

University of Groningen

Mutational and biochemical analysis of *Lactobacillus reuteri* glucansucrase enzymes

Meng, Xiangfeng

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:

2015

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

Citation for published version (APA):

Meng, X. (2015). *Mutational and biochemical analysis of Lactobacillus reuteri glucansucrase enzymes*. [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 Conclusies

Melkzuurbacteriën worden al eeuwenlang gebruikt om gefermenteerd voedsel te produceren, gebaseerd op hun vermogen om melkzuur en geur- en smaakstoffen te maken. Meer recent heeft het vermogen van melkzuurbacteriën om grote hoeveelheden exopolysachariden te produceren sterk de aandacht getrokken in verband met industriële toepassingen (15,16,20,30,39,46). α -Glucan homopolysachariden worden door glucansucrase enzymen van melkzuurbacteriën gesynthetiseerd uit sucrose, en gebruikt als biologisch verdikkingsmiddel in de voedingsmiddelenindustrie, als bloedplasmavervanger in medische toepassingen, en als scheidingsmatrix in wetenschappelijk onderzoek (15,16,20,30,39,46). Prebiotische oligosachariden gesynthetiseerd door glucansucrasen hebben groot potentieel als gezonde voeding ingrediënten (30,46,202). Echter, de α -glucanen geproduceerd door glucansucrasen zijn ook belangrijke pathogene factoren in tandbederf (57-59). Deze polysachariden helpen mondbacteriën zoals *Streptococcus mutans* om aan het tandoppervlak te hechten (65). Met behulp van specifieke remmers van glucansucrase enzymen zou tandbederf wellicht kunnen worden bestreden.

Glucansucrasen van melkzuurbacteriën worden geklassificeerd als glycoside hydrolase familie 70 (GH70) enzymen, met een katalytische $(\beta/\alpha)_8$ barrel eiwitstructuur zoals die ook gevonden wordt in de nauw verwante GH13 familie enzymen (204); deze enzymfamilies vormen samen clan GH-H (<http://www.CAZy.org>). Glucansucrase enzymen katalyseren drie reacties met sucrose als donorsubstraat, namelijk polysacharide synthese, oligosacharide synthese en sucrose hydrolyse, waarbij ze respectievelijk een groeiende glucaanketen, een oligosacharide of water als acceptorsubstraat gebruiken (24,28,29). De katalytische aminozuurresiduen van glucansucrasen (nucleofiel D1025, zuur/base katalysator E1063 en transitietoestand stabilisator D1136, *nummering volgens GTF180*) zijn identiek, maar deze enzymen katalyseren de synthese van een variatie aan α -glucanen (114). Afhankelijk van de aanwezige glycosidische bindingen worden α -glucanen onderverdeeld in vijf groepen: i) dextranen met vooral $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ bindingen; ii) mutanen met vooral $(\alpha 1 \rightarrow 3)$ bindingen; iii) alternanen met alternerende $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ en $(\alpha 1 \rightarrow 3)$ bindingen; iv) reuteranen met vooral $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ bindingen; v) α -glucanen met $(\alpha 1 \rightarrow 2)$ vertakkingen. De fysisch-chemische eigenschappen van α -glucanen zijn sterk afhankelijk van hun structuur, vooral van de aanwezige bindingstypen, de

