitooligosacàrids naturals, no activats. Com a conseqüència, s'obté una barreja de productes en lloc de quitooligosacàrids amb un DP determinat provinents de l'autocondensació del donador oxazolina per l'activitat *glicosintasa*. Aquests resultats demostren la implicació d'altres residus, no només de l'Asp auxiliar, en la formació de l'intermedi de reacció i, per tant, la necessitat de substituir no només el residu auxiliar, sinó també altres residus de l'enzim, per tal de generar nous polímers definits com a productes únics.

Aplicació de l'estratègia *glicosintasa* en quitinases GH18

El nostre grup, en el marc del projecte Nano3Bio, està desenvolupant noves glicosintases per a l'obtenció de polímers de

quitosà definits pel que fa al DP, el DA i el PA. Amb l'objectiu de desenvolupar una glicosintasa efectiva a partir d'una quitinasa, primerament s'ha fet un cribratge de diferents candidats. S'han seleccionat diferents endoquitinases de la família GH18 amb activitat de transglicosidació reportada prèviament, amb la finalitat de dissenyar-les com a glicosintases. Per al disseny de la primera generació de glicosintases, en primer lloc s'ha substituït l'Asp assistent, localitzat en el motiu DXDXE, per una Ala. Per a la caracterització dels enzims, s'analitza tant l'activitat hidrolítica com l'activitat de TG de cadascun. Per a l'anàlisi de l'activitat hidrolítica, s'utilitzen dos tipus de substrats: COS marcats amb un fluoròfor i COS naturals. En el cas de l'activitat de TG, se segueix la reacció d'autocondensació del derivat oxazolina de quitopentaosa (DP5ox) com a donador. Si l'enzim té activitat de TG, es forma un precipitat com a conseqüència de l'elevada insolubilitat dels oligòmers de quitina, que s'analitza per espectrometria de masses MALDI-TOF-MS. Tots els mutants *glicosintasa* dissenyats mostren activitat de TG utilitzant DP5ox com a substrat i, de la mateixa manera que amb el mutant D202A de *BcChiA1* [73], s'obté una barreja de productes amb un DP entre 5 i 12. Un cop caracteritzats els mutants de la primera generació, se selecciona aquell mutant que presenta una menor activitat d'hidròlisi respecte de l'enzim salvatge i una elevada activitat de TG, i se segueix amb la posterior enginyeria

per a l'optimització de la glicosintasa. Per al disseny de nous mutants se substitueixen residus ubicats tant en el centre actiu com en l'entrada o sortida de la cavitat, amb l'objectiu principal d'eliminar l'activitat hidrolítica i, consegüentment, augmentar l'activitat de síntesi. S'ha creat una segona i una tercera generació de glicosintasa, corresponent a mutants dobles i triples, respectivament, amb els quals s'ha aconseguit disminuir l'activitat hidrolítica i s'ha incrementat el rendiment de TG fins al 60 % (p/p) en polímer (figura 5).

Amb aquests resultats, es pot concloure que la mutació puntual del residu assistent confereix activitat *glicosintasa* a l'enzim, però els mutants resultants mantenen certa activitat hidrolítica residual que dona lloc a la hidròlisi dels polímers formats. L'addició d'altres mutacions produeix variants amb una notable disminució de l'activitat hidrolítica i amb un increment de l'activitat *glicosintasa*, i fins ara s'han assolit rendiments del 60 % en la formació de polímers insolubles.

Aplicant aquestes condicions de reacció, actualment s'està estenent l'ús dels mutants *glicosintasa* més eficients a la polimerització de derivats oxazolina de COS parcialment desacetilats per a la formació de polímers de quitosà amb patrons d'acetilació definits segons el donador emprat.

