

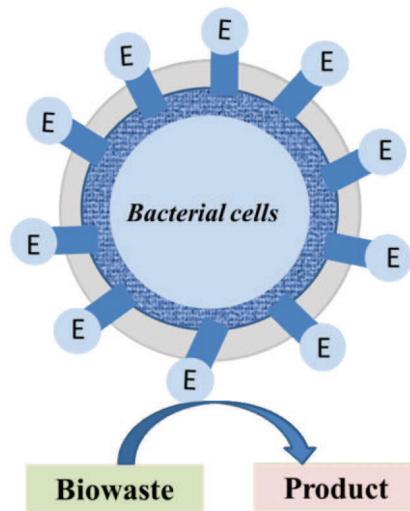
University of Natural Resources and Life Sciences

Department of Food Science and Technology



PhD Thesis

Production and surface display of heterologous proteins in *Lactobacillus plantarum* towards the production of health-promoting oligosaccharides



Hoang-Minh Nguyen

Supervisor:

Univ. Prof. Dietmar Haltrich

Dr. Thu-Ha Nguyen

Vienna, November 2016

Table of Contents

Abstract	i
Zusammenfassung	iii
Chapter 1	1
Introduction	
Chapter 2	47
Objectives and Dissertation overview	
Chapter 3	51
Display of β -mannanase and chitosanase on the <i>Lactobacillus</i> cell surface	
Chapter 4	77
Constitutive production and display of β -mannanase on the <i>Lactobacillus</i> cell surface	
Chapter 5	105
Heterologous expression of a recombinant β -galactosidase in <i>Lactobacillus plantarum</i>	
Chapter 6	127
From by-product to valuable components	
Chapter 7	151
Discussion	
Conclusion and Outlook	165
Acknowledgement	166
List of Publications	168

Abstract

Lactobacillus plantarum, a well-studied probiotic strain belonging to the group of lactic acid bacteria (LAB), is considered as a potential cell factory because of its GRAS (generally recognized as safe) status and long history of use in food applications. Its possible applications in biotechnology include *in situ* delivery of proteins to a host and the production of food-related enzymes. Currently, there has been an increasing interest in the use of food-related enzymes for converting an abundantly produced amount of bio-waste into value-added prebiotics or oligosaccharides. Economical, sustainable and smart use of these biocatalysts could involve genetic immobilization, where proteins of interest fused with suitable anchoring motifs are simultaneously synthesized and self-immobilized on the bacterial cell surface, and the resulting bacterial cells can then be easily obtained from the cultivation. Such genetic immobilization will offer a number of advantages due to its economic benefits, compared to immobilization using conventional methods.

The main objective of this thesis was to develop *L. plantarum* as a whole-cell biocatalyst towards the production of ‘prebiotic’ oligosaccharides. We investigated functionality of anchor motifs (lipoprotein Lp_1261 and cell wall anchor cwa2) for the display of heterologous proteins (β -mannanase and chitosanase) on the *Lactobacillus* cell surface. This study shows that mannanolytic and chitinolytic enzymes can be anchored efficiently to the cell surface of *L. plantarum* WCFS1 in active form, and *L. plantarum* chitosanase- and mannanase-displaying cells should be of interest for the production of potentially “prebiotic” oligosaccharides. Due to the limitations of the inducible expression system in food-related applications, constitutive promoters (Pgm and SlpA from *L. acidophilus* NCFM and *L. acidophilus* ATCC4356, respectively) were subsequently investigated for constitutive expression and display of β -mannanase on the *Lactobacillus* cell surface. In terms of surface localization and activity, our study indicated that the promoter slpA is well-suited for constitutive production and surface display of heterologous proteins in *L. plantarum*, providing an alternative for strong inducible promoter-based anchoring vectors.

In the second part of this thesis, the production of β -galactosidases, known as important enzymes in dairy industry, was studied for the formation of galacto-oligosaccharides (GOS). β -galactosidase from *L. reuteri* was successfully overexpressed in *Lactobacillus* hosts using the pSIP expression vectors. To further explore the potential of the pSIP system in general and the

use of lactobacilli for food-grade production of β -galactosidases in particular, the effects of various cultivation and induction conditions on gene expression were investigated. The over-expression of recombinant *L. reuteri* β -galactosidase in the food-grade *L. plantarum* WCFS1 strain was optimized, which is of interest for applications of this enzyme in the food industry. The results provide more detailed insight into these lactobacillal expression systems and confirm the potential of the pSIP system for efficient, tightly controlled expression of enzymes and proteins in lactobacilli. β -Galactosidase from *Streptococcus thermophiles* overexpressed in *L. plantarum* WCFS1 was also investigated for the valorization of whey, a significant waste from the dairy industry, for the production of GOS, which are of great interest for both human and animal nutrition. Thus, the efficient conversion of lactose in whey into GOS using an enzymatic approach will not only decrease the environmental impact of whey disposal, but also create additional value.