vertakkingsgraad en hun moleculaire afmetingen (28,29,164). In het lopende onderzoek aan glucansucrase enzymen wordt beoogd detailkennis over deze enzymen te verwerven op basis waarvan het mogelijk wordt om op rationele wijze glucansucrasen te modificeren zodat ze α -glucanen met gewenste eigenschappen synthetiseren. De glucansucrasereactie wordt geïnitieerd doordat het enzym eerst het donorsubstraat sucrose splitst waarbij een glucosyl-enzym intermediair wordt gevormd. In de tweede stap van de reactie wordt de glucoseseenheid overgedragen op het niet-reducerende uiteinde van een acceptorsubstraat met behoud van de α -anomere configuratie. Er is voorgesteld dat de reactie specificiteit en bindingstype specificiteit van glucansucrasen wordt bepaald door het gebruikte acceptorsubstraat en door de manier waarop het acceptorsubstraat bindt in de tweede stap van de reactie (24,28,114,151). Al voordat gedetailleerde kristalstructuren van glucansucrase eiwitten beschikbaar waren zijn aminozuurresiduen in geconserveerde glucansucrasegebieden geïdentificeerd die belangrijk zijn voor hun bindingstype en reactie specificiteit, met name door vergelijking van glucansucrasen met in detail gekarakteriseerde enzymen uit de verwante GH13 familie (amylosucrasen, α -amylasen) (88,151). Op basis van de vergelijking van aminozuursequenties konden bijvoorbeeld residuen worden geïdentificeerd die volgen op het aminozuur dat dient als transitietoestandstabilisator en die als mogelijke acceptorbindingplaatsresiduen functioneren; uit mutagenese studies bleek vervolgens dat deze residuen inderdaad de bindingstype specificiteit (mede) bepalen (86,88,109,150,151,165,166). Recentelijk is de kristalstructuur van het GTF180- Δ N eiwit opgehelderd waarbij bleek dat dit glucansucrase eiwit een verrassende en nieuwe domein organisatie heeft (100). De polypeptide keten van GTF180- Δ N volgt een U-vorm resulterend in een tertiaire eiwitstructuur met in totaal vijf domeinen (domein A, B, C, IV en V). Met uitzondering van domein C worden alle andere domeinen gevormd uit twee polypeptideketen fragmenten van zowel de N- als C-terminale eiwit uiteinden. De katalytische kern van GTF180- Δ N bestaat uit de domeinen A, B en C, met sterke verwantschap aan die van familie GH13 enzymen. Glucansucrasen hebben twee unieke extra domeinen (IV en V) gekoppeld aan de katalytische eiwitkern die ontbreken in familie GH13 enzymen. Analyse van de kristalstructuur van GTF180- Δ N gecomplexeerd met het acceptorsubstraat maltose bevestigde dat de eerder geïdentificeerde aminozuurresiduen inderdaad betrokken zijn in het vormen van de

acceptorsubstraatbindingsplaatsen +1 en +2 (100). Maar ook verschillende andere residuen blijken betrokken te zijn bij het vormen van deze acceptorsubstraatbindingsplaatsen. Deze andere residuen liggen voornamelijk in domein B en waren nog niet geïdentificeerd in eerdere mutagenese studies gebaseerd op sequentievergelijkingen vanwege de verrassende en nieuwe opvouwing van glucansucrase eiwitten (U vorm).

In dit PhD project hebben we het glucansucrase polysaccharide syntheseproces in meer detail bestudeerd door de structuren van de initieel door het GTFA enzym van *Lactobacillus reuteri* 121 uit sucrose gevormde oligosacchariden te karakteriseren. Ook hebben we het glucansucrase GTF180 enzym van *Lactobacillus reuteri* 180 onderworpen aan semi-rationele mutaties om de structurele determinanten voor zijn bindingstype specificiteit en reactie specificiteit op te helderen. De resultaten geven nieuwe inzichten in de structuur-functie relaties van glucansucrase enzymen; met behulp van gemuteerde glucansucrase enzymen konden ook nieuwe α -glucanen met andere structuren gesynthetiseerd worden uit sucrose.