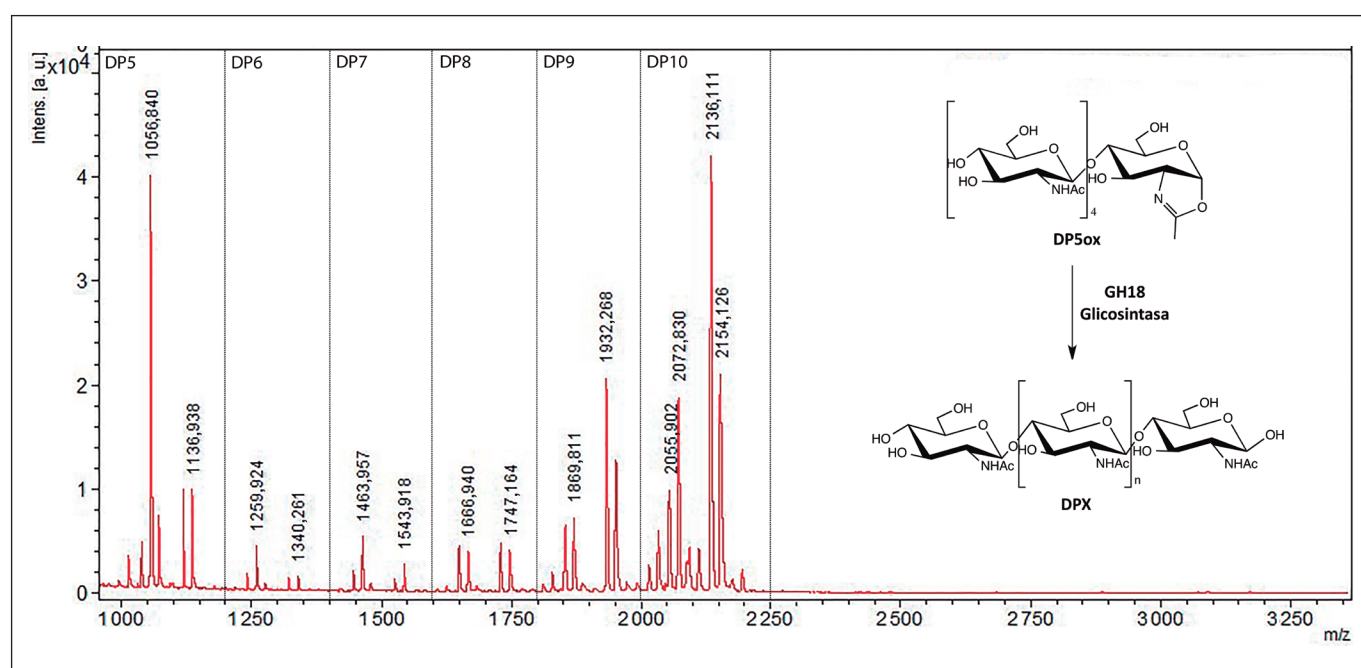


FIGURA 5. Espectre de masses dels productes resultants de la polimerització de DP5ox catalitzada per la glicosintasa generada. Anàlisi per MALDI-TOF-MS de la barreja de COS presents en la fracció insoluble de la reacció.

Conclusions

Amb l'objectiu de desenvolupar estratègies biotecnològiques per a l'obtenció de polímers de quitina i quitosà amb estructures definides, s'ha aplicat la tecnologia *glicosintasa* a quitinases de la família GH18 que actuen mitjançant una catàlisi assistida per substrat. La substitució del segon residu Asp del motiu DXDXE, corresponent al residu assistent, per una alani-na dona lloc a enzims amb activitat de transglicosidació. Tot i així, no s'elimina la capacitat de l'enzim de formar l'intermedi glicosil-enzim a partir de substrats naturals no activats, i com a conseqüència s'obté una barreja de productes provinents tant de la hidròlisi del producte format com de l'activitat mateixa de TG de l'enzim. Amb el disseny i la caracterització de noves mutacions, s'ha assolit un triple mutant amb activitat *glicosintasa* sense pràcticament activitat hidrolítica residual, amb el qual s'ha augmentat el rendiment de TG fins al 60 % en polímers. Aquesta nova glicosintasa és el punt de partida per a seguir desenvolupant el procés d'obtenció d'oligòmers i polímers de quitosà amb diferents patrons d'acetilació.

Agraïments

Treball finançat pel projecte europeu Nano3Bio del 7è PM de la UE (núm. de contracte 613931). Cristina Alsina agraeix el contracte predoctoral de Nano3Bio.

Referències

[1] KURITA, K. «Controlled functionalization of the polysaccharide chitin». *Prog. Polym. Sci.*, vol. 26 (2001), p. 1921-1971.

[2] AZUMA, K.; IFUKU, S.; OSAKI, T.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S. «Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers». *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10 (2014), p. 2891-2920.

[3] CROISIER, F.; JÉRÔME, C. «Chitosan-based biomaterials for tissue engineering». *Eur. Polym. J.*, vol. 49 (2013), p. 780-792.

[4] KUMAR, M. N. V. R. «A review of chitin and chitosan applications». *React. Funct. Polym.*, vol. 46 (2000), p. 1-27.

