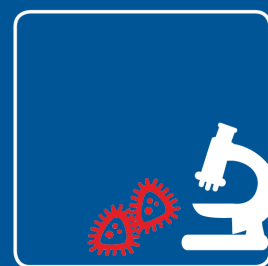


Martin Willemoes:

Øget udbytte af kasein ved low-fat mejeriproduktion

Increasing the recovery of casein in low-fat dairy production



Slutrapport

for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets ForskningsFond (MFF)

1. Projektets titel

Øget udbytte af kasein ved low-fat mejeriproduktion

Increasing the recovery of casein in low-fat dairy production

2. Projektleder

Martin Willemoës, Biologisk institut, Københavns Universitet, Ole Maaløes Vej 5, 2200 Kbh. N, tlf. 3532 2030, willemoes@bio.ku.dk

3. Øvrige medarbejdere

Dennis Kim Hansen og Jakob R. Winter

4. Finansieringskilder

Mejeribrugets ForskningsFond, Københavns Universitet og Chr. Hansen's.

5. Projektperiode

Projektperiode med MFF-finansiering: Januar 2015 – Medio april 2018

Evt. revideret: Januar 2015 – Ultimo juli 2018

6. Projektresume

DANSK: Formålet var at designe, fremstille og optimere et nyt enzym med en aktivitet der gør det muligt at fjerne O-bundne glykaner fra κ -kasein i en simpel et-trins proces. Dette vil (1) forøge fældningen af kasein i mejeriproduktionen med 10% og dermed formindske spildet og (2) forbedre tekturen af fedtfattige mælkeprodukter.

Bifidobacterium longum endo-a-N-acetylgalactosaminidase, EngBF, blev brugt som template-enzym til at designe og konstruere POGase-enzymet med henblik på udfældning af kasein ved at fjerne glycaner fra κ -kasein.

For at analysere EngBF-varianter med POGase-aktivitet udviklede vi et assay baseret på Morgan-Elson-kolorimetri, som detekterer 2-N-acetylgalactosamin (GalNAc) og brugte dette til påvisning af GalNAc opstået ved enzymatisk frigivelse af Gal β (1-3)GalNAc fra bovint kasein-glycomacropeptid forbehandlet med sialidase for at fjerne sialinsyreenheder. Analyse- og datahåndtering, som vi har beskrevet den, gør det muligt at bestemme de kinetiske parametre for K_M og k_{cat} .

Bortset fra de vigtigste katalytiske rester i EngBF, synes en aminosyrerest mere, Asp-682, at være afgørende for aktivitet. I krystalstrukturerne af både EngBF og lignende enzymer identificerede vi et ordnet

vandmolekyle i nærheden af denne rest. Det ordnede vandmolekyle koordineres af flere rester, herunder den katalytiske nukleofil og tre andre rester konserveret i GH101-enzymet. Den individuelle eliminering af disse rester, to histidin-sidekæder, havde kun beskeden virkning på de kinetiske parametre hos variantenzymet, men dobbeltvarianten, hvor begge rester var ændret, viste ca. 400 gange lavere aktivitet sammenlignet med vildtype EngBF. Denne observation understøtter betydningen af det ordnede vandmolekyle i aktiveringen af den katalytiske nukleofil i EngBF.

Intet kendt enzym kan hydrolysere $\alpha(2-3)$ sialideret core 1 glycan, Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-3)$ GalNAc, eller sialocore 1, som sidder på κ -kasein. Brug af en model af EngBFs aktive site i molekular docking og *in silico* aminosyreudskiftninger identificerede mulige ændringer i det aktive site for at gøre sialocore 1 til et substrat. Vi analyserede EngBF-varianter ændret i sidekæder, der ligger i det aktive site med hensyn til aktivitet over for Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-3)$ GalNAc siddende på fetuin og svarende til en gruppe af glykaner på κ -kasein. Blandt de analyserede varianter kunne en vises at have aktivitet overfor sialocore 1.

Den nye, designede enzymaktivitet virker ved at fraspalte sure (negativt ladede) sukkerrester på kasein-komponenten, κ -kasein. Et enzym med den beskrevne specificitet er blevet udviklet, men der tilbagestår en del arbejde med at hæve aktiviteten af enzymet, for at det kan finde kommerciel anvendelse i industrien.