Initieel gevormde gluco-oligosacchariden door *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase GTFA

Het was grotendeels onduidelijk gebleven hoe glucansucrase enzymen via gluco-oligosaccharide intermediären hun polysacchariden synthetiseren uit sucrose. De vraag was ook: blijft de groeiende glucaanketen hierbij gebonden aan het enzym (processief mechanisme) of komt deze na vrijwel elke stap vrij (niet-processief mechanisme)? Daarom hebben we de initieel door het *L. reuteri* 121 GTFA enzym gevormde gluco-oligosacchariden gekarakteriseerd, en wel bij verschillende sucrose concentraties (Hoofdstukken 2 en 3). De initieel gevormde gluco-oligosaccharide producten zijn gekarakteriseerd met MALDI-TOF-MS en 1D/2D NMR spectroscopie (Hoofdstuk 2). Uit deze gedetailleerde structuuranalyse bleek dat GTFA in de eerste 6 uren van de incubatie vooral lineaire oligosacchariden synthetiseerde uit sucrose door verlenging van sucrose met een keten van glucose residuen met alternerende ($\alpha 1 \rightarrow 4$) en ($\alpha 1 \rightarrow 6$) bindingen. Deze producten hadden geen lineaire ($\alpha 1 \rightarrow 6$) bindingen. Dit is de eerste beschrijving van een glucansucrase enzyme dat alternerend ($\alpha 1 \rightarrow 4$) en ($\alpha 1 \rightarrow 6$) bindingen introduceert. De structurele basis hiervoor ligt waarschijnlijk

in de speciale acceptorsubstraatbindingsplaatsen van GTFA en zal verder bestudeerd worden in vervolgonderzoek. Alternansucrase (ASR) van *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 synthetiseert ook alternerende bindingstypen, maar met ($\alpha 1 \rightarrow 3$) en ($\alpha 1 \rightarrow 6$) bindingen (52). Malto-oligosachariden bleken relatief slechte donorsubstraten te zijn voor GTFA, alleen korte oligosachariden (DP<10) werden gevormd. Malto-oligosachariden bleken echter wel effectieve acceptorsubstraten te zijn, met sucrose als donorsubstraat. Dit onderzoek resulteerde in nieuwe inzichten in het mechanisme van α -glucan synthese gekatalyseerd door glucansucrasen. De nieuwe oligosachariden geproduceerd door GTFA, met alternerende ($\alpha 1 \rightarrow 4$) en ($\alpha 1 \rightarrow 6$) bindingen, die resistent zijn tegen α -amylase afbraak, kunnen wellicht toegepast worden als prebiotica.

De effecten van donorsubstraat concentratie op de synthese van α -glucanen werd onderzocht door incubatie van verschillende sucrose concentraties met GTFA- Δ N van *L. reuteri* 121 (Hoofdstuk 3). De oligosacharide versus polysacharide product verhouding was direct proportioneel met de sucrose concentratie, terwijl de bindingstype verdeling in de polysachariden geproduceerd bij verschillende sucrose concentraties gelijk bleef. Deze resultaten laten zien dat productgrootte (oligosachariden versus polysachariden), maar niet de bindingstype verdeling, kinetisch gecontroleerd wordt door het GTFA- Δ N glucansucrase enzym. Isolatie en karakterisering van de oligosachariden die gesynthetiseerd werden bij een hoge sucrose concentratie (1.0 M sucrose) resulteerde in een gedetailleerd schema van de groeiende oligosacharideketens op weg naar polysachariden (Hoofdstuk 3).

Structurele basis voor polysacharide synthese door *Lactobacillus reuteri* 180 glucansucrase GTF180

De precieze rol van domein V in glucansucrasen van GH70 familie enzymen was onduidelijk gebleven. In eerdere onderzoeken zijn verschillende aminozuursequentiesegmenten geïdentificeerd in het domein V gebied die betrokken bleken te zijn bij glucaanbinding (28,70,89,90,93,105,117). Vergelijkingen van kristalstructuren van verschillende glucansucrase-eiwitten lieten echter zien dat domein V flexibel is en verschillende posities kan innemen (48,100,103,106). Domein V zou polysacharide synthese kunnen faciliteren door de groeiende glucaanketen naar en van het actieve centrum te bewegen (102,106).