[5] PESTOV, A.; BRATSKAYA, S. «Chitosan and its derivatives as highly efficient polymer ligands». *Molecules*, vol. 21 (2016), p. 330.

[6] PHILIBERT, T.; LEE, B. H.; FABIEN, N. «Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopoly-

mers». *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 181 (2017), p. 1314-1337.

[7] RINAUDO, M. «Chitin and chitosan: properties and applications». *Prog. Polym. Sci.*, vol. 31 (2006), p. 603-632.

[8] YOON, H. J.; MOON, M. E.; PARK, H. S.; IM, S. Y.; KIM, Y. H. «Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells». *Biochem. Biophysical Res. Commun.*, vol. 358 (2007), p. 954-959.

[9] YOUSEF, M.; PICHYANGKURA, R.; SOODVILAI, S.; CHATSUDTHIPONG, V. «Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action». *Pharmacol. Res.*, vol. 66 (2012), p. 66-79.

[10] CHUNG, M. J.; PARK, J. K.; PARK, Y. I. «Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice». *Int. Immunopharmacol.*, vol. 12 (2012), p. 453-459.

[11] FENG, J.; ZHAO, L.; YU, Q. «Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 317 (2004), p. 414-420.

[12] ZHANG, P.; LIU, W.; PENG, Y.; HAN, B.; YANG, Y. «Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages». *Int. Immunopharmacol.*, vol. 23 (2014), p. 254-261.

[13] CHUNG, Y.; SU, Y.; CHEN, C.; JIA, G.; WANG, H.; WU, J. C. G.; LIN, J. «Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall». *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 25, núm. 7 (2004), p. 932-936.

[14] HOSSEINNEJAD, M.; JAFARI, S. M. «Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 85 (2016), p. 467-475.

[15] XIA, W.; LIU, P.; ZHANG, J.; CHEN, J. «Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides». *Food Hydrocoll.*, vol. 25 (2011), p. 170-179.

[16] SHEN, K. T.; CHEN, M. H.; CHAN, H.; JENG, J.; WANG, Y. «Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis». *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47 (2009), p. 1864-1871.

[17] PARK, J. K.; CHUNG, M. J.; CHOI, H. N.; PARK, Y. I. «Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity». *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12 (2011), p. 266-277.

[18] POKHIS, K.; BITTERLICH, N.; CORNELLI, U.; CASSANO, G. «Efficacy of polyglucosamine for weight loss – confirmed in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical investigation». *BMC Obes.*, vol. 2 (2015), p. 25.

