

University of Groningen

Biochemical characterization of β -galactosidases and engineering of their product specificity

Yin, Huifang

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Yin, H. (2017). *Biochemical characterization of β -galactosidases and engineering of their product specificity*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting en vooruitzichten

Microbiële β -galactosidase enzymen worden op brede schaal in de industrie toegepast als biokatalysatoren om prebiotische galactooligosachariden (GOS) te produceren uit lactose. GOS worden toegevoegd aan babyvoeding vanwege het feit dat hun moleculaire grootte en prebiotische eigenschappen erg lijken op die van humane oligosachariden (hMOS) [1], [2], [3]. GOS zijn oligosachariden opgebouwd uit een aantal galactose eenheden en een terminale glucose of galactose eenheid, verbonden via verschillende types glycosidische bindingen, met een polymerisatiegraad (DP) van 2 tot 10 [4]. Verschillende β -galactosidase enzymen zijn gekarakteriseerd, en hun GOS producten geïdentificeerd. In de afgelopen jaren heeft onze onderzoeksgroep methodes ontwikkeld en geoptimaliseerd om de moleculaire structuur van deze GOS producten te karakteriseren [5], en dit heeft geresulteerd in een gedetailleerde analyse en vergelijking van 7 commerciële GOS productmengsels [6]. De samenstelling van deze mengsels bleek sterk te verschillen qua grootte en structuuropbouw, waaronder verschillen in types glycosidische binding. Het bleef echter onduidelijk hoe structurele verschillen tussen de gebruikte enzymen bijdragen aan de variëteit van de producten, o.a. wat betreft het synthetiseren van verschillende types glycosidische binding tussen de suikereenheden (**Hoofdstuk 1**). We onderzochten dit door allereerst een zorgvuldige vergelijking te maken van 3 commercieel gebruikte β -galactosidase enzymen, namelijk die van *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* en *Aspergillus oryzae* (**Hoofdstuk 2**). Hieruit bleek dat de β -galactosidase van *B. circulans* de hoogste GOS opbrengst heeft en bovendien het GOS mengsel met de grootste diversiteit synthetiseert. Deze bevindingen brachten ons er toe om - op basis van de 3D structuur van dit enzym - gerichte mutaties aan te brengen en de productspecificiteit van deze mutanten te bepalen (**Hoofdstuk 3 & 4**). Op deze manier kon de functie van individuele aminozuur residuen in de actieve holte worden opgehelderd. Tenslotte werd de productspecificiteit van wild-type en mutanten van het *B. circulans* β -galactosidase enzym bepaald met gebruik van lactulose als substraat, en

vergeleken met dat van lactose, om zo de toepasbaarheid van β -galactosidases te vergroten (**Hoofdstuk 5**).

Vergelijking van drie commerciële β -galactosidases

Om GOS mengsels te synthetiseren uit lactose worden β -galactosidase enzymen uit verschillende organismen gebruikt, met name die uit *B. circulans* (een bacterie), *K. lactis* (een gist), en *A. oryzae* (een schimmel). Deze drie enzymen werden eerder al gekarakteriseerd qua GOS opbrengst, optimale reactietemperatuur en pH. **Hoofdstuk 2** geeft een meer gedetailleerde vergelijking van de productprofielen van deze drie enzymen (*B. circulans*, *K. lactis* en *A. oryzae*), waarbij lactose als substraat werd gebruikt. In deze profielen werden respectievelijk 21, 12 en 11 verschillende GOS- hoofdstructuren geïdentificeerd. Het GOS mengsel geproduceerd door de *B. circulans* β -galactosidase bevatte structuren met (β 1 \rightarrow 4), (β 1 \rightarrow 2), (β 1 \rightarrow 3) en (β 1 \rightarrow 6) glycosidische bindingen, waarbij de meest voorkomende producten bindingen van het (β 1 \rightarrow 4) type hadden. 4'GalLac, ontstaan door de elongatie van lactose met een (β 1 \rightarrow 4) binding, bleek het eerst gesynthetiseerde product, waarbij lactose als donor- en acceptorsubstraat fungeert. Producten met andere bindingstypes werden later in de reactie gesynthetiseerd en verder verlengd met galactose eenheden via (β 1 \rightarrow 4) bindingen; op deze manier vormde zich een scala aan GOS structuren. De resultaten maakten duidelijk dat het *B. circulans* β -galactosidase enzym inderdaad een sterke voorkeur heeft voor het vormen van (β 1 \rightarrow 4) bindingen. Het *K. lactis* enzym daarentegen synthetiseerde vooral GOS met (β 1 \rightarrow 6) bindingen; het eerste product van dit enzym was [β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp] waarbij lactose zowel donor- als acceptorsubstraat is. Later in de reactie werden ook enkele disachariden anders dan lactose gevormd, die dan verder werden verlengd met (β 1 \rightarrow 6)-verbonden galactose eenheden. Tenslotte vonden we dat het β -galactosidase enzym uit *A. oryzae* ook een