ENGLISH:

To design, produce and optimize a new enzyme capable of removing O-glycans from κ -casein in a simple one-step process. This will (1) increase the precipitation of casein by 10% in the dairy production thereby reducing waste in cheese production and (2) improve the texture of low-fat dairy products.

Bifidobacterium longum endo- α -N-acetylgalactosaminidase, EngBF, served as a template enzyme to design and engineer the POGase enzyme aimed at precipitating casein by removing the glycans from κ -casein.

For the purpose of analysing EngBF variants with POGase activity, we developed an assay based on the Morgan-Elson colorimetric reaction that detects 2-N-Acetyl galactosamine (GalNAc) and applied this to the detection of GalNAc derived from the enzymatic release of Gal $\beta(1-3)$ GalNAc from bovine casein-glycomacropptide pre-treated with sialidase to remove sialic acid units. The devised assay and data handling method allows for the determination of the steady state kinetic parameters, K_M and k_{cat} .

Apart from the main catalytic apparatus performing the retaining mechanism of EngBF, an additional residue, Asp-682, appears to be crucial for activity. In the crystal structures of both EngBF and similar enzymes we identified an ordered water molecule in close proximity of this aspartic acid residue. The ordered water molecule is coordinated by several residues, including the catalytic nucleophile and three other residues conserved in GH101 enzymes. The individual elimination of the residues, two histidine side chains, showed only modest effects on the kinetic parameters of the mutant enzymes, but the double substituted enzyme showed greatly reduced activity of about 400-fold compared to wild type EngBF. This supports that the ordered water molecule plays an important role in activating the catalytic nucleophile in EngBF.

No enzyme has been reported to hydrolyze the $\alpha(2-3)$ sialidated core 1 glycan, Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-3)$ GalNAc or sialo-core 1 that resides on κ -casein. Using a computational model of the EngBF active site, molecular docking and single amino acid replacements we identified possible changes in the active site for making sialo-core 1 a possible substrate. We analysed EngBF variants altered in side chains that are part of the active site with respect to activity towards the Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal $\beta(1-3)$ GalNAc O-linked glycan present on bovine fetuin similar to those of κ -casein. Among the analyzed mutant enzymes, one was shown to cleave the sialo-core 1 present on bovine fetuin.

The new, designed enzyme functions by cleaving off negatively charged sugars from the casein component, κ -casein. An enzyme with the described specificity was developed, however, the activity of the enzyme needs to be increased in order for the enzyme to become commercially attractive.

7. Projektets formål

DANSK: At designe, fremstille og optimere et nyt enzym med en aktivitet der gør det muligt at fjerne O-bundne glykaner fra κ -kasein i en simpel et-trins proces. Dette vil (1) forøge fældningen af kasein i mejeri-produktionen med 10% og dermed formindske spildet og (2) forbedre teksturen af fedtfattige mælkeprodukter.

ENGLISH: To design, produce and optimize a new enzyme capable of removing O-glycans from κ -casein in a simple one-step process. This will (1) increase the precipitation of casein by 10% in the dairy production thereby reducing waste in cheese production, and (2) improve the texture of low-fat dairy products.

8. Projektets baggrund

Baggrunden for projektet var at imødekomme en mulighed for at udnytte den CGMP (bovine glyco-macropetid), der frigives til vollen ved chymosin-behandling af mælk, ved at fælde denne del af kasein sammen med resten af kaseinet ved at kløve de O-bundne glykaner. På denne måde vil de ca. 10% protein, som CGMP udgør af kaseinet, også kunne udnyttes sammen med resten af kaseinet. På starttidspunktet var det kendt, at en kombination af flere enzymer kunne udføre denne reaktion.

Det faktum, at der ikke eksisterede og stadig ikke er identificeret et enzym, der alene kan fælde kasein ved hydrolyse af glykanerne på κ -kasein, udgjorde en interessant opgave for anvendelsen af enzymdesign. Det enzym, vi valgte som grundlag for design af en ny enzymaktivitet, var delvist karakteriseret, og strukturen var kendt. Senere under projektet kom flere publikationer omhandlende enzymet eller tæt beslægtede enzymer.

