

Alternativen für Saccharose

„Schiffe Versenken“: Optimierung einer hochaktiven Saccharose-Isomerase

PATRICK PILAK, ARNE SKERRA

LEHRSTUHL FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE, TU MÜNCHEN, FREISING

The sucrose isomerase SmuA from *Serratia plymuthica* catalyses the production of isomaltulose, an artificial sweetener used in the food industry. To suppress the formation of the hygroscopic by-product trehalulose we applied a semirational protein engineering strategy inspired by the “battleship” board game. After seven cycles of introducing amino acid exchanges around the active site and investigating their influence on the enzymatic product profile we obtained a triple mutant that showed 2.3 times less trehalulose formation but had retained high catalytic efficiency.

DOI: 10.1007/s12268-021-1645-x

© Die Autoren 2021

■ Das Saccharose-Isomer Isomaltulose (6-O- α -D-Glucopyranosyl-D-fructose, Palatinose) ist ein relevantes Vorprodukt für die Lebensmittelindustrie. Durch katalytische Hydrierung gewinnt man daraus die Diastereomeren-Mischung der entsprechenden Zuckeralkohole, welche unter dem Begriff Isomalt in zahlreichen Lebensmitteln zu finden ist [1]. Der Ersatz von Rohrzucker (Saccharose) in Lebensmitteln oder Süßigkeiten mindert nicht nur das Risiko von Zahnkaries, sondern verringert auch glykämische und insulinämische Effekte. Demgemäß bietet Isomalt eine gesündere Option für Personen, die an Fettleibigkeit, Diabetes oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen leiden [2]. In der Natur ist Isomaltulose in Zuckerrohr und Honig zu finden. Industriell wird Isomaltulose derzeit aus Saccharose hergestellt unter Verwendung von immobilisierten Bakterienzellen, die natürlicherweise das Enzym Saccharose-Isomerase exprimieren [3]. Dieses Enzym katalysiert die Isomerisierung von Saccharose zu den Hauptprodukten Isomaltulose und Trehalulose und, als Nebenprodukt, die Hydrolyse zu den Monosacchariden Glucose und Fructose (**Abb. 1**, [4]).

Bei der industriellen Herstellung kristalliner Isomaltulose wird der Downstream-Prozess jedoch durch die hygroskopische Trehalulose behindert. Für dessen Abtrennung ist

ein zusätzlicher ertragssenkender Zentrifugationsschritt nötig, um Isomaltulose in Pulverform zu gewinnen. Folglich ist bei der enzymatischen Katalyse ein Produkt mit minimalem Trehalulosegehalt wünschenswert [5]. Literaturbekannte Saccharose-Isomerasen, darunter das von uns bearbeitete Enzym SmuA aus *Serratia plymuthica*, produzieren überwiegend Isomaltulose (66–91 %), zusammen vor allem mit der Trehalulose (3–21 %) als Nebenprodukt [6]. Leider führten bisherige Bemühungen des Enzym-Engineerings an SmuA oder verwandten Saccharose-Isomerasen (wie PadU aus *Pantoea dispersa*) durchweg zu verringerten Ausbeuten an Isomaltulose in Verbindung mit einer erhöhten Produktion von Trehalulose, Glucose und Fructose und insgesamt zu einem erheblichen Verlust an Enzymaktivität [7]. Wir haben deshalb eine neuartige Strategie zur Verbesserung der biokatalytischen Eigenschaften von SmuA durch semirationales Protein Engineering verfolgt.

Etablierung eines effizienten Expressionssystems für das funktionelle Enzym SmuA

Hierzu wurde zunächst eine Expressionsstrategie für das funktionelle rekombinante Enzym etabliert [8]. Nach verschiedenen Versuchen führte die periplasmatische Sekre-