voorkeur heeft voor het synthetiseren van GOS met (β 1 \rightarrow 6) bindingen, waarbij [β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp] het meest voorkomende product is.

Ook de maximale GOS opbrengst van de drie enzymen verschilde duidelijk en bedroeg respectievelijk $48.3 \pm 1.2\%$, $34.9 \pm 1.8\%$, and $19.5 \pm 2.2\%$ (van totale suikers) voor *B. circulans*, *K. lactis*, en *A. oryzae*, respectievelijk bereikt na 8, 6 en 8 uur incubatie. Als we de productprofielen van deze drie enzymen vergelijken, en deze bekijken als functie van de tijd, is duidelijk dat de GOS samenstelling sterk afhangt van het organisme waaruit het enzym werd geïsoleerd, en bovendien varieert gedurende de reactietijd. Deze resultaten gaven echter nog geen antwoorden op de vraag waardoor deze verschillen ontstonden.

In eerdere onderzoeken werd gespeculeerd dat galactose en glucose, gevormd tijdens de β -galactosidase reactie, de transglycosyleringsreactie remmen. Onze experimenten toonden aan dat het effect van deze twee monosacchariden verschilt per organisme waaruit het enzym werd geïsoleerd, maar ook dat ze niet noodzakelijkerwijs remmers zijn. De β -galactosidase enzymen uit *B. circulans* en *K. lactis* bleken in staat om zowel galactose als glucose te gebruiken als acceptor substraat in de transglycosyleringsreactie. Ook het *A. oryzae* enzym kan glucose als acceptor substraat gebruiken, terwijl galactose voor dit enzym duidelijk een remmer is [7].

Structurele grondslag voor de productspecificiteit van *B. circulans* β -galactosidase

De samenstelling van GOS kan variëren in type binding, grootte (polymerisatiegraad, DP) en vertakkingspercentage; welke structurele determinanten in de enzymen hiervoor verantwoordelijk zijn was tot nu toe onduidelijk. Met de beschikbare 3D kristalstructuur van de C-terminaal getrunceerde BgaD-D variant van het *B. circulans* β -galactosidase enzym als leidraad richtten we ons allereerst op Arg484 in de actieve holte, en voerden een

verzadigingsmutagenese experiment uit op deze positie (**Hoofdstuk 3**). De resultaten lieten zien dat alle mutaties van dit aminozuur residu de productbindingspecificiteit beïnvloeden en een duidelijk veranderd GOS productprofiel tot gevolg hebben. Uit de NMR-analyse van het GOS mengsel van de Arg484Ser mutant bleek dat het GOS mengsel zowel ($\beta 1 \rightarrow 3$) als ($\beta 1 \rightarrow 4$) bindingen bevatte, terwijl dit voor het wild-type enzym voornamelijk ($\beta 1 \rightarrow 4$) was. Zeer opvallend was ook een 50-voudige toename van de hoeveelheid van het trisaccharide β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Glcp gesynthetiseerd door de Arg484Ser en Arg484His mutanten, in vergelijking met wild-type. NMR-analyse liet verder zien dat de Arg484Ser mutant 10 nog niet eerder beschreven GOS structuren produceert, daarmee het totaal aantal bekende GOS structuren verder verhogend (van 60 naar 70). Hoewel de mutanten een duidelijk andere bindingspecificiteit hadden, bleef de totale hoeveelheid geproduceerd GOS vrijwel onveranderd. Uit onze resultaten blijkt dus dat Arg484 een cruciale rol speelt voor wat betreft de productbindingspecificiteit van BgaD-D; overigens is dit de eerste studie die aantoont dat *enzyme engineering* van een β -galactosidase resulteert in een gewijzigde GOS bindingspecificiteit en GOS product mengsel [8].