Projektet har bidraget til forståelsen af EngBFs katalytiske mekanisme og har samtidig med at målet var at generere et enzym, der kunne kløve glykaner af κ -kasein og dermed binde et elongeret substrat, nemlig sialocore 1, givet en dybere indsigt i substratspecificiteten for EngBF.

I den oprindelige ansøgning er der beskrevet et selektions-/screeningssystem, som skulle have hjulpet i processen med at teste kandidatzymer, som søgtes forbedret med tilfældig mutagenese. Men da et enzym med bare en svag startaktivitet ikke var imellem de indledningsvist undersøgte enzymer blev tanken om at forbedre kandidatzymer med kunstig evolution opgivet.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

Delaktiviteter under projektet er oprettet og nedlagt igennem hele projektet. Her følger de originale delaktiviteter fra ansøgningen samt de delaktiviteter der forelå ved den sidste statusrapport (forår 2018).

A1: Fremstillingen af et selektionssystem

A2: Molekylær evolution af POGase-enzymet for videreudvikling af aktiviteten (forhøjelse af aktivitetsniveau)

B1: Fremstilling af ekspressionssystem til syntese af EngBF og varianter heraf.

B2: Udvikling af assay for bestemmelse af EngBF og POGase aktivitet.

C: Proof of concept for POGase i en mejerikontekst.

Nye delaktiviteter er kommet til siden:

A3: Optimering af produktion og oprensning af EngBF.

B3: Syntese af para-nitrophenol-baserede substrater til karakterisering af EngBF og POGase

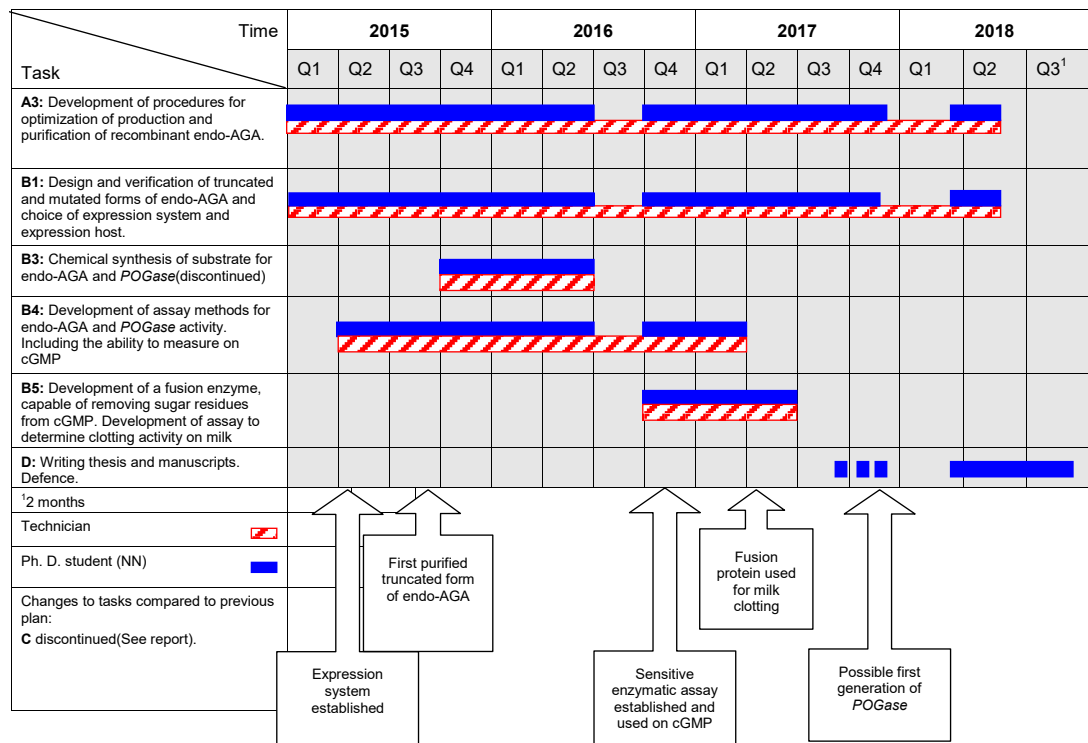
B4: Udvikling af enzymassay baseret på CGMP som substrat. *Erstatter B3 og B2.*

B5: Konstruktion af et fusionsenzym (Sialidase/EngBF) med POGase-aktivitet.