tion in *Escherichia coli* zum Erfolg. Zwar trägt SmuA keine strukturellen Disulfidbindungen, was normalerweise den Anlass für eine sekretorische Expressionsstrategie liefert; allerdings stellten wir fest, dass die effiziente und korrekte Faltung dieses Enzyms Calciumionen erfordert, welche im bakteriellen Cytoplasma nicht in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen. Überraschenderweise konnten wir in den Original-Bearbeitungsdaten der publizierten Kristallstruktur [9] eine Calciumbindestelle in einer konservierten Schleifenregion von SmuA identifizieren – ein essenzielles Strukturmerkmal, das zuvor offenbar übersehen worden ist. Zudem gelang es uns, durch Einführung eines Aminosäureaustauschs an der Proteinoberfläche, V465E, die Löslichkeit des Enzyms zu verbessern. Zu dessen Reinigung aus dem periplasmatischen Zellextrakt fand die Strep-tag-Affinitätschromatographie (SAC) [10] in Verbindung mit der Größenausschlusschromatographie (SEC) Anwendung. Die Aktivität des zur Homogenität gereinigten monomeren Enzyms wurde mittels HPLC-basierter Zuckanalytik analysiert und dabei ein Produktspektrum von 93,7 Prozent Isomaltulose, 3,5 Prozent Trehalulose und 2,8 Prozent Monosacchariden detektiert (**Abb. 2**). Demgegenüber zeigte die in der Literatur als bester Isomaltulose-Produzent [7] bekannte Saccharose-Isomerase PadU im gleichen Assay ein Produktspektrum von 96,3 Prozent Isomaltulose, 1,2 Prozent Trehalulose und 2,5 Prozent Monosaccharid. Aufgrund der geringeren katalytischen Aktivität und des Fehlens kristallographischer Strukturinformation für dieses Enzym wurde dennoch SmuA(V465E) für das Protein Engineering ausgewählt.

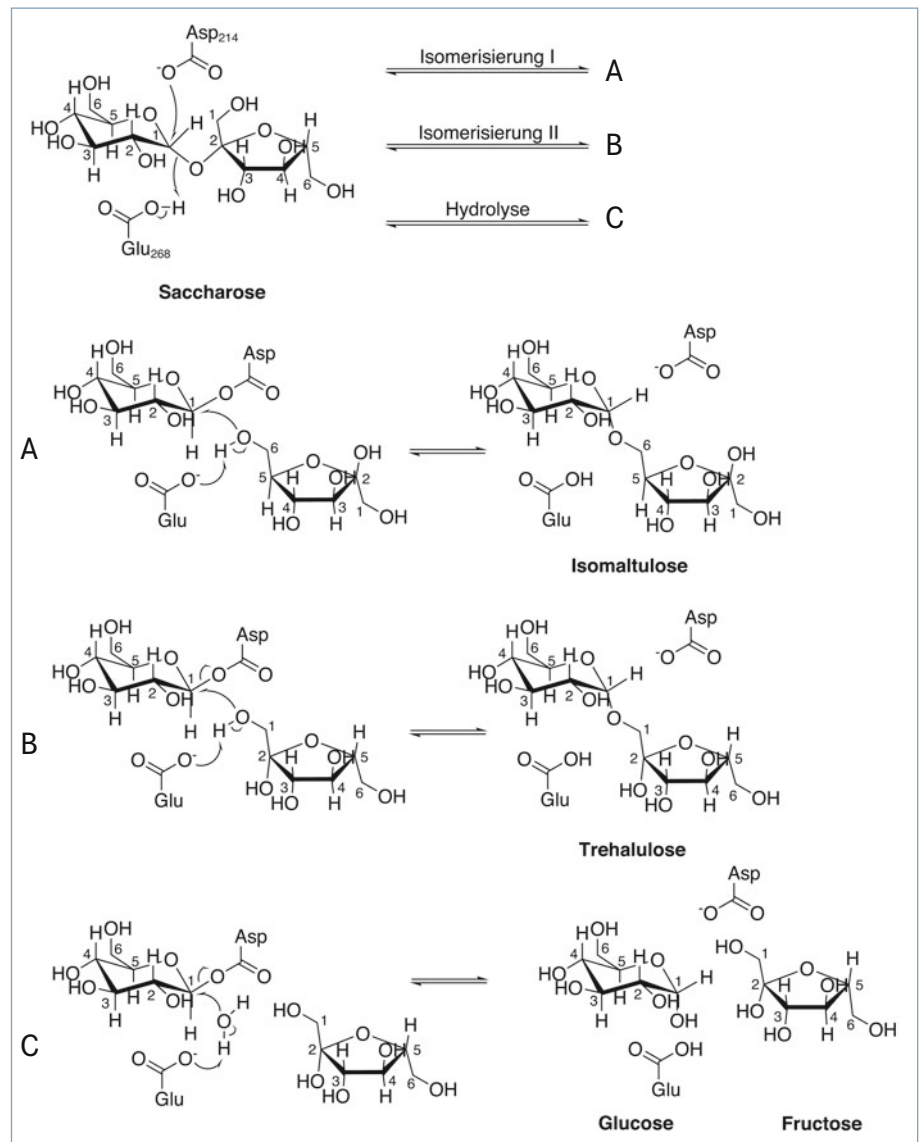
Semirationale Mutagenese-strategie und iterative Verbesserung der SmuA-Produktspezifität