Structuur-functie relatie van residuen in de actieve holte van het *B. circulans* β -galactosidase

De kristalstructuur van een C-terminaal getrunceerd construct van de β -galactosidase uit *B. circulans* (BgaD-D) is in detail opgehelderd [9]. De bijdragen van de aminozuur residuen in de actieve holte zijn echter niet volledig duidelijk. In **Hoofdstuk 4** identificeren we, op basis van vergelijking van de aminozuursequenties van BgaD-D en een andere β -galactosidase (*Streptococcus pneumoniae* BgaA), en de structuur van een complex van BgaA met LacNAc, acht aminozuur residuen in de actieve holte van BgaD-D (Arg185, Asp481,

Lys487, Tyr511, Trp570, Trp593, Glu601, en Phe616); deze acht kunnen op basis van hun locatie worden ingedeeld in vier groepen.

De eerste groep bevat Arg185 en Glu601 en draagt bij aan subsite -1 van de substraatbindingsite van BgaD-D (het substraat bindt met het niet-reducerende eind in +n subsites, en met het reducerend eind in -n subsites, waarbij splitsing plaatsvindt tussen +1 en -1 [10]). Deze twee (niet-katalytische) aminozuur residuen zijn sterk geconserveerd in glycosyl hydrolase familie GH2 β -galactosidases; uit de structurele superpositie van BgaD-D en BgaA kunnen we aannemen dat ze betrokken zijn bij de binding en positionering van het substraat.

De tweede groep bestaat uit één enkel residu, namelijk Tyr511. De OH-groep van Tyr511 gaat een waterstofbrug interactie aan met het dichtbij gelegen nucleofiele residu Glu532; het proton van de Tyr511 OH-groep zou dus kunnen worden overgedragen op de nucleofiel om zo bij te dragen aan katalyse van de reactie. Inderdaad was geen enkele van de Tyr511 mutanten actief; dit residu is dus essentieel voor de enzymactiviteit.

De derde groep omvat drie aromatische residuen: Trp570 nabij subsite +1, en Trp593 en Phe616 nabij subsite -1. Samen vormen deze drie residuen een aromatische holte en bepalen mede de vorm van de plek waar het substraat bindt. Mutaties van deze residuen gaven een sterk verminderde enzym activiteit, vooral als het niet-aromatische substituties betrof. Analyse van de GOS profielen toonde aan dat de voorkeur qua bindingstype was veranderd, en dat er relatief meer kleine oligosacharide producten werden gesynthetiseerd. Bovendien bleek dat Trp570 essentieel was om een relatief hoge verhouding tussen transglycosylering en hydrolyse te bewerkstelligen; dit suggereert dat het betrokken is in selectie van het acceptor substraat (water of koolhydraten). Een vergelijkbare situatie doet zich voor in *E. coli* LacZ, waar Trp999, een aromatisch residu nabij subsite +1, ook

een sleutelrol heeft in de selectie van acceptoren, en de transgalactosylerings-opbrengst veiligstelt [11].

De laatste groep bestaat uit Asp481 en Lys487. Samen met Arg484 bevinden deze residuen zich nabij subsite +1. Mutaties van Asp481 verlagen de enzymactiviteit aanzienlijk. De GOS product profielen van mutanten van Asp481 en Lys487 waren sterk gewijzigd ten opzichte van het wild-type enzym, net zoals eerder voor Arg484 was waargenomen (**Hoofdstuk 3**). Omdat Asp481 zich vlakbij de zuur/base katalysator Glu447 bevindt, zouden de mutaties de oriëntatie van Glu447 kunnen beïnvloeden en dus ook de katalyse en substraatbinding. Lys487 is relatief ver weg van de +1 subsite, en de activiteit van mutanten van dit residu is relatief hoog in vergelijking met die van Asp481 mutanten. Sommige Asp481 en Lys487 mutanten hadden een GOS profiel dat vergelijkbaar is met dat van het wild-type enzym, terwijl anderen een GOS profiel hadden dat meer vergelijkbaar is met dat van Arg484 mutanten. Mutaties van Lys487 zouden de micro-omgeving van subsite +1 kunnen veranderen en daardoor het GOS profiel en de bindingstype-specificiteit.

Hoofdstuk 4 omvat dus een gedetailleerde biochemische karakterisering en analyse van de productprofielen van mutanten betreffende aminozuur residuen in de actieve holte van *B. circulans* BgaD-D. De resultaten laten zien dat deze residuen een cruciale rol spelen in het binden en positioneren van het substraat, en daarmee bepalend zijn voor de enzymactiviteit en het productprofiel [12].

