Enzymatische Entbitterung von Steviolglycosidgemischen

Dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation
von

Diplom-Biochemiker
Sebastian Christopher Spohner
geboren am 30.08.1987 in Frankfurt am Main

2016

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Czermak

2. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

3. Prüfer: Prof. Dr. Siegfried Schindler

4. Prüferin: Prof. Dr. Katja Sträßer

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie

Band 4

Sebastian Christopher Spohner

Enzymatische Entbitterung von Steviolglycosidgemischen

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Aachen 2016

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2016

Copyright Shaker Verlag 2016
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-4820-9
ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen
Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Meinem Lehrer und Mentor

Dr. Dietmar Scherr

Dass ich erkenne, was die Welt im Innersten zusammenhält.

– *Johann Wolfgang von Goethe*

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Für die Tabellen, Grafiken und Inhalte meiner Veröffentlichungen habe ich von Elsevier die Genehmigung für die Verwendung in dieser Arbeit erhalten.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Professor Dr. Peter Czermak, danke ich für die Betreuung, das angenehme Arbeitsklima, den gewährten Freiraum in der Gestaltung und Ausführung dieser Arbeit sowie die gewährten Möglichkeiten mich über das Promotionsthema hinaus fortzubilden. Herrn Professor Dr. Holger Zorn danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Frau Professor Dr. Katja Sträßer und Herrn Professor Dr. Siegfried Schindler danke ich dafür, dass sie sich bereiterklärt haben als Prüfer an meiner Disputation mitzuwirken.

Der Technischen Hochschule Mittelhessen und der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Finanzierung meiner Dissertation im Rahmen des kooperativen Promotionskollegs „Bioressourcen und Biotechnologie“ sowie dem Landesprogramm LOEWE – Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz für die Bereitstellung von Mitteln für meine Forschung und Fortbildung.

Den Firmen Denk Ingredients und Symrise danke ich für die Bereitstellung von Steviolglycosiden.

Meiner Frau Nathalie danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation.

Publikationen:

Spohner, S. C.; Müller, H.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*, Journal of Biotechnology, 202, 118-134, Februar 2015, DOI:10.1016/j.jbiotec.2015.01.027

Spohner, S. C.; Zahn, D.; Schaum, V.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Recombinant α-L-Rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of α-L-Rhamnose from Steviol Glycosides, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 122, 248-254, September 2015, DOI: 10.1016/j.molcatb.2015.09.009

Spohner, S. C.; Schaum, V.; Quitmann, H.; Czermak, P.: *Kluyveromyces lactis* an emerging tool in biotechnology, Journal of Biotechnology, 222, 104-116, Februar 2016, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.023

Spohner, S. C.; Czermak, P.: Heterologous expression of *Aspergillus terreus* fructosyltransferase in *Kluyveromyces lactis*, New Biotechnology, 33(4), 473-479, Juni 2016, DOI: 10.1016/j.nbt.2016.04.001

Spohner, S. C.; Czermak, P.: Enzymatic production of prebiotic fructooligo steviol glycosides, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 131,79–84, September 2016, DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.06.006

Konferenzbeiträge:

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Novel expression strategies of enzymes for usage in food technology, Journal of Biotechnology, 185, S24, European Biotechnology Congress 2014, Lecce, Italien, Mai 2014, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.07.082

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Reduction of Bitter Aftertaste in Stevia Extracts via Specific Enzymatic Conversion, Stevia Tasteful Convention 2014, Berlin, Juni 2014

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Enzymatic Bitterness Reduction of Steviol Glycosides, Proceedings of the 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Giessen, September 2014

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Enzymatische Entbitterung von Steviaextrakten, Chemie Ingenieur Technik 86(9), 1401-1402, ProcessNet-Jahrestagung 2014 und 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Aachen, Oktober 2014, DOI: 10.1002/cite.201450666

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Enzyme Membrane Reactor assisted de-rhamnosylation of steviol glycosides, Proceedings of the 8th Stevia Symposium 2015, Bonn, Januar 2015, ISBN 978-90-742-5329

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Enzymatic conversion of Stevia extracts: taste improved sweetener compositions, ACHEMA 2015, Frankfurt, Juni 2015