- [19] TRIVEDI, V. R.; SATIA, M. C.; DESCHAMPS, A.; MAQUET, V.; SHAH, R. B.; ZINZUWADIA, P. H.; TRIVEDI, J. V. «Single-blind, placebo controlled randomised clinical study of chitosan for body weight reduction». *Nutr. J.*, vol. 15 (2016), p. 3.
- [20] AHMED, T. A.; ALJAEID, B. M. «Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery». *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 10 (2016), p. 483-507.
- [21] MACLAUGHLIN, F. C.; MUMPER, R. J.; WANG, J.; TAGLIAFERRI, J. M.; GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; ROLLAND, A. P. «Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery». *J. Control. Release*, vol. 56 (1998), p. 259-272.
- [22] MANSOURI, S.; LAVIGNE, P.; CORSI, K.; BENDERDOUR, M.; BEAUMONT, E.; FERNANDES, J. C. «Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57 (2004), p. 1-8.
- [23] UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. «Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs». *Biomaterials*, vol. 20 (1999), p. 1407-1414.
- [24] PATRULEA, V.; OSTAFE, V.; BORCHARD, G.; JORDAN, O. «Chitosan as a starting material for wound healing applications». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 97 (2015), p. 417-426.
- [25] UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. «Topical formulations and wound healing applications of chitosan». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 52 (2001), p. 105-115.
- [26] BEN-SHALOM, N.; ARDI, R.; PINTO, R.; AKI, C.; FALLIK, E. «Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan». *Crop Prot.*, vol. 22 (2003), p. 285-290.
- [27] KENDRA, D. F.; HADWIGER, L. A. «Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*». *Exp. Mycol.*, vol. 8 (1984), p. 276-281.
- [28] KULIKOV, S. N.; CHIRKOV, S. N.; IL'INA, A. V.; LOPATIN, S. A.; VARLAMOV, V. P. «Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants». *Prikl. Biokhimiya i Mikrobiol.*, vol. 42, núm. 2 (2006), p. 224-228.
- [29] CHAMNANMANOONTHAM, N.; PONGPRAYOON, W.; PICHAYANGKURA, R.; ROYTRAKUL, S.; CHADCHAWAN, S. «Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast». *Plant Growth Regul.*, vol. 75 (2015), p. 101-114.
- [30] MONDAL, M. M. A.; MALEK, M. A.; PUTEH, A. B.; ISMAIL, M. R.; ASHRAFUZZAMAN, M.; NAHER, L. «Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra». *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 6, núm. 5 (2012), p. 918-921.
- [31] NGE, K. L.; NWE, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W. F. «Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture». *Plant Sci.*, vol. 170 (2006), p. 1185-1190.
- [32] HADWIGER, L. A. «Plant science review: multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype». *Plant Sci.*, vol. 208 (2013), p. 42-49.
- [33] KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A.; SINGH, B.; BHANU, A. N. «A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides». *Adv. Plants Agric. Res.*, vol. 1, núm. 1 (2014), p. 23-30.
- [34] JEON, Y. J.; PARK, P. J.; KIM, S. K. «Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor». *Carbohydr. Polym.*, vol. 44 (2001), p. 71-76.
- [35] PANTALEONE, D.; YALPANI, M.; SCOLLAR, M. «Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis». *Carbohydr. Res.*, vol. 237 (1992), p. 325-332.
- [36] NAQVI, S.; MOERSCHBACHER, B. M. «The cell factory approach toward biotechnological production of high-value chitosan oligomers and their derivatives: an update». *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37 (2017), p. 11-25.
- [37] CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. «The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics». *Nucleic Acids Res.*, vol. 37 (2009), p. 233-238.
- [38] MCCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. «Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis». *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 4 (1994), p. 885-892.
- [39] TEWS, I.; TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C. T.; PERRAKIS, A.; WILSON, K. S.; DIJKSTRA, B. W. «Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119 (1997), p. 7954-7959.
- [40] PERRAKIS, A.; TEWS, I.; DAUTER, Z.; OPPENHEIM, A. B.; CHET, I.; WILSON, K. S.; VORGIASL, C. E. «Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution». *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 2, núm. 12 (1994), p. 1169-1180.
- [41] TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C.; KALK, K. H.; BEINTEMA, J. J.; DIJKSTRA, B. W. «Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor». *Curr. Biol.*, vol. 2, núm. 12 (1994), p. 1181-1189.
- [42] HOLLIS, T.; MONZINGO, A. F.; BORTONE, K.; ERNST, S.; COX, R.; ROBERTUS, J. D. «The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*». *Protein Sci.*, vol. 9 (2000), p. 544-551.