D: skrivning af manuskripter og ph.d.-afhandling.

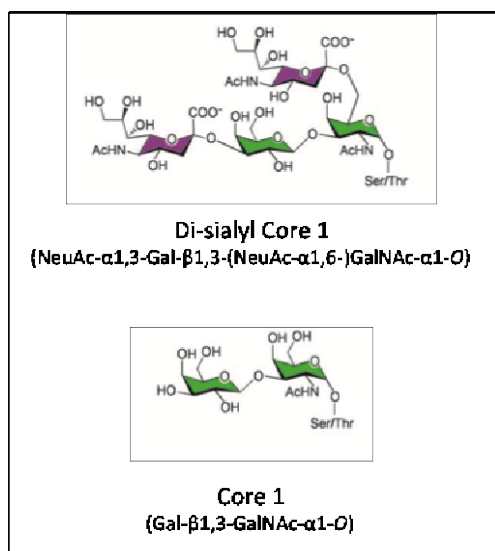
Følgende angivne delaktiviteter er terminerede i løbet af projektet: A1, A2, B3, B5

Her følger det nyeste Gantt kort fra første halvdel af 2018.



10. Projektets resultater

Projektets mål var at fremstille et enzym der kan kløve glykaner (sukkerkæder på proteiner) af κ -kasein, og derved forårsage udfældning af kaseinet til fremstilling af mælkeprotein til brug i low-fat mejeriprodukter. Udgangspunktet var, at der ikke fandtes en enzymaktivitet, der kunne kløve fuldlængde glykaner fra κ -kasein. Projektet tog afsæt i et enzym fra bakterien *Bifidobacterium longum*, EngBF, hvis aktivitet var den, der lå tættest på den ønskede, idet enzymet kløver core-1 glykaner, der ikke er substitueret med sialinsyrerester (sialo- og disialocore 1), som de er det på κ -kasein (Figur 1).