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Enzymatic de-rhamnosylation of steviol glycosides, Bioflavour 2015, Frankfurt, September 2015

Spohner, S. C.; Czermak, P.: Prebiotische Fructooligosteviolglykoside: enzymatische Transfruktosylierung von Steviolglykosiden, 45. Deutschen Lebensmittelchemikertag, Freising-Weihenstephan, September 2016

Spohner, S. C.; Czermak, P.: Enzymatic Production of Prebiotic Fructo Oligosteviol Glycosides, 2016 AIChE Annual Meeting, San Francisco, USA, November 2016

Patente:

Spohner, S. C.; Quitmann, H.; Czermak, P.: Improved natural sweetener, EP2957182 A1

Zusammenfassung

Steviolglycoside sind natürliche Süßstoffe aus der südamerikanischen Pflanze *Stevia rebaudiana*. Abhängig vom Grad der Glycosylierung haben hochreine Steviolglycoside einen langanhaltenden, bitteren oder lakrizähnlichen Nachgeschmack. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei miteinander kombinierbare enzymatische Möglichkeiten demonstriert, um diese Geschmacksnoten zu entfernen und die Akzeptanz bei Konsumenten zu erhöhen.

Obwohl Steviosid der am stärksten vertretene Süßstoff in *S. rebaudiana* Blättern ist, bestimmen andere Steviolglycoside den Geschmack des Gemischs maßgeblich. Die Rhamnosteviolglycoside Dulcosid A und B vermitteln den stärksten bitteren Nachgeschmack. In dieser Arbeit ist die spezifische Hydrolyse von Dulcosid A zu Rubusosid mittels *Aspergillus terreus* α-L-Rhamnosidase beschrieben. Die konstitutive Expression in *Pichia pastoris* und *Kluyveromyces lactis* erreichte hohe extrazelluläre Aktivitäten bis zu 17,6 und 30,6 $U \cdot ml^{-1}$. In einer 12-h-Biotransformation wurde das Dulcosid A in einem Blattextrakt vollständig hydrolysiert. Das erzeugte Enzympräparat zeigte keine hydrolytische Aktivität gegenüber anderen Steviolglycosiden. Dieser Prozess bietet daher einen vielversprechenden Ansatz für die industrielle, enzymatische Entbitterung von Steviolglycosidgemischen.

Fructooligosaccharide sind prebiotische und kalorienarme Süßstoffe, die 30–50% der Süßkraft von Saccharose aufweisen. Aufgrund ihrer prebiotischen Eigenschaften werden sie auch als funktionelle Lebensmittel eingesetzt; sie stimulieren beispielsweise das Wachstum und die Aktivität von Bifidobakterien im Verdauungstrakt. Fructooligosaccharide werden aus Chicorée extrahiert oder enzymatisch aus Saccharose hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wird die zweistufige, enzymatische Produktion von Fructooligosteviolglycosiden beschrieben. Die Steviolglycoside wurden initial mittels einer *Microbacterium saccharophilum* Fructosyltransferase transfructosyliert. In der zweiten Stufe wurde die Fructosylkette mittels rekombinant erzeugter *A. terreus* Fructosyltransferase verlängert. Die so erzeugten

Fructooligosteviolglycoside kombinieren die prebiotische Wirkung der Fructooligosaccharide mit der hohen Süßkraft der Steviolglycoside. Die Hefe *K. lactis* wurde verwendet, um die rekombinante *A. terreus* Fructosyltransferase mittels einer synthetisch, Codon-optimierten Version der bis dahin putativen β-Fructofuranosidase ATEG 04996 (XP 001214174.1) von *A. terreus* NIH2624 zu sekretieren. Die so erzeugte extrazelluläre Aktivität erreichte bis zu 986 $U \cdot ml^{-1}$. Dies übersteigt die bislang beschriebenen, maximal erreichten Aktivitäten für verschiedene Aspergillen.

Abstract

Steviol glycosides are naturally sweet constituents of *Stevia rebaudiana*, a plant species native to South America. But even highly purified steviol glycosides retain attributes such as bitterness, sweet aftertaste and liquorice flavour, which reflect their degree of glycosylation. Within this work two combinable enzymatic ways are presented to overcome these aftertastes that reduce the consumer acceptance.