- [43] AALTEN, D. M. F. van; SYNSTAD, B.; BRURBERG, M. B.; HOUGH, E.; RIISE, B. W.; EIJSINK, V. G. H.; WIERENGA, R. K. «Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution». *PNAS*, vol. 97, núm. 11 (2000), p. 5842-5847.
- [44] FUSETTI, F.; VON MOELLER, H.; HOUSTON, D.; ROZEBOOM, H. J.; DIJKSTRA, B. W.; BOOT, R. G.; AERTS, J. M. F. G.; AALTEN, D. M. F. van. «Structure of human chitotriosidase: implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins». *J. Biol. Chem.*, vol. 277, núm. 28 (2002), p. 25537-25544.
- [45] TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C.; HENNIG, M.; DIJKSTRA, B. W. «The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18». *J. Mol. Biol.*, vol. 262 (1996), p. 243-257.
- [46] UCHIYAMA, T.; KATOOUNO, F.; NIKAIKIDOU, N.; NONAKA, T.; SUGIYAMA, J.; WATANABE, T. «Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170». *J. Biol. Chem.*, vol. 276, núm. 44 (2001), p. 41343-41349.
- [47] BOKMA, E.; ROZEBOOM, H. J.; SIBBALD, M.; DIJKSTRA, B. W.; BEINTEMA, J. J. «Expression and characterization of active site mutants of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*». *Eur. J. Biochem.*, vol. 269 (2002), p. 893-901.
- [48] AALTEN, D. M. F. van; KOMANDER, D.; SYNSTAD, B.; GÅSEIDNES, S.; PETER, M. G.; EIJSINK, V. G. H. «Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase». *PNAS*, vol. 98, núm. 16 (2001), p. 8979-8984.
- [49] BRAMELD, K. A.; GODDARD, W. A. I. «Substrate distortion to a boat conformation at subsite -1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120 (1998), p. 3571-3580.
- [50] SYNSTAD, B.; GASEIDNES, S.; AALTEN, D. M. F. van; VRIEND, G.; NIELSEN, J. E.; EIJSINK, V. G. H. «Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase». *Eur. J. Biochem.*, vol. 271 (2004), p. 253-262.
- [51] WATANABE, T.; KOBORI, K.; MIYASHITA, K.; FUJII, T.; SAKAI, H.; UCHIDA, M.; TANAKA, H. «Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity». *J. Biol. Chem.*, vol. 268, núm. 25 (1993), p. 18567-18572.
- [52] WATANABE, T.; UCHIDA, M.; KOBORI, K.; TANAKA, H. «Site-directed mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 residues in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12». *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 58, núm. 12 (2014), p. 2283-2285.
- [53] PURUSHOTHAM, P.; PODILE, A. R. «Synthesis of long-chain chitooligosaccharides by a hypertransglycosylating processive endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568». *J. Bacteriol.*, vol. 194, núm. 16 (2012), p. 4260-4271.
- [54] ZAKARIASSEN, H.; HANSEN, M. C.; JØRANLI, M.; EIJSINK, V. G. H.; SØRLIE, M. «Mutational effects on transglycosylating activity of family 18 chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant». *Biochemistry*, vol. 50, núm. 25 (2011), p. 5693-5703.
- [55] SUGINTA, W.; VONGSUWAN, A.; SONGSIRIRITTHIGUL, C.; SVASTI, J.; PRINZ, H. «Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS». *FEBS J.*, vol. 272 (2005), p. 3376-3386.
- [56] SUMA, K.; PODILE, A. R. «Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities». *Bioresour. Technol.*, vol. 133 (2013), p. 213-220.
- [57] AGUILERA, B.; GHAAHARALI-VAN DER VLUGT, K.; HELMOND, M. T. J.; OUT, J. M. M.; DONKER-KOOPMAN, W. E.; GROENER, J. E. M.; BOOT, R. G.; RENKEMA, G. H.; MAREL, G. A. van der; BOOM, J. H. van [et al.] «Transglycosidase activity of chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase». *J. Biol. Chem.*, vol. 278, núm. 42 (2003), p. 40911-40916.
- [58] KOBAYASHI, S.; KIYOSADA, T.; SHODA, S. «A novel method for synthesis of chitobiose via enzymatic glycosylation using a sugar oxazoline as glycosyl donor». *Tetrahedron Lett.*, vol. 38, núm. 12 (1997), p. 2111-2112.
- [59] OCHIAI, H.; OHMAE, M.; KOBAYASHI, S. «Enzymatic glycosidation of sugar oxazolines having a carboxylate group catalyzed by chitinase». *Carbohydr. Res.*, vol. 339 (2004), p. 2769-2788.
- [60] KOBAYASHI, S.; KIYOSADA, T.; SHODA, S. «Synthesis of artificial chitin: irreversible catalytic behavior of a glycosyl hydrolase through a transition state analogue substrate». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118 (1996), p. 13113-13114.
- [61] KOBAYASHI, S. «Enzymatic polymerization: a new method of polymer synthesis». *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 37 (1999), p. 3041-3056.
- [62] MAKINO, A.; KUROSAKI, K.; OHMAE, M.; KOBAYASHI, S. «Chitinase-catalyzed synthesis of alternately N-deacetylated chitin: a chitin-chitosan hybrid polysaccharide». *Biomacromolecules*, vol. 7 (2006), p. 950-957.
- [63] MADHUPRAKASH, J.; TANNEERU, K.; PURUSHOTHAM, P.; GURUPRASAD, L.; PODILE, A. R. «Transglycosylation by chitinase D from *Serratia proteamaculans* improved through altered substrate interactions». *J. Biol. Chem.*, vol. 287 (2012), p. 44619-44627.
- [64] MADHUPRAKASH, J.; BOBBILI, K. B.; MOERSCHBACHER, B. M.; SINGH, T. P.; SWAMY, M. J.; PODILE, A. R. «Inverse relationship between

chitobiase and transglycosylation activities of chitinase-D from *Serratia proteamaculans* revealed by mutational and biophysical analyses». *Sci. Rep.*, vol. 5 (2015), p. 15657.