In Hoofdstuk 4 rapporteren we de effecten van het compleet verwijderen van domein V. De GTF180- Δ N en GTF180- Δ N Δ V enzymen synthetiseerden polysachariden met identieke structuren; domein V bepaalt dus niet de glucansucrase bindingstype specificiteit. GTF180- Δ N Δ V beschikte slechts over een minimale polysacharide synthese activiteit. Mutaties dichtbij de acceptorbindingsplaatsen in domein B (L940E, L940F) van GTF180- Δ N resulteerden in een aanzienlijke toename van de hoeveelheid polysacharide (ongeveer 2x zoveel) (Hoofdstuk 5) (118). De introductie van dezelfde mutaties in GTF180- Δ N Δ V herstelde de polysacharide synthese tot het niveau van GTF180- Δ N, maar niet tot dat bij dezelfde mutanten van GTF180- Δ N. Polysacharide synthese door GTF180 wordt dus bepaald door deze acceptorbindingsplaatsen en door domein V, respectievelijk als nabij- en verder weg gelegen bindingsplaatsen voor de (groeïende) polysacharideketens.

Bindingstype specificiteit van het *Lactobacillus reuteri* 180 glucansucrase GTF180 enzym

Analyse van de beschikbare kristalstructuur van GTF180- Δ N gecomplexeerd met maltose als acceptorsubstraat resulteerde in identificatie van de aminozuren die vorm geven aan de acceptorbindingsplaatsen +1 en +2; deze residuen bepalen naar verwachting de bindingstype specificiteit van GTF180- Δ N (100,114). Bij de +1 bindingsplaats maakt N1029, naast de geconserveerde katalytische residuen, directe en indirecte waterstofbruggen met de +1 C4 en C3 hydroxyl groepen; D1028 vormt een waterstofbrug via water met de +1 C4 hydroxyl groep, en residuen van domein B (L938, L940, A978 en L981) vormen de groef dicht bij de +1 bindingsplaats. W1065 heeft een stapelingsinteractie met de glucosyleenheid bij de acceptorbindingsplaats +2. Van de residuen S1137, N1138, A1139, Q1140 en D1141, meteen volgend op de transitietoestandstabilisator (D1136), is aangetoond dat ze belangrijk zijn voor de bindingstypespecificiteit (86,88,100,109,114,150,151,165,166), allen gelokaliseerd aan één kant van de +2 glucosyleenheid van maltose. Aan de andere kant van de +2 glucosyleenheid vormen residuen D1085, R1088 en N1089 van α -helix 4 een indirecte waterstofbrug met de +2 C2 hydroxylgroep via hetzelfde watermolecuul. De functies van specifieke domein B residuen zijn niet geanalyseerd in mutagenese studies voordat de eiwitkristalstructuren beschikbaar waren. In dit proefschrift hebben we met een semi-rationale mutagenese aanpak de effecten van mutaties in

aminozuurresiduen dichtbij de +1 en +2 acceptorbindingsplaatsen op de bindingstype specificiteit van de gesynthetiseerde producten onderzocht (Hoofdstukken 5, 6 en 7).