Although stevioside is the most abundant sweetener in *S. rebaudiana* leaves, other steviol glycosides determine its taste. The steviol glycosides dulcoside A and dulcoside B both feature a terminal α-L-rhamnose residue and are the bitterest compounds in steviol glycoside mixtures. The present work demonstrates that *Aspergillus terreus* α-L-rhamnosidase specifically hydrolyses the glycosidic linkage of dulcoside A, and converts it to rubusoside. The constitutive expression of α-L-rhamnosidase in *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis* achieved high protein yields of up to 17.6 and 30.6 $U \cdot ml^{-1}$, respectively. During a 12-h biotransformation, the dulcoside A from crude leaf extracts was completely converted into rubusoside. There was no hydrolytic activity against dulcoside A analogues. This process therefore offers a promising approach for reducing the bitterness of steviol glycoside mixtures.

Fructo-oligosaccharides are prebiotic and hypocaloric sweeteners with 30–50% of the sweetness of sucrose. They are also used as functional food ingredients due to their prebiotic properties, i.e. they stimulate the growth and activity of lactobacilli and bifidobacteria in the digestive tract. Such compounds are normally extracted from chicory, but they can also be produced enzymatically from sucrose using fructosyltransferases. Here the enzymatic two-stage conversion of steviol glycosides to prebiotic fructo-oligosteviol glycosides is described. The steviol glycosides were initially transfructosylated by *Microbacterium saccharophilum* fructosyltransferase and in the second stage the fructosyl chain was elongated by *A. terreus* fructosyltransferase. The product combines the prebiotic functionality and palatability of fructo-oligosaccharides with the sweetness of native steviol

glycosides. The yeast *K. lactis* was used to secret a recombinant *A. terreus* fructosyltransferase. A synthetic codon-optimised version of the putative β-fructofuranosidase ATEG 04996 (XP 001214174.1) from *A. terreus* NIH2624 was secreted as a functional protein into the extracellular medium. Activities of up to 986 $U \cdot ml^{-1}$ were achieved in high-level expression experiments, which is better than previous reports of optimised *Aspergillus* spp. fermentations.