[65] MADHUPRAKASH, J.; TANNEERU, K.; KARLAPUDI, B.; GURUPRASAD, L.; PODILE, A. R. «Mutagenesis and molecular dynamics simulations revealed the chitoooligosaccharide entry and exit points for chitinase D from *Serratia proteamaculans*». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1840 (2014), p. 2685-2694.

[66] MACKENZIE, L. F.; WANG, Q.; WARREN, R. A. J.; WITHERS, S. G. «Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120 (1998), p. 5583-5584.

[67] MALET, C.; PLANAS, A. «From β -glucanase to β -glucansynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile». *FEBS Lett.*, vol. 440 (1998), p. 208-212.

[68] PLANAS, A.; FAJES, M.; CODERA, V. «When enzymes do it better: enzymatic glycosylation methods». A: CIPOLLA, L. (ed.). *Carbohydrates chemistry: state-of-the-art and challenges for drug development*. Londres: Imperial College Press, 2015, p. 215-245.

[69] FAJES, M.; PLANAS, A. «In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases». *Carbohydr. Res.*, vol. 342 (2007), p. 1581-1594.

[70] SHAIKH, F. A.; WITHERS, S. G. «Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis». *Biochem. Cell Biol.*, vol. 86 (2008), p. 169-177.

[71] ARMSTRONG, Z.; WITHERS, S. G. «Synthesis of glycans and glycopolymers through engineered enzymes». *Biopolymers*, vol. 99, núm. 10 (2013), p. 666-674.

[72] UMEKAWA, M.; HUANG, W.; LI, B.; FUJITA, K.; ASHIDA, H.; WANG, L.; YAMAMOTO, K. «Mutants of *Mucor hiemalis* endo- β -*N*-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities». *J. Biol. Chem.*, vol. 283 (2008), p. 4469-4479.

[73] MARTINEZ, E. A.; BOER, H.; KOIVULA, A.; SAMAIN, E.; DRIGUEZ, H.; ARMAND, S.; COTTAZ, S. «Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases». *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 74 (2012), p. 89-96.



C. Alsina



A. Aranda-Martinez



E. Sancho-Vaello



X. Biarnés



M. Fajjes



A. Planas

Cristina Alsina és llicenciada en biologia i en bioquímica per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) (2012) i té el Màster en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina de la UAB. Actualment, està finalitzant la tesi doctoral a l'Institut Químic de Sarrià (IQS).

Almudena Aranda-Martínez és doctora en biologia aplicada per la Universitat d'Alacant (2016). Ha realitzat un postdoctorat al Laboratori de Bioquímica de l'Institut Químic de Sarrià (IQS) en el projecte Nano3Bio.

Enea Sancho-Vaello és doctora en bioquímica per la Universitat de València (2013). Ha realitzat postdoctorats a la Unidad de Biofísica (CSIC-UPV/EHU) (2013-2015) i al Laboratori de Bioquímica de l'Institut Químic de Sarrià en el projecte Nano-3Bio. Actualment, és professora associada al Departament de Microbiologia de la Universitat de Girona.

Xevi Biarnés és professor titular de la Universitat Ramon Llull a l'Institut Químic de Sarrià (IQS). És doctor en biotecnologia per la Universitat de Barcelona (2007) i ha fet postdoctorats a la SISSA (Trieste, Itàlia, 2008-2010) i al Laboratori de Bioquímica de l'IQS (2011-2013). Actualment, és investigador al Laboratori de Bioquímica de l'IQS.

Magda Fajjes és professora titular de la Universitat Ramon Llull a l'Institut Químic de Sarrià (IQS). És doctora en química per la Universitat Ramon Llull (2003) i ha fet un postdoctorat al Wageningen Center for Food Sciences d'Holanda (2003-2004). Actualment, és investigadora al Laboratori de Bioquímica de l'IQS.

Antoni Planas és catedràtic de la Universitat Ramon Llull a l'Institut Químic de Sarrià (IQS) i doctor enginyer químic per l'IQS (1987). Ha fet postdoctorats a la Universitat de Califòrnia a Berkeley (EUA) (1988-1989) i a l'Institut de Biologia Fonamental (IBF) de la Universitat Autònoma de Barcelona (1990-1992), i ha estat professor titular a l'IQS (1993-2003). És investigador principal del Laboratori de Bioquímica de l'IQS i coordinador del grup de Química Biològica i Biotecnologia (GQBB).