Producten van L940 mutanten van wild-type GTF180- Δ N hadden allemaal een hoger percentage (α 1 \rightarrow 6) bindingen en een lager percentage (α 1 \rightarrow 3) bindingen (Hoofdstuk 5). Mutant L940W niet bleek helemaal geen (α 1 \rightarrow 3) bindingen te vormen, maar synthetiseerde een kleiner en lineair glucaan met alleen (α 1 \rightarrow 6) bindingen. Moleculaire modeleringstudies lieten zien dat de introductie van het grote aromatische aminozuur tryptofaan op positie 940 in de acceptorsubstraatbindingsgroef resulteerde in een gedeeltelijk blokkade en verhinderde dat het isomalto-oligosacharide acceptorsubstraat kon binden in een favoriete oriëntatie voor de vorming van (α 1 \rightarrow 3) bindingen. L938 mutanten (behalve L938F) toonden een gewijzigde bindingstype specificiteit met voornamelijk een toename van (α 1 \rightarrow 6) bindingen (Hoofdstuk 6). Residue A978 speelde ook een belangrijke rol in de synthese van vertakkingen. Mutaties van A978 tot grotere zijketenresiduen (L, P, F of Y) resulteerde in een afname van vertakkingen (~ 50%) en een overeenkomstige toename van (α 1 \rightarrow 3) bindingen in de hoofdketen (Hoofdstuk 6). De afgenomen synthese van vertakkingen is waarschijnlijk te wijten aan sterische hindering door grote residuen in de groef boven de +1 acceptorbindingsplaats. Met alle D1028 mutanten zagen we een duidelijke toename van (α 1 \rightarrow 6) bindingen in de gesynthetiseerde polysachariden (Hoofdstuk 6). De D1028Y en D1028W mutanten synthetiseerden ~ 50% minder vertakkingen vergeleken met wild-type GTF180- Δ N, wat eveneens was waargenomen voor de A978 mutanten. N1029 mutanten (behalve N1029Y) synthetiseerden slechts minimale hoeveelheden polysacharide, welke voornamelijk (α 1 \rightarrow 3) bindingen bevatten (meer dan 50%) (Hoofdstuk 6).

Om de effecten van mutaties in residuen D1085, R1088 en N1089 op de bindingstype specificiteit te bestuderen, werden deze drie residuen gemuteerd tot de overeenkomstige residuen die aanwezig zijn op deze posities in verschillende andere glucansucrasen, geïdentificeerd door aminozuursequentie vergelijkingen (Hoofdstuk 7). Ook werden deze 3 residuen onderworpen aan random mutagenese, om hun individuele rol in bindingstype specificiteit te onderzoeken (Hoofdstuk 7). De resultaten toonden aan dat alle gecombineerde mutanten, en de

enkelvoudige D1085 en R1088 mutanten, polysachariden met een hoger vertakkingspercentage produceerden (van 15% naar 22%). Ook introduceerden zij een kleine hoeveelheid ($\alpha 1 \rightarrow 4$) bindingen (maximaal 5%) in de geproduceerde polysachariden. Enkelvoudige mutaties lieten zien dat D1085 en R1088, maar niet N1089, verantwoordelijk zijn voor de waargenomen veranderingen in bindingstype specificiteit.

Onze resultaten tonen aan dat de bindingstype specificiteit van glucansucrase GTF180- ΔN wordt bepaald door residuen uit verschillende regionen die samen de acceptorsubstraatbindingsplaats omgeven, niet alleen van domain A maar ook van domain B. Residuen die de +1 en +2 acceptorbindingsplaatsen omgeven zijn van essentieel belang voor de bindingstype specificiteit van het enzym en blijken verschillende rollen te spelen. Onze studies verschaffen nieuwe inzichten in de structuur-functie relatie van glucansucrasen en tonen duidelijk aan dat de productie van op maat gemaakte α -glucanen door mutante glucansucrase mogelijk is. α -Glucanen met potentieel verschillende fysisch-chemische eigenschappen [met 25% tot 100% ($\alpha 1 \rightarrow 6$) bindingen en 0% tot 22% vertakkende ($\alpha 1 \rightarrow 3$) bindingen] werden geproduceerd door GTF180 en de hiervan afkomstige mutanten. De nieuwe eigenschappen van deze α -glucanen verdienen verder onderzoek en kunnen wellicht resulteren in industriële toepassingen.

Bepaling van de reactie specificiteit van het *Lactobacillus reuteri* 180 glucansucrase GTF180