Abkürzungsverzeichnis ..... **XII**

Abbildungsverzeichnis ..... **XIV**

Tabellenverzeichnis ..... **XVI**

1. Einleitung **1**

2. Theoretischer Hintergrund **4**

2.1 *Stevia rebaudiana* 4

2.1.1 Zulassungshistorie 6

2.1.2 Rubusosid und Mogroside 9

2.1.3 Biosynthese der Steviolglycoside 10

2.1.4 Enzymatische Modifikation von Steviolglycosiden 14

2.2 Fructosyltransferasen 17

2.3 α-L-Rhamnosidasen 20

2.4 Vergleich der Proteinproduktion mit Bakterien und Hefen 21

2.5 Proteinsekretion 22

2.6 Post-translationale Modifikation 22

2.7 Gene mit optimierter Codon-Verwendung 25

2.8 Proteinproduktion mit *Pichia pastoris* 25

2.8.1 *P. pastoris* Expressionsstämme 26

2.8.2 Expressionsplasmide für *P. pastoris* 27

2.8.3 Promotoren für *P. pastoris* 29

2.9 Proteinproduktion mit *K. lactis* 30

2.9.1 Anwendung in der Lebens- und Futtermittelindustrie 32

2.9.2 Anwendung in der pharmazeutischen Industrie 33

2.9.3 Expressionsvektoren 33

2.9.4 Promotoren für *K. lactis* 36

2.10 Direkte Klonierung mittels homologer Rekombination 37

2.12 Genomengineering mittels CRISPR-Cas9 41

3. Material **44**

3.1 Plasmide 44

3.2 Stämme 45

3.3 Synthetische Oligonukleotide 46

3.4 Kulturmedien 49
3.5 Chemikalien....50
3.6 Geräte 50

4. Methoden 51
4.1 Transformationen 51
4.1.1 Transformation von *E. coli* zum Propagieren von Plasmiden....51
4.1.2 Transformation zur Klonierung mittels homologer Rekombination....51
4.1.3 Transformation von *P. pastoris* und *K. lactis* 52
4.2 Präparation von DNS....53
4.2.1 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*....53
4.2.2 Isolierung genomischer DNS von Hefen....53
4.2.3 DNS-Amplifikation mittels PCR 54
4.2.4 Fusions-PCR....55
4.2.5 DNS-Reinigung 56
4.2.6 Verdau zur Linearisierung von Plasmiden 56
4.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten....57
4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen....57
4.4 Zellaufschluss mit Glasperlen....57
4.5 Proteinquantifizierung....58
4.6 Enzymatische Proteindeglycosylierung....59
4.7 Aktivitätstest für α-L-Rhamnosidase 59
4.8 Aktivitätstest für β-Glucosidase 60
4.9 Aktivitätstest für β-Fructofuranosidase....60
4.10 Aktivitätstest für G^6-FFT-Aktivität....61
4.11 K_m-Wert mit pNP-α-L-Rha als Substrat....61
4.12 Enzymatische Derhamnosylierung von Steviolglycosiden....61
4.13 Enzymatische Produktion von Fructosyl-Steviolglycosiden....62
4.14 Präparative Produktion von FOSG aus RebA–F und Saccharose 62
4.15 Extraktion von Steviolglycosiden 63
4.16 Chromatographie....63
4.17 Fehlerbetrachtung 64

5. Ergebnisse und Diskussion 65
5.1 Klonierungsarbeiten....69
5.1.1 Plasmide zur Proteinproduktion mittels *P. pastoris*....71
5.1.1.1 pPLacZ-zeo 71

5.1.1.2 pPLacZ-kan 75
5.1.2 Plasmide zur Proteinproduktion mittels *K. lactis* 76
5.1.2.1 pKLAC2-kan 78
5.1.2.2 pPUCKL-kan 79
5.1.2.3 pKLacZ-kan 80
5.1.2.4 pKLacZ-αF*Sc*-kan 82
5.1.2.5 pKLacZ-zeo 83
5.1.2.6 pKLacZ1 85
5.1.3 Subklonierung von *A. terreus* RhaA in Expressionsplasmide 86
5.1.4 Subklonierung von *A. terreus* 1-FFT in Expressionsplasmide 87
5.1.5 Deletion des *OCH*1-Gens 89
5.2 Derhamnosylierung von Steviolglycosiden mittels α-L-Rhamnosidase 93
5.2.1 Proteinproduktion mittels *P. pastoris* X-33 94
5.2.2 Proteinproduktion mittels *P. pastoris* X-33 Δ*OCH*1 97
5.2.3 Proteinproduktion mittels *P. pastoris* SuperMan5 99
5.2.4 Proteinproduktion mittels *K. lactis* GG799 102
5.2.5 Enzymatische Deglycosylierung der α-L-Rhamnosidasen 104
5.2.6 Vergleich der Produktion der rekombinanten α-L-Rhamnosidase 106
5.2.7 Charakterisierung der rekombinanten *A. terreus* α-L-Rhamnosidasen 108
5.2.8 Bestimmung der K_m-Werte 113
5.2.9 Präparative Produktion der *A. terreus* α-L-Rhamnosidase 116
5.2.10 Derhamnosylierung von Steviolglycosiden 118
5.3 Transfructosylierung von Steviolglycosiden 121
5.3.1 Proteinproduktion mittels *M. saccharophilum* 123
5.3.2 Präparative Produktion der *M. saccharophilum* G^6-FFT 124
5.3.3 Charakterisierung der erzeugten *M. saccharophilum* G^6-FFT 126
5.3.4 Produktion rekombinanter *A. terreus* 1-FFT 128
5.3.5 Präparative Produktion der *A. terreus* 1-FFT 134
5.3.6 Charakterisierung der rekombinanten *A. terreus* 1-FFT 136
5.3.7 Transfructosylierung von Rubusosid 140
5.3.8 Transfructosylierung von Rebaudiosid A 143
5.3.9 Präparative Produktion von FOSG aus Rebaudiosid A 145
5.4 Zusammenfassung und Ausblick 149

6. Anhang 151

7. Literatur 169