Synthese van oligosachariden gevormd uit lactulose door wild-type en de Arg484His mutant van β -galactosidases uit *B. circulans*, en hun benutting voor de groei van Bifidobacteria

De interesse voor oligosachariden afgeleid van lactulose (β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Fru) is recentelijk toegenomen vanwege hun hoge weerstand tegen vertering in het darmstelsel, ook in verband met de zoektocht naar nieuwe prebiotica. Er is echter

nog niet veel onderzoek naar de structuur en functie van lactulose-afgeleide oligosacchariden (OsLu) gedaan. In **hoofdstuk 5** beschrijven we de synthese van OsLu door β -galactosidase BgaD-D uit *B. circulans* (wild-type en mutant Arg484His), alsmede de scheiding en identificatie van OsLu structuren. De probiotische bacteriëstammen *Bifidobacterium dentium* en *Bifidobacterium breve* werden getest op hun vermogen om deze (gezuiverde) OsLu te gebruiken als koolstofbron en daarop te groeien; hetzelfde werd gedaan voor TS0903 GOS (Vivinal GOS zonder mono- en disacchariden).

In totaal werden in een NMR analyse 8 OsLu structuren geïdentificeerd; 5 hiervan kunnen als geheel nieuw worden beschouwd en vergroten dus het aantal beschreven OsLu structuren aanzienlijk. Het wild-type BgaD-D enzym vertoonde de hoogste productopbrengst in incubaties met 15 U/g lactulose: 202.9 ± 2.3 g/L, gebruikmakend van 60% (w/w) lactulose bij 60°C gedurende 8 uur. De Arg484His mutant had een hoogste opbrengst van 197.7 ± 5.4 g/L bij gelijke omstandigheden maar gedurende 16 uur. Incubatie van de twee Bifidobacterie stammen met het gevormde OsLu mengsel liet zien dat alleen de nieuw ontdekte verbinding β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-D-Fru werd geconsumeerd. In aanwezigheid van TS0903 GOS had *B. dentium* een sterke voorkeur voor oligosacchariden met een lage DP (DP3), terwijl *B. breve* een voorkeur liet zien voor langere oligosacchariden (DP \geq 4).

Dit onderzoek geeft dus een gedetailleerde analyse van de synthese van OsLu, gebruikmakend van een β -galactosidase (wild-type of mutant), en de benutting van OsLu als groeisubstraten door Bifidobacteria. Omdat er nog maar weinig OsLu structuren bekend waren, en omdat het aantal studies waarbij ze als groeisubstraat voor probiotische bacteriën werden getest beperkt is, geeft ons onderzoek belangrijke nieuwe inzichten in dit veld.

Conclusies

Dit proefschrift beschrijft de biochemische karakterisering van β -galactosidase enzymen en hun producten. Ten eerste laat een gedetailleerde analyse van de GOS producten gesynthetiseerd door drie commerciële β -galactosidasen (uit *B. circulans*, *K. lactis* en *A. oryzae*) zien dat hun opbrengsten, bindingstype-specificiteit en diversiteit van GOS producten sterk verschillen van elkaar. Van de drie enzymen had het *B. circulans* enzym de hoogste GOS opbrengst en de hoogste diversiteit. Na deze analyse werd – aan de hand van de eiwitstructuur – gerichte mutagenese toegepast op deze *B. circulans* β -galactosidase om de rol van specifieke aminozuur residuen in de actieve holte van het enzym te onderzoeken, en om mogelijk niet eerder onderzochte determinanten van GOS bindingstype-specificiteit te identificeren. De rol van deze aminozuur residuen met betrekking tot enzymfunctie, activiteit en bindingstype-specificiteit werd in detail bestudeerd. Hieruit bleek dat residuen in subsite -1 essentieel zijn voor enzymactiviteit en substraatbinding. Aromatische residuen in de actieve holte vormen een aromatische holte die de binding van acceptorsubstraten bepaalt en de verhouding tussen producten met verschillende bindingstypes beïnvloedt. Ook bleek dat mutaties van het aromatische residu Trp570 de transgalactosylering/hydrolyse verhouding van het enzym beïnvloeden; dit suggereert dat dit residu betrokken is bij de selectie van acceptorsubstraten (water of koolhydraten) en essentieel is voor de relatief hoge transgalactosyleringsactiviteit. De residuen die gelegen zijn nabij subsite +1 zijn essentieel voor de bindingstype-specificiteit; mutaties op deze posities resulteerden in een verandering in bindingstype-specificiteit. Ons onderzoek is het eerste dat beschrijft hoe *enzyme engineering* toegepast op β -galactosidase de bindingstype-specificiteit wijzigt. Gezien de vergelijkbaarheid van β -galactosidase aminozuurvolgordes kunnen mutaties van genoemde residuen wellicht ook toegepast worden op andere β -galactosidase enzymen, om zo hun bindingstype-specificiteit en de verhouding tussen transgalactosylering en hydrolyse te wijzigen. Mogelijk hebben GOS mengsels met een gewijzigd bindingstype-verdeling nieuwe functionaliteit en kunnen deze in de toekomst als