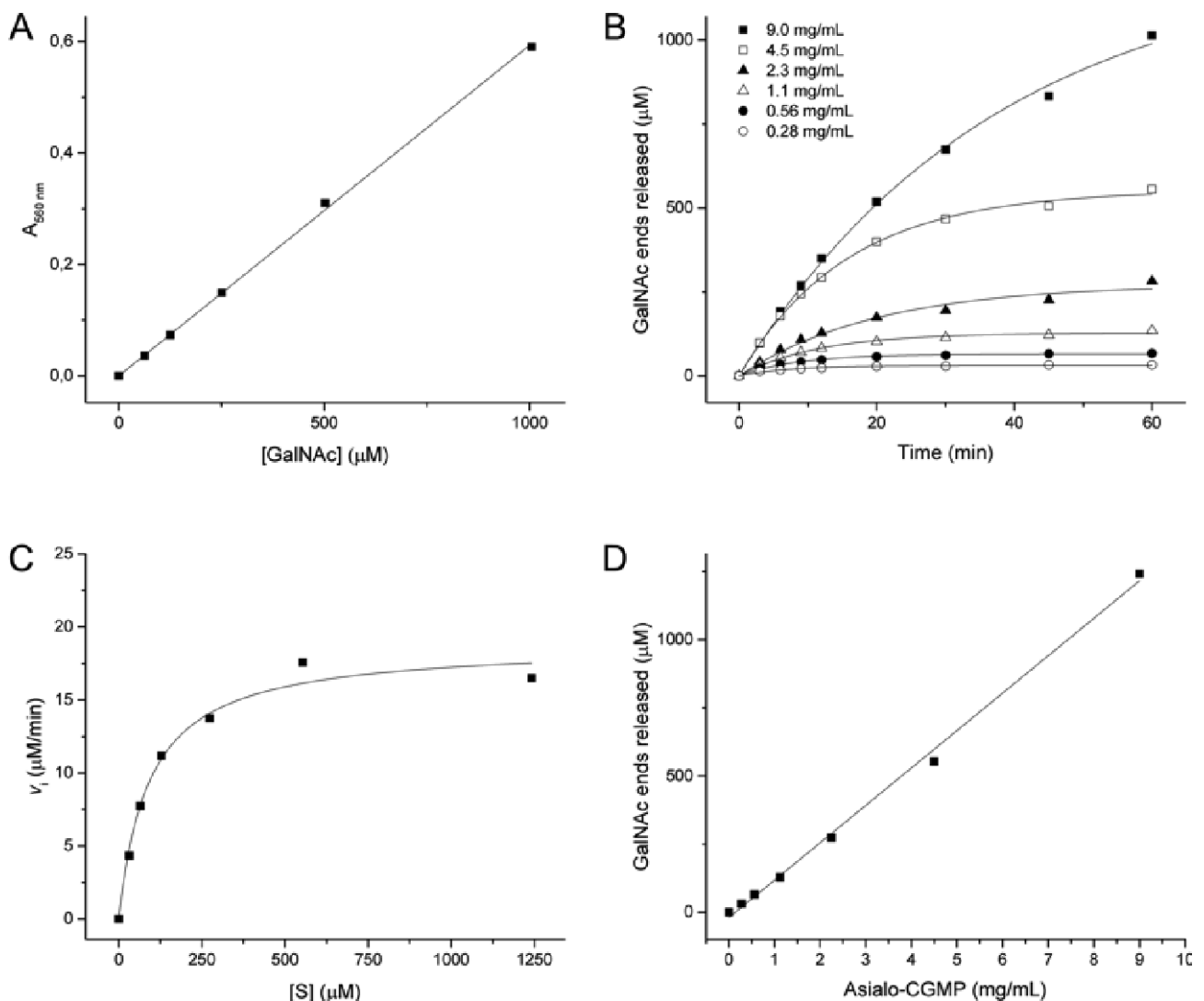


Figur 1. Sialinsyre substitueret core 1 og core 1 glykanen selv. Disse glykaner er forbundet til glykoproteinet via aminosyreresterne threonin og serin igennem en glykosid binding til disse aminosyreresters sidekædehydroxyl-gruppe.

Udvikling af et enzymassay til måling af EngBF-aktivitet og aktivitet af varianter med udvidet substratspecificitet

I første omgang blev der gjort forsøg på at eftergøre syntesen af kendte substrater for EngBF, hvis omsætning bestemmes baseret på frigivelse af kromoforen *para*-nitrophenolat, idet dannelsen af produktet ved spaltning af glykanen bundet til *para*-nitrophenol kan bestemmes spektrofotometrisk, umiddelbart imens reaktionen foregår. Det viste sig dog, at den kemiske syntese af dette substrat ikke var så simpel, som det fremgik af litteraturen. I hvert fald måtte vi indstille denne del af projektet efter ikke at være kommet videre trods flere måneders forsøg. Løsningen på problemet blev at etablere et nyt og bedre enzymassay end det vi indledningsvist satte os for at bruge.

Det nyudviklede enzymassay er baseret på en farverreaktion, Morgan-Elson, der er specifik for 2-aminoheksoser (pyranoser) der er substitueret 2-aminen med en N-acetyl-gruppe. Kemien i analysen frisætter 2-N-acetyl-aminohexosen, hvis den var yderligere forgrenet. Dvs. at enzymatisk frisatte glykaner, der er bundet til protein via 2-N-acetyl-aminohexosen, kan detekteres i dette assay – uagtet graden af substitution. Herudover har vi udviklet en analysemetode til at opnå de kinetiske parametre i enheder, som er direkte sammenlignelige med parametrene bestemt med andre typer af assays. Fremgangsmåden i analysen fremgår af Figur 2. Substratet for enzymreaktionen kan i det udviklede assay være et hvilket som helst opløseligt protein, der er substitueret med core 1-glykaner (Figur 1). Såfremt core 1-glykanerne er substitueret med sialinsyrerester, kan disse fjernes med enzymet sialidase, som vi også påviser i manuskriptet omhandlende det udviklede assay.