De relatieve balans van de drie reacties (reactie specificiteit) gekatalyseerd door glucansucrasen kan beïnvloed worden door enzymengineering en doormodificaties in de enzymreactiecondities. In dit proefschrift bestudeerden wij de effecten van specifieke mutaties in GTF180- ΔN op de reactie specificiteit door de percentages sucrose gebruikt voor polysacharide synthese, oligosacharide synthese en hydrolyse te bepalen. Deletie van domein V, een vermoedelijk glucaanbindingsdomein, resulteerde in gereduceerde polysacharide synthese en een overeenkomstige toename in oligosacharide synthese (Hoofdstuk 4). Naast de verandering in bindingstype specificiteit vertoonden de L940E en L940F mutanten ook een significante toename van polysacharide synthese (tot ongeveer 30% sucrose) (Hoofdstuk 5). De sterkste reductie in hoeveelheid gebruikt sucrose

voor hydrolyse werd waargenomen met L940W (slechts 4.3%) vergeleken met 23.9% voor wild-type GTF180-ΔN. Aangenomen wordt dat de tryptofaanzijketen verantwoordelijk is voor de toename van de hydrofobiciteit van het actieve centrum en/of de gedeeltelijke afscherming van het covalente tussenproduct tegen een aanval door water. Gezien zijn gereduceerde hydrolyse en polysaccharide synthese is de L940W mutant zeer efficiënt in de synthese van isomalto-oligosacchariden uit sucrose; mogelijk kan dit mutante enzym gebruikt worden voor de commerciële productie hiervan. Mutaties in N1029 resulteerden in een sterke toename in de hoeveelheid sucrose die gebruikt wordt voor hydrolyse. De directe waterstofbrug van N1029 met de +1 C4 hydroxyl groep blijkt dus essentieel te zijn voor acceptorsubstraatbinding, en dus voor transglycosylerings activiteit.

Concluderend, met enzymengineering kunnen we de reactie specificiteit van GTF180 verschuiven naar polysaccharide synthese, oligosaccharide synthese of hydrolyse. Door manipulatie van de reactie specificiteit van glucansucrasen kan een efficiëntere productie van specifieke polysacchariden of oligosacchariden gerealiseerd worden resulterend in verschillende toepassingen.

Conclusies en toekomstvisie

In dit proefschrift werd een semi-rationele mutagenese benadering toegepast voor de modificatie van het glucansucrase GTF180 enzym, mogelijk gemaakt door de recentelijk opgehelderde kristalstructuur van het enzym. Dit stelde ons in staat om de essentiële gebieden voor bindingstype specificiteit en reactie specificiteit in het glucansucraseeiwit te identificeren. De individuele rollen van functionele aminozuren in bindingstype specificiteit en reactie specificiteit, en in enzymactiviteit, werden in detail bestudeerd. Verschillende residuen van domein B (L938, L940 en A978) en residuen van domein A (D1028, N1029, D1085, R1088 en N1089) bleken belangrijk te zijn voor bindingstype specificiteit. Residuen A978, D1028, D1085 en R1088 bleken betrokken te zijn bij de vorming van vertakkingen. Residuen N1029 en L981 zijn essentieel voor de transglycosyleringsreactie. De verkregen resultaten verschaffen nieuwe inzichten in de structuur-functie relaties van glucansucrase GTF180, met name in zijn bindingstype specificiteit, reactie specificiteit en enzymactiviteit. Gezien de sterke onderlinge verwantschap van glucansucrasen zullen de geïdentificeerde

residuen dezelfde belangrijke rol spelen in (vrijwel) alle glucansucrase enzymen. Engineering van deze residuen maakt het mogelijk om de synthese van nieuwe α -glucanen te optimaliseren. Het uiteindelijke doel is het rationeel ontwerpen van glucansucrase enzymen die op maat gemaakte α -glucanen produceren, dus met gewenste structuren en eigenschappen. In toekomstig onderzoek kan door opheldering van kristalstructuren van glucansucrase eiwitten gecomplexeerd met langere ketens van oligosachariden ook andere eiwitgebieden geïdentificeerd worden die belangrijk zijn voor polysacharide synthese en bindingstype specificiteit. Ook met moleculaire dynamica studies zouden we kunnen proberen de synthese van polysachariden uit sucrose beter te begrijpen. Dergelijke studies zouden ook nieuwe inzichten kunnen geven voor het ontwerpen van glucansucrase enzymen die specifieke en gewenste α -glucanen synthetiseren, en kunnen helpen bij de zoektocht naar remmers van glucansucrasen, met als doel tandbederf te bestrijden. Tot nu toe is het onbekend gebleven welke glucansucrase enzymeigenschappen de moleculaire massa van de polysacharide producten bepalen, hier ligt nog een duidelijke wetenschappelijke uitdaging.