prebiotica worden toegepast. Het uiteindelijke doel is om β -galactosidase enzymen zo aan te passen dat ze specifieke structuren met gewenste functionaliteit kunnen produceren. Ons onderzoek gaf hierbij belangrijke inzichten in de structuur-functie relatie van β -galactosidase enzymen. Tenslotte werd lactulose als substraat gebruikt, voor zowel wild-type *B. circulans* β -galactosidase als een mutant hiervan. Dit resulteerde in de synthese en structurele karakterisering van 5 nieuwe oligosachariden, gevormd uit lactulose. Groeitesten met Bifidobacteria suggereerden dat de gevormde OsLu mengsels veelbelovende nieuwe prebiotica zijn.

β -Galactosidases zijn interessante enzymen en worden breed toegepast in de industrie als biokatalysatoren. Het verder aanpassen van de synthese-processen en het doen van *enzyme engineering* onderzoek kan leiden tot β -galactosidases die “op maat” oligosachariden met gewenste functionaliteit produceren.

Referenties

- 1 Boehm, G., Fanaro, S., Jelinek, J., Stahl, B. and Marini, A. (2003) Prebiotic concept for infant nutrition. *Acta Paediatr. Suppl.* **91**, 64–67.
- 2 Boehm, G., Stahl, B., Jelinek, J., Knol, J., Miniello, V. and Moro, G. E. (2005) Prebiotic carbohydrates in human milk and formulas. *Acta Paediatr. Suppl.* **94**, 18–21.
- 3 Vandenplas, Y., De Greef, E. and Veereman, G. (2015) Prebiotics in infant formula. *Gut Microbes* **5**, 681–687.
- 4 Sanz, M. L., Sanz, J. and Martinez-Castro, I. (2002) Characterization of O-trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* **56**, 617–622.
- 5 Van Leeuwen, S. S., Kuipers, B. J. H., Dijkhuizen, L. and Kamerling, J. P. (2014) Development of a ^1H NMR structural-reporter-group concept for the analysis of prebiotic galacto-oligosaccharides of the $[\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{x)}]_n\text{-D-Glcp}$ type. *Carbohydr. Res.* **400**, 54–58.
- 6 van Leeuwen, S. S., Kuipers, B. J. H., Dijkhuizen, L. and Kamerling, J. P. (2016) Comparative structural characterization of 7 commercial galacto-oligosaccharide

- (GOS) products. *Carbohydr. Res.* **425**, 48–58.
- 7 Yin, H., Bultema, J. B., Dijkhuizen, L. and van Leeuwen, S. S. (2017) Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*. *Food Chem.* **225**, 230–238.
 - 8 Yin, H., Pijning, T., Meng, X., Dijkhuizen, L. and van Leeuwen, S. S. (2017) Engineering of the *Bacillus circulans* β -galactosidase product specificity. *Biochemistry* **56**, 704–711.
 - 9 Ishikawa, K., Kataoka, M., Yanamoto, T., Nakabayashi, M., Watanabe, M., Ishihara, S. and Yamaguchi, S. (2015) Crystal structure of β -galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382 (BgaD) and the construction of the thermophilic mutants. *FEBS J.* **282**, 2540–2552.
 - 10 Davies, G. J., Wilson, K. S. and Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321** (Pt 2, 557–559.
 - 11 Huber, R. E., Hakda, S., Cheng, C., Cupples, C. G. and Edwards, R. A. (2003) Trp-999 of β -galactosidase (*Escherichia coli*) is a key residue for binding, catalysis, and synthesis of allolactose, the natural Lac operon inducer. *Biochemistry* **42**, 1796–1803.
 - 12 Yin, H., Pijning, T., Meng, X., Dijkhuizen, L. and van Leeuwen, S. S. (2017) Biochemical characterization of the functional roles of residues in the active site of the β -galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382. *Biochemistry* **56**, 3109–3118.