Zusammenfassung

Lactobacillus plantarum, ein ausführlich studierter probiotischer Stamm, gehört der Gruppe der Milchsäurebakterien (LAB) an und wird, aufgrund des GRAS (generally recognized as safe) Status und der langjährigen Anwendung in der Lebensmittelindustrie, als potentielle Zellfabrik in Betracht gezogen. Deren mögliche Anwendungen inkludieren *in situ* Zufuhr von Proteinen im Patienten und die Produktion von Enzymen für lebensmitteltechnologische Zwecke. Es besteht ein steigendes Interesse daran, solche Enzyme für die Umwandlung von Nebenprodukten der Lebensmittelindustrie in hochwertige Präbiotika oder Oligosaccharide zu verwenden. Genetische Immobilisierung kann hierbei zu einer ökonomisch vielversprechenden, nachhaltigen und intelligenten Verwendung solcher Biokatalysatoren beitragen. Dabei wird das gewünschte Protein mit einem Ankermotiv fusioniert, das daraus folgende Fusionsprotein exprimiert und auf der Bakterienoberfläche selbst immobilisiert. Die daraus resultierenden Bakterienzellen können einfach kultiviert und geerntet werden. Solche genetischen Immobilisierungen erweckten besonderes Interesse aufgrund der ökonomischen Vorteile im Vergleich zu konventionellen Methoden der Immobilisierung.

Die vorrangige Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, *L. plantarum* als ganzzellige Biokatalysatoren für die Produktion von potentiell präbiotischen Oligosacchariden einzusetzen. Wir untersuchten die Funktionalität der Ankermotive (Lipoprotein Lp_1261 und Zellwandanker cwa2) für die Präsentation der heterologen Proteine (β -Mannanase und Chitosanase) auf der *Lactobacillus* Zelloberfläche. Diese Studie zeigte, dass mannanolytische und chitinolytische Enzyme auf der Zelloberfläche von *L. plantarum* WCFS1 in aktiver Form verankert werden konnten und dass diese Chitosanase- und Mannanase-präsentierenden Zellen von Interesse für die Produktion von potentiell „präbiotischen“ Oligosacchariden sein sollten. Aufgrund der Limitierungen von induzierbaren Expressionssystemen in lebensmitteltechnologischen Anwendungen wurden konstitutive Promotoren (P_{gm} von *L. acidophilus* NCFM und SlpA von *L. acidophilus* ATCC4356) für konstitutive Expression und Präsentation von β -Mannanase auf *Lactobacillus* Zelloberflächen untersucht. Diese Studie zeigte, dass der Promotor SlpA für die konstitutive Produktion von auf der Oberfläche präsentierten heterologen Proteinen in *L. plantarum*, bezüglich Oberflächenlokalisierung und Enzymaktivität gut geeignet ist. Damit stellt er eine Alternative für Ankervektoren basierend auf induzierbaren starken Promotoren dar.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Produktion von β -Galactosidasen, wichtigen Enzyme der Molkereiindustrie, für die Bildung von Galactooligosacchariden (GOS) studiert. β -Galactosidasen von *L. reuteri* wurden in *Lactobacillus* unter Verwendung des pSIP-Expressionvektors erfolgreich überexprimiert. Um das Potential des pSIP Systems im Allgemeinen und der Verwendung von

Lactobacillen zur Produktion von lebensmittelauglicher β -Galactosidase im Besonderen weitergehend zu prüfen, wurden die Auswirkungen von Kultivierungs- und Induktionsbedingungen auf die Genexpression untersucht. Die Überexpression von rekombinanter *L. reuteri* β -Galactosidase im lebensmittelauglichem *L. plantarum* WCFS1 wurde optimiert. Die Ergebnisse gewähren einen detaillierten Einblick in diese Lactobacillen-basierenden Expressionsysteme und bestätigen das Potential des pSIP-Systems für effiziente, streng kontrollierte Expression von Enzymen und Proteinen in Lactobacillen. In *L. plantarum* WCFS1 überexprimierte *Streptococcus thermophilus* β -Galactosidase wurde auch für die wertsteigernde Aufbereitung von Molke, welche ein bedeutendes Abfallprodukt der Molkereiindustrie ist, zu Galactooligosacchariden (GOS) untersucht. GOS sind von großem Interesse, sowohl für menschliche wie auch tierische Ernährung. Eine effiziente Umwandlung von in Molke enthaltener Lactose in GOS verbessert somit nicht nur die Umweltverträglichkeit der Molkeentsorgung, sondern ermöglicht auch eine Wertsteigerung dieses Reststoffes.