Die gerichtete Evolution von Enzymen – wie auch von Antikörpern oder alternativen Bindeproteinen [11] – beruht meist auf der gezielten Variation einer Aminosäuresequenz mit einem vorbestimmten

Zufälligkeitsgrad. Anhand der bekannten Molekülstruktur können entweder einzelne Aminosäuren oder ganze Bereiche der Sequenz randomisiert werden, woran sich Selektions- oder Screeningverfahren anschließen. Im Fall von Enzymen umfasst dies in der Regel einen iterativen Prozess aus drei Schritten: (a) Generierung der Mutantbibliothek, (b) gentechnische Produktion und ggf. Reinigung der Mutanten und (c) Screening der enzymatischen Aktivität hinsichtlich geforderter Parameter [12, 13]. Diese konventionelle Vorgehensweise war bei unserem Projekt jedoch erschwert, da kein leistungsstarkes Hochdurchsatzscreening unter spektroskopischer Quantifizierung der Produkte Isomaltulose und vor allem Trehalulose zur Verfügung stand. Zur präzisen Bestimmung der Enzymaktivität und insbesondere des Produktverhältnisses wurde eine HPLC-Analytik mit einem zuckerselektiven Trennmedium unter Nutzung eines Brechungsindexdetektors entwickelt, dessen Sensitivität auf geringe Mengen Trehalulose ausgerichtet war. Folglich war eine effiziente schrittweise evolutive Strategie gefordert, die ein akzeptables Verhältnis zwischen dem hohem Arbeitsaufwand für das Screening von individuell isolierten Mutanten und der begrenzten Vorhersagekraft des rationalen Protein Engineerings anhand der Kristallstruktur des Enzyms mit sich brachte.

Hierzu wurde ein Hybridansatz etabliert, der dem weltbekannten Brettspiel „Schiffe Versenken“ ähnelt. Die Regeln dieses Strategiespiels beruhen auf einem abwechselnden Abfeuern von Schüssen der beiden beteiligten Spieler auf die zunächst unsichtbare gegnerische Flotte auf einem zweidimensionalen Spielfeld. Landet ein Schuss im Wasser, so wird das Raster an dieser Stelle mit einem Punkt markiert; wird jedoch ein Schiff getroffen, so wird dieses Feld mit einem Kreuz gekennzeichnet. Ein solcher Treffer weist auf die Anwesenheit eines größeren Schiffs in diesem Bereich hin, das sich über mehrere Felder erstrecken kann. Dies erhöht die Erfolgsaussichten weiterer Schüsse in dem entsprechenden Koordinatensektor, bis hin zum Versenken des Schiffs. Das daraus sich schrittweise entwickelnde Treffermuster erzeugt ein zunehmend detailliertes Bild der gegnerischen Flotte. Mit jedem abgefeuerten Schuss, sei es ein Treffer oder ein Fehlschuss, gewinnt man also neue Informationen über die Gesamtsituation.

Übertragen auf das Protein Engineering der SmuA wurden systematisch Aminosäu-



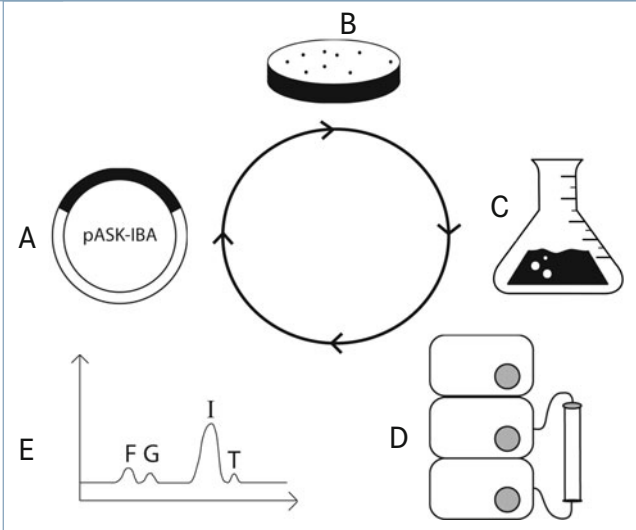
▲ **Abb. 1:** Reaktionsmechanismus der Saccharose-Isomerase SmuA. Das Schema zeigt die drei möglichen Reaktionspfade ausgehend von Saccharose als Substrat mit den Produkten Isomaltulose (Isomerisierung I), Trehalulose (Isomerisierung II) sowie Glucose und Fructose (Hydrolyse).

repositionen in und um das aktive Zentrum des Enzyms in aufeinanderfolgenden Zyklen in paralleler Weise substituiert, jeweils gefolgt von der oben beschriebenen funktionellen Charakterisierung (**Abb. 3**). Insgesamt wurden in sieben Zyklen 55 Einzelpunktmutationen an 30 verschiedenen Aminosäurepositionen analysiert und dabei zwölf Enzymkandidaten mit deutlich verbesserten Eigenschaften identifiziert.