Figur 2. præsentation af de datatyper der skal til for at bestemme de kinetiske parametre for kløvningen af eksempelvis core 1 glykaner fra sialidase behandlet CGMP. A) viser en standardkurve for GalNAc-rester, som er den 2-N-acetyl-aminohexose, der bestemmes ved kløvning af O-glykaner fra CGMP. Standardkurven bruges til at beregne koncentrationen af frigjorte GalNAc rester ved enzymatisk aktivitet som vist i (B). B) Progresskurver med enkeltpunktsbestemmelser af GalNAc-dannelsen som funktion af reaktionstiden. De enkelte kurver er dannet af et fit af punkterne til ligning 1. Fra ligning 1 opnåes værdierne for koncentration af de for enzymet, faktisk tilgængelige GalNAc producerende glykaner samt hastighedskonstanten der indgår i beregningen af v_i . Det sidste er reaktionshastigheden ved den givne koncentration af tilgængelige GalNAc-glykaner. C) Mætningskurven fremstilles fra de fra (B) beregnede størrelser: [S] er den beregnede tilgængelige GalNAc-glykan koncentration på cGMP og v_i den beregnede reaktionshastighed. D) viser koncentrationen af faktisk tilgængelige GalNAc-glykaner som funktion af koncentrationen af sialidase behandlet CGMP. (Hansen, D. K., Winther, J. R., and Willemoës, M. (2018) Steady state kinetic analysis of Gal,β(1-3)GalNAc release catalysed by *Bifidobacterium longum* Endo-α-N-acetylgalactosaminidase with Bovine Casein-glycomacropeptide as a substrate, *Indsendt til Analytical Biochemistry*)

Data for progresskurverne (Figur 2B) blev analyseret ved hjælp af ligning 1

$$[P]_t = [S](1 - e^{-kt}) \quad (1)$$

Hvor $[P]_t$ er koncentrationen af produkt dannet til tiden t , fra en reaktion med den tilgængelige koncentration af glykaner, $[S]$, og hvor k er hastighedskonstanten for exponentialudtrykket. Her repræsenterer $[S]$

den totale tilgængelige koncentration af Gal β (1-3)GalNAc siddende på asialo-CGMP. Reaktionshastigheden, v_i , for hver progresskurve beregnes ved hjælp af den første afledte af ligning 1 til tiden $t=0$: ligning 2.

$$v_i = k[S] \quad (2)$$

Et fuldt datasæt for mætningskurven opnåes ved et antal sammenhængende datasæt for v_i og $[S]$ og beregnes ved hjælp af ligning 3.

$$v_i = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (3)$$

Hvor K_M er Michaelis-Menten konstanten og V_{\max} er den maksimale reaktionshastighed. Fra V_{\max} og enzymkoncentrationen tilstede i assayet, $[E]$, kan vi beregne det maksimale omsætningstal, k_{cat} , som vist i ligning 4.

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]} \quad (4)$$

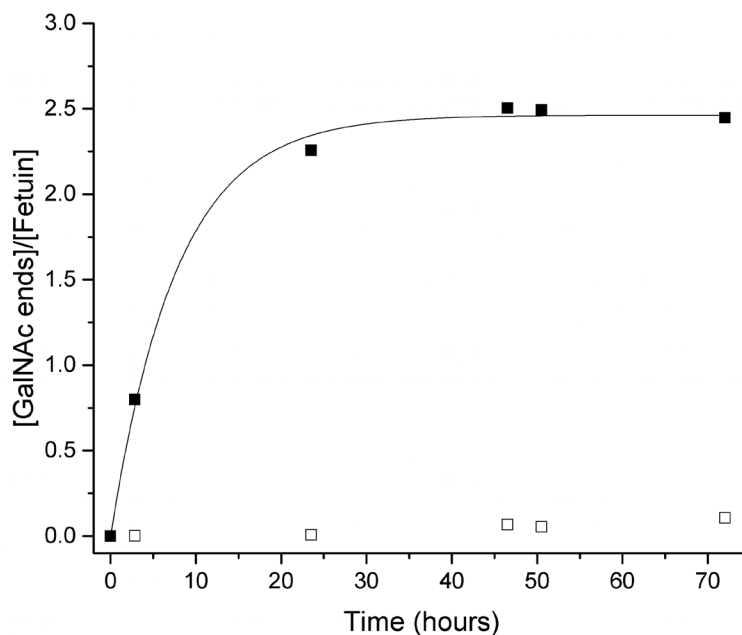
Undersøgelser af det aktive site i EngBF. Opdagelsen af et vigtigt katalytisk vandmolekyle.