Dit proefschrift laat zien dat met behulp van enzymengineering van glucansucrases nieuwe α -glucanen geproduceerd kunnen worden, die andere (ratios van) glycosidische bindingen bevatten, alsmede variërende hoeveelheden vertakkingen. De fysisch-chemische eigenschappen van deze α -glucanen moeten nog worden onderzocht om hun structuur-functie relaties op te helderen. De structuren en potentiële prebiotische activiteiten van de nieuwe oligosachariden geproduceerd door glucansucrasen moeten nog systematisch gekarakteriseerd en geëvalueerd worden. Gebaseerd op de informatie die in zulke studies verkregen wordt zouden eventueel diverse industriële toepassingen gerealiseerd kunnen worden. Wel dient er hier op gewezen te worden dat de (thermo)stabiliteit van glucansucrase enzymen nog moet worden verbeterd; de beschikbaarheid van kristalstructuren maakt het mogelijk om dit via een computational-design benadering te realiseren (240).

Glucansucrasen zijn actief met een relatief groot aantal acceptorsubstraten zoals benzenoïden, flavonoïden en steroïden (142,201). De acceptorreactie van glucansucrasen is gebruikt voor de glycosylering van organische moleculen om hun oplosbaarheid, stabiliteit, smaak en activiteit te verbeteren, gebruikmakend

van het goedkope glucose donorsubstraat sucrose (143,145-147,149). Deze acceptorreacties dienen verder geoptimaliseerd te worden, met behulp van enzymengineering en reactieengineering. Zulke studies zijn nu gaande in ons laboratorium.

Sucrose is het enige donorsubstraat voor glucansucrasen, resulterend in overdracht van een glucosylresidu. Verschillende sucroseanalogen zijn gesynthetiseerd, waarin het glucosylresidu van sucrose is vervangen door alternatieve glycosyleenheden (241-243). Deze sucroseanalogen α -D-xylopyranosyl- β -D-fructofuranoside (Xyl-Fru), α -D-mannopyranosyl- β -D-fructofuranoside (Man-Fru), α -D-galactopyranosyl- β -D-fructofuranoside (Gal-Fru) en α -D-fucosylpyranosyl- β -D-fructofuranoside (Fuc-Fru), zijn gesynthetiseerd met behulp van fructansucrase enzymen die het fructosylresidu van sucrose overdragen naar andere monosacchariden (243-246). Gebruik van deze sucroseanalogen als donorsubstraten door glucansucrase enzymen zou het mogelijk maken om een bredere serie van monosacchariden in te zetten voor oligosaccharide en glycoconjugaat synthese. Met behulp van enzymengineering zullen mutanten glucansucrase enzymen geconstrueerd worden teneinde hun acceptorreactie met deze sucroseanalogen te verbeteren. In een recente studie werd gerapporteerd dat glucansucrase GTFA van *L. reuteri* 121 α -D-allopyranosyl- β -D-fructofuranoside als donorsubstraat kan gebruiken, resulterend in overdracht van een allose residu naar verschillende acceptorsubstraten (247). Met behulp van deze sucroseanalogen als donorsubstraat zou dus de glyco-diversiteit van glucansucrase producten aanzienlijk uitgebreid kunnen worden.

Gezien al deze recente ontwikkelingen zijn de vooruitzichten om op maat gemaakte α -glucanen te produceren door gebruik te maken van enzymengineering, substraatengineering (sucroseanalogen) en reactieengineering hoopgevend. Glucansucrasen zijn zeer interessante enzymen en biokatalysatoren, en hebben een sterk potentieel voor verdere toepassingen in de voedsel, medische en cosmetische industriën.