Mit überschaubarem experimentellem Aufwand zu einem verbesserten Enzym

In den ersten drei Zyklen mit jeweils 14 Einzelsubstitutionen wurde der Fokus auf die innerste Schale von Aminosäureresten um

das aktive Zentrum des Enzyms gelegt. Aminosäureaustausche an diesen Positionen führten ausschließlich zu einem unerwünschten Anstieg der Trehalulosebildung, verbunden mit einem mehr oder weniger starken Abfall der katalytischen Aktivität. Daher wurden diese innerhalb der Enzymfamilie der Saccharose-Isomerasen stark konservierten Positionen von der weiteren Mutagenese ausgeschlossen. Darauf folgende Bemühungen zielten auf die zweite und dritte Schale von Aminosäuren. Hierbei wurden gemischte, meist nachteilige aber mitunter auch günstige Effekte beobachtet, wobei jede analysierte Mutation – unabhängig davon, ob es ein Treffer oder Fehlschuss war – das Verständnis der Enzymregionen mit ihrer Rolle



◀ **Abb. 2:** Experimenteller Ablauf beim semirationalen Protein Engineering. Nach gentechnischer Konstruktion (A) und Expression der Mutanten in *Escherichia coli* (B) werden einzelne Mutanten im präparativen Maßstab produziert (C), gereinigt (D) und der enzymologischen Charakterisierung durch HPLC-Analytik (E) unterzogen.

für die Isomerisierung des Substrats Saccharose verbesserte. Da diese Befunde jeweils bei der Planung des nächsten Mutationszyklus einfließen, stiegen die Chancen, Mutanten mit vorteilhaften Eigenschaften zu identifizieren, kontinuierlich an. Im siebten und letzten Zyklus konnten auf diese Weise sogar sechs „Treffer“ aus insgesamt elf Mutanten verzeichnet werden.

In der abschließenden Phase wurden die vielversprechendsten Punktmutationen miteinander kombiniert, wodurch eine sukzessive Verbesserung der Produktspezifität erreicht wurde [8]. Damit gelang es, die hochaktive und bereits relativ spezifische Saccharose-Isomerase SmuA hinsichtlich ihrer Produktspezifität deutlich zu verbessern. Die prozentuale Ausbeute des Nebenprodukts Trehalulose war bei der Variante SmuA(Y219L/T369F/D398G/F453Y/V465E) von 3,5 Prozent auf 1,4 Prozent verringert. Den besten Kompromiss zwischen enzymatischer Aktivität ($k_{\text{cat}}/K_M = 11,8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) und niedriger Trehalulose-Produktion (1,5 %) lieferte dagegen die Dreifachmutante

für einen effizienteren Prozess der Isomaltulose-Produktion. Darüber hinaus sollte sich die von uns bei diesem Protein-Engineering-Projekt erfolgreich angewandte Strategie des „Schiffe Versenkens“ auf andere Enzyme oder auch Bindeproteine leicht übertragen lassen.

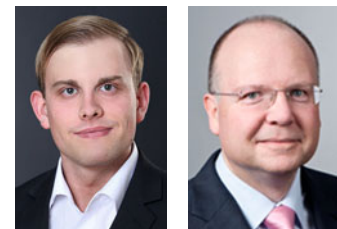
Literatur

- [1] Schiweck H, Munir M, Rapp K et al. (1990) New developments in the use of sucrose as an industrial bulk chemical. *Zuckerindustrie* 115: 555–565
- [2] Lina BA, Jonker D, Kozianowski G (2002) Isomaltulose (palatinose): a review of biological and toxicological studies. *Food Chem Toxicol* 40: 1375–1381
- [3] Krastanov A, Blazheva D, Yanakieva I, Kratchanova M (2006) Conversion of sucrose into palatinose in a batch and continuous processes by immobilized *Serratia plymuthica* cells. *Enzyme Microb Technol* 39: 1306–1312
- [4] Veronese T, Perlot P (1998) Proposition for the biochemical mechanism occurring in the sucrose isomerase active site. *FEBS Lett* 441: 348–352
- [5] Hellmers F, Kachel S, Öhrlein J, Wolter J (2018) Process for production of solid material containing isomaltulose crystals and trehalulose. EP3363909A1
- [6] Ravaut S, Robert X, Watzlawick H et al. (2009) Structural determinants of product specificity of sucrose isomerases. *FEBS Lett* 583: 1964–1968
- [7] Goulter KC, Hashimi SM, Birch RG (2012) Microbial sucrose isomerases: producing organisms, genes and enzymes. *Enzyme Microb Technol* 50: 57–64