Under gennemgangen af det aktive site i krystalstrukturer af EngBF i forbindelse med planlægningen af design af nye varianter blev vi opmærksomme på et vandmolekyle, der sad i et netværk udgjort af konserverede aminosyrerester, heriblandt den vigtigste af alle de katalytiske rester. Vi kunne altså genfinde den samme organisation af rester og vandmolekyle i enzymer fra andre bakterier og andre tætbeslægtede enzymaktiviteter. For at undgå at skabe utilsigtet ravage i det aktive site på enzymet under designprocessen, besluttede vi at undersøge vigtigheden af vandmolekylet og dets omgivelser. Disse undersøgelser blev udført af kandidatstuderende Zehui Dong.

Den individuelle eliminering af disse rester havde kun beskeden virkning på de kinetiske parametre hos variantenzymene, men dobbeltvarianten viste ca. 400 gange lavere aktivitet sammenlignet med vildtype EngBF. Denne observation understøtter betydningen af det ordnede vandmolekyle i aktiveringen af den katalytiske nukleofil i EngBF. Parallelt hermed foregår der computerkemiske beregninger på det aktive site og den undersøgte struktur i samarbejde med Ramon Crehuet (Institute of Advanced Chemistry of Catalunya, Spain).

Design af POGase-enzymet og verifikation af aktiviten overfor sialylcore 1-glykaner.

Hydrolysen af (2-3) sialinsyre substitueret core 1-glykan, Neu5Ac α (2-3)Gal β (1-3) GalNAc, eller sialocore 1, som bl.a. sidder på κ -kasein er en reaktion, for hvilken der ikke er identificeret nogen naturligt forekommende enzymaktivitet. En model af EngBFs aktive site genereret ved hjælp af krystalstrukturerne af EngBF og tæt beslægtede enzymer blev anvendt i molecular docking og identificerede mulige ændringer i det aktive site, der tillader bindingen af sialocore 1 i det aktive site. På baggrund af docking-analysen konstruerede vi EngBF-varianter og karakteriserede dem med hensyn til aktivitet over for sialocore 1. Til brug for disse analyser erstattede vi CGMP i assayet med fetuin da dette serum protein kun indeholder sialocore 1 og derfor er et meget homogent substrat (CGMP kan bære både sialocore 1 og disialocore 1, Figur 1). Blandt de analyserede varianter kunne en vises at have aktivitet overfor sialocore 1. Ved at lade enzymet reagere til ende med fetuin kunne vi bestemme støkiometrien mellem fetuin og sialocore 1, og vi fandt den til at være omkring 2,5 som også tidligere bestemt og publiceret af andre (Figur 4).



Figur 4. Enzymatisk bestemmelse af støkiomentrien for fetuin og sialocore 1 katalyseret af den opnåede EngBF variant. Sorte firkanter repræsenterer EngBF varianten og hvide firkanter repræsenterer vildtype EngBF (*manuskript under udarbejdelse.*)

Aktiviteten af EngBF varianten blev også verificeret kromatografisk, og det blev eftervist, at produktet fra kløvningen af fetuin var sialocore 1. Desværre er aktiviteten af enzymet med fetuin som substrat meget langsommere, 3400 gange lavere aktivitet, end med sialidase-behandlet fetuin, hvorfor den praktiske anvendelse af enzymet i en mejerikontekst er ikke-eksisterende. Det vil altså kræve yderligere udvikling af enzymet for at det kan anvendes i mejeriindustrien til chymosin-uafhængig fældning af kasein.

11. Afvigelser

11.1 Fagligt

I og med at der blev fremstillet et enzym der er i stand til at udføre den reaktion som projektet satte sig for at producere, er en stor og meget vigtig del af projektet gennemført trods det meget ambitiøse mål at udvide substratspecificiteten for EngBF. Det endelige mål, POGasen, til brug for mejerierne kunne derimod ikke nå at blive færdigudviklet indenfor projektperioden. Se endvidere pkt. 10.