SmuA(Y219L/D398G/V465E). Dieses durch Protein Engineering optimierte Enzym bietet eine vielversprechende Alternative zu der etablierten Saccharose-Isomerase PadU und verspricht Potenzial für Anwendungen in der Biotechnologie und Lebensmittelindustrie

- [8] Pilak P, Schiefner A, Seiboth J et al. (2020) Engineering a highly active sucrose isomerase for enhanced product specificity by using a “battleship” strategy. *ChemBioChem* 21: 2161–2169
- [9] Ravaut S, Watzlawick H, Haser R et al. (2006) Overexpression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the *Protaminobacter rubrum* sucrose isomerase SmuA. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62: 74–76
- [10] Skerra A (2003) Das Strep-tag als molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung in der Proteinforschung. *BIOspektrum* 9:189–192
- [11] Skerra A (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr Opin Chem Biol* 7: 683–693
- [12] Arnold FH (2018) Directed evolution: bringing new chemistry to life. *Angew Chem Int Ed Engl* 57: 4143–4148
- [13] Zeymer C, Hilvert D (2018) Directed evolution of protein catalysts. *Annual Rev Biochem* 87: 131–157

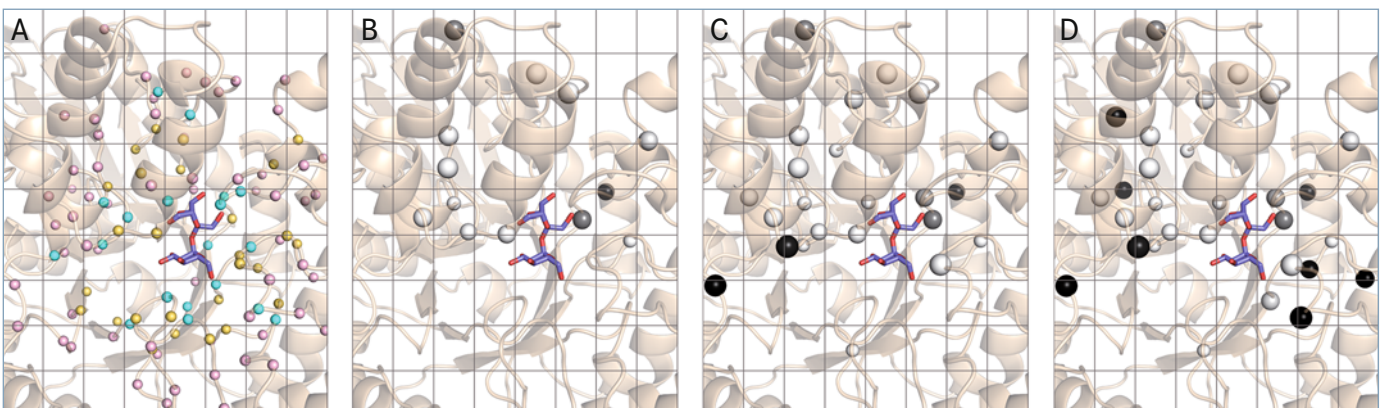
Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Patrick Pilak (links) und Arne Skerra

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Arne Skerra
 Lehrstuhl für Biologische Chemie
 Technische Universität München
 Emil-Erlenmeyer-Forum 5
 D-85354 Freising
 skerra@tum.de
 www.wzw.tum.de/bc



▲ **Abb. 3:** Schrittweise Verbesserung des Enzyms SmuA im Verlauf der systematischen Mutagenese durch „Schiffe Versenkens“. **A,** Die drei Schalen um das aktive Zentrum mit dem Substrat Saccharose: Schale 1 (cyan) < 4 Å (einschließlich Arg298 und Arg301); Schale 2 (gelb) 4–8 Å; Schale 3 (rosa) 8–12 Å. **B,** Mutierte Aminosäuren in der Phase I bestehend aus den Mutagenesezyklen 1 bis 3. **C,** Phase II: Zyklen 4 und 5. **D,** Phase III: Zyklen 6 und 7. Das C α -Atom jeder mutierten Aminosäure ist als Sphäre dargestellt. Die Aktivität der Enzymmutante ist durch deren Größe und das Produktverhältnis Isomaltulose/Trehalulose anhand der zunehmenden Graustufe illustriert.