11.2 Økonomisk

Ingen afvigelser.

11.3 Tidsplan

Projektets tidsplan er sammenlagt blevet forlænget med 7 måneder i forhold til ansøgningen pga. barselsorlov.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

Resultaterne fra projektet kan ikke direkte omsættes i mejeribrug, da det opnåede enzym kræver en yderligere optimering, før det kan anvendes industrielt.

Det nyudviklede enzymassay, der virker på naturlige substrater vil uden tvivl komme til at have indflydelse på forskningsfeltet, der omhandler EngBF og beslægtede enzymer herudover andre enzymer, der kløver 2-

N-acetyl-aminohexoser, såsom GalNAc og GlcNAc. Derudover vil undersøgelserne af det aktive site i EngBF bidrage til en forståelse af mekanismen af enzymet samt glykosidaser generelt.

Der overvejes nu nye applikationer for udviklede EngBF-variant med aktivitet overfor sialo-core 1.

13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Artikler i internationale tidsskrifter:

Nedenstående er manuskripter der enten er udkommet eller er under udarbejdelse.

Hansen, D.K., Winther, J.R., Willemoës, M. (2019) Steady state kinetic analysis of O-linked GalNAc glycan release catalyzed by endo- α -N-acetylgalactosaminidase. *Carbohydr Res.*, 480, 54-60.

Hansen, D. K., Dong, Z., and Willemoës, M. (----) Discerning the influence of a conserved structural water molecule upon the catalytic activity of *Bifidobacterium longum* Endo- α -N-acetylgalactosaminidase, *manuskript under udarbejdelse*.

Hansen, D. K., Dong, Z., Shuoker, B., Hachem, M. A., Winther, J. R., and Willemoës, M. (----) A single amino acid replacement confers sialo-core 1 reactivity of *Bifidobacterium longum* Endo- α -N-acetylgalactosaminidase, *manuskript under udarbejdelse*.

Artiklerne fremsendes til MFF i takt med at de publiceres.

Populærvidenskabelige artikler:

Nyt enzym til forbedring af kvaliteten af fedtfattige mælkeprodukter. Af Dennis K. Hansen, Caspar Elo Christensen, Jakob R. Winther og Martin Willemoës, Sektion for Biomolekylære Videnskaber, Biologisk Institut, Københavns Universitet. Mælkeritidende nr. 9, 2015.

Studerteropgaver:

Specialerapport: Zehui Dong. Assessment of the influence of a conserved structural water molecule on the catalytic ability of Endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. Biologisk Institut. Københavns Universitet. 2018.

Indlæg ved faglige kongresser, symposier etc.:

Poster og tilhørende korte præsentationer: 67th Mosbacher Kolloquium: Protein Design: From First Principles to Biomedical Applications.

Mødeindlæg:

Udvikling af nye enzymer til mejeriindustrien. Præsentation i samarbejde med Chr. Hansen ved Mejeriernes Forskningsdag 2017.

Andet:

Ph.d.-afhandling: Dennis K. Hansen. Structure-based mutational studies of Endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. Biologisk Institut. Københavns Universitet. 2018.

14. Bidrag til kandidat og forskeruddannelse

Projektets kerneaktivitet udgjorde et ph.d.-projekt udført af Dennis K. Hansen som forsvarede sin afhandling 1. nov. 2018. Herudover har projektet fostret et kandidatprojekt udført af biologi-bioteknologi-studerende Zehui Dong, som forsvarede sin afhandling 1. oktober 2018.

15. Nye kontakter/projekter

Videreudvikling af enzymet fortsætter i kontekst af en ny applikation i et projekt finansieret af DFF/FTP 2019.

16. Underskrift og dato

Projektet er formelt afsluttet, når projektleder og MFF-repræsentant (fx styregruppeformanden for den respektive styregruppe) har underskrevet slutrapporten.

Dato: 21. april 2020 Projektleders underskrift:

Dato: 21. april 2020 MFF-repræsentants underskrift:

