

University of Groningen

## Exploring the glucosylation potential of glucansucrases

Devlamynck, Tim Nick

**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:*

2017

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

*Citation for published version (APA):*

Devlamynck, T. N. (2017). *Exploring the glucosylation potential of glucansucrases: From enzyme to product*. [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**

## Deel 1: Omgaan met de limitaties van glucansucrases

De introductie van een glycosylgroep kan zowel de fysicochemische als biologische eigenschappen van organische moleculen, zoals antioxidanten, antibiotica en smaakstoffen, beïnvloeden<sup>6</sup>. De chemische synthese van glycosiden is een meerstapsproces dat gekenmerkt wordt door de productie van een grote hoeveelheid afvalproducten. Enzymatische glycosylatie geniet de voorkeur; de hoge specificiteit van enzymen leidt immers tot de productie van 5 keer minder afval<sup>17</sup>. Van alle koolhydraat-actieve enzymen die gebruikt kunnen worden als biokatalysator voor de glycosylatie van moleculen zijn glucansucrases meerdere keren naar voren geschoven als uitstekend alternatief. Deze enzymen bezitten een brede acceptorsubstraatspecificiteit en gebruiken sucrose als donorsubstraat, een goedkope en gemakkelijk te verkrijgen grondstof.

Glucansucrases behoren tot de glycoside hydrolase GH70-familie. Ze katalyseren de conversie van sucrose in  $\alpha$ -glucan polysachariden, en daarbij verbinden ze de  $\alpha$ -D-glucopyranosyl eenheden met ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2), ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3), ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4), of ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6) bindingen, afhankelijk van de enzymspecificiteit<sup>73,74</sup>. Daarnaast zijn glucansucrases ook in staat om glucosylgroepen te transfereren van sucrose naar een brede waaier van koolhydraat en niet-koolhydraat acceptormoleculen, de zogenaamde acceptorreactie<sup>75</sup>. Tot op vandaag heeft het meeste onderzoek naar de acceptorreactie van glucansucrases zich toegespitst op de ontdekking van nieuwe acceptorsubstraatspecificiteiten<sup>111-113,120-131</sup>. Er is echter minder vooruitgang geboekt op het vlak van de gedetailleerde structuurbepaling van de geglycosyleerde producten, of wat betreft het verbeteren van deze enzymen als industriële biokatalysator, noch door reactie noch door enzym-engineering strategieën.

Het toepassen van de acceptorreactie van glucansucrases voor de glycosylatie van organische moleculen wordt getypeerd door een aantal nadelen. Glucansucrases katalyseren in principe de synthese van  $\alpha$ -glucan

polysachariden vanuit sucrose, in dit geval zowel het donor als acceptorsubstraat. Dit verhindert uiteraard de efficiënte glycosylatie van alternatieve acceptorsubstraten en compliceert de opzuivering van de geglycosyleerde producten. **Hoofdstuk 2** verkende het potentieel van het N-terminaal getrunceerde glucansucrase Gtf180 van *Lactobacillus reuteri* 180 (Gtf180- $\Delta$ N)<sup>80</sup> en afgeleide mutanten<sup>99,100</sup> als glycosylatiebiokatalysator<sup>110</sup>. Drie Gtf180- $\Delta$ N mutanten (L938F, L981A and N1029M) werden geselecteerd uit een mutantenbibliotheek op basis van hun verzwakte  $\alpha$ -glucansynthese. Analyse van de glycosylatie van het acceptorsubstraat catechol door deze mutanten onthulde dat deze ogenschijnlijke imperfectie resulteerde in een substantiële verbetering van de monoglycosylatie-opbrengst. Ook verscheidene andere fenolische en alcoholische verbindingen werden efficiënter geglycosyleerd door de geselecteerde mutanten. In vergelijking met het WT-enzym was de omzetting van bijvoorbeeld resorcinol in geglycosyleerde producten door de L981A-variant verdrievoudigd van 17% tot 53%. Deze resultaten werden andermaal bevestigd door de kinetische analyse van de mutanten; ze hadden een hogere affiniteit voor het acceptorsubstraat catechol maar een lagere affiniteit voor het monogeglycosyleerde catecholproduct. Analyse van de beschikbare 3D-structuur van het Gtf180- $\Delta$ N-proteïne verklaarde hoe mutagenese van residuen L938, L981 en N1029 de  $\alpha$ -glucansynthese verzwakte in het voordeel van de acceptorreactie. Toch bleef de glycosylatie van grotere (niet-koolhydraat) acceptorsubstraten, zoals resveratrol en quercetine, problematisch, deels door de lage oplosbaarheid in water van deze moleculen. De L981A-mutant vormt desalniettemin een goed vertrekpunt voor verdere mutationale engineering om de glycosylatie van vooraf gedefinieerde acceptorsubstraten te verbeteren.

Een tweede nadeel inherent aan het gebruik van glucansucrases is hun relatief lage operationele stabiliteit bij hoge temperaturen en in systemen met hoge acceptorsubstraatconcentraties en cosolventen<sup>110,120,125</sup>. Immobilisatie van Gtf180- $\Delta$ N op mesoporeuze silicapartikels verbeterde de enzymactiviteit bij temperaturen hoger dan 50 °C en in systemen met hoge DMSO-concentraties, condities die normalerwijs zeer schadelijk zijn voor het enzym (**Hoofdstuk 3**). Het cross-linken van Gtf180- $\Delta$ N met glutaraaldehyde resulteerde echter in een

ongewenst neveneffect: minder catechol werd geconverteerd door het geïmmobiliseerde enzym in vergelijking met het vrije enzym, ten gunste van meer sucrosehydrolyse. Incubatie van geïmmobiliseerd Gtf180- $\Delta$ N in systemen met 20% DMSO leidde desalniettemin tot de verbeterde glycosylatie van een aantal slecht oplosbare verbindingen, zoals catechine en galloorzuur.

## Deel 2: Glycosylatie van steviolglycosiden

Het gebruik van steviolglycosiden, verbindingen die geëxtraheerd worden uit de bladeren van de plant *Stevia rebaudiana*, als intensieve zoetstof is in 2011 goedgekeurd door de Europese Commissie<sup>43</sup>. Steviaextract bestaat voornamelijk uit de steviolglycosiden stevioside en rebaudioside A (RebA), wiens bittere (na)smaak de creatie van calorieloze frisdrank en een volledige suikervervanging in andere voedingsproducten in de weg staat<sup>46</sup>. Het oplossen van deze smaakkwesitie zou de populariteit en bijgevolg het verkoopsucces van stevia substantieel kunnen verhogen en daarmee een sterke positie voor stevia op de zoetstofmarkt vrijwaren. Hoe de chemische structuur van steviolglycosiden hun smaakkwiteit beïnvloedt is nog steeds niet helemaal duidelijk. Het staat echter vast dat deze laatste afhangt van het aantal, de locatie en configuratie van de glycosylgroepen<sup>8</sup>. Het spreekt dus voor zich dat de enzymatische glycosylatie van steviolglycosiden een veelbelovend middel is om diens smaakeigenschappen te verbeteren<sup>50-70</sup>.

Screening van onze in-house glucansucrasecollectie onthulde dat alleen Gtf180- $\Delta$ N van *L. reuteri* 180 in staat is om RebA te glycosyleren en daarbij een 50% conversie bereikt (**Hoofdstuk 4**). Omdat deze omzetting vanuit industrieel perspectief te laag is, werd een mutantenbibliotheek gescreend op basis van een verbeterde RebA-conversie, wat leidde tot de ontdekking van de Q1140E-mutant. Structurele analyse van de geglycosyleerde producten toonde aan dat beide enzymen RebA exclusief glycosyleren op het Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ C-19) residu, met de introductie van een ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-binding. Docking van RebA in het actieve centrum van het enzym gaf een visuele interpretatie voor deze resultaten: enkel de steviol

C-19  $\beta$ -D-glucosylgroep is beschikbaar voor glycosylatie. Voorgaande studies hadden het belang van de C-13/C-19-regiospecificiteit op de smaakqualiteit van de geglycosyleerde producten al aangetoond. Bijvoorbeeld, ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)-glycosylatie van stevioside en rubusoside op de C-13-steviolpositie resulteerde in producten met een betere en intensievere zoete smaak. De introductie van dezelfde ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)-binding op de C-19-positie leidde dan weer tot meer bitterheid<sup>52-54</sup>. Hiermee in tegenstelling: ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-glycosylatie op de C-19-positie van stevioside verbeterde diens smaakprofiel<sup>60</sup>.

Optimalisatie van de reactiecondities d.m.v. response surface methodology (RSM) duidde eens te meer de lage maar nog steeds aanwezige  $\alpha$ -glucansynthese aan als belangrijkste belemmering in het behalen van hoge omzettingen en productconcentraties. Toch kon er een zeer productief proces ontwikkeld worden: het toepassen van de optimale condities stond de productie toe van 115 g/L geglycosyleerd product (RebA-G) binnen 3 uur, met een hoge RebA-conversie van 95%. Het aannemen van een fed-batchsysteem, waarbij de concentratie van donorsubstraat sucrose constant op een laag niveau wordt gehouden door middel van diens continue toevoeging, leidde tot een verdere verbetering van de productconcentratie tot 270 g/L. Omdat sucrose de primer is voor  $\alpha$ -glucansynthese<sup>103,104,135</sup>, creëert de constante overmaat van RebA t.o.v. sucrose immers condities ten gunste van RebA-glycosylatie. Tegelijkertijd zorgt de continue toevoeging van sucrose ervoor dat er voldoende donorsubstraat aanwezig is om de reactie voort te drijven.

Smaakanalyse van RebA en de geglycosyleerde RebA-producten door een getraind panel liet zien dat RebA-G beschikt over een superieur smaakprofiel, met een significant gereduceerde bitterheid, in vergelijking tot RebA. Glycosylatie van RebA op het Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ C-19-residu, met de introductie van een ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-binding, is dus een zeer geschikte methode om diens smaakeigenschappen te verbeteren. Of het smaakprofiel al dan niet voldoende verbeterd is voor de productie van calorieuze frisdrank, confituur, yoghurt, e.d. vereist uiteraard de smaakanalyse van het respectievelijke eindproduct.

Stevioside is het meest voorkomende steviolglycoside (5-10% van het droge bladgewicht) maar wordt door consumenten als bitterder bevonden dan RebA (2-4% van het droge bladgewicht). Dit verklaart waarom alle commerciële steviaproducten zeer zuivere varianten zijn van RebA, terwijl stevioside wordt beschouwd als een ongewenst nevenproduct. Het verbeteren van stevioside's smaakeigenschappen d.m.v. glycosylatie biedt dus een opportuniteit om ook dit nevenproduct te valoriseren. Hoewel incubatie van stevioside met Gtf180- $\Delta$ N-Q1140E inderdaad resulteerde in diens glycosylatie, verliep de reactie minder efficiënt dan RebA-glycosylatie (bepaald door RSM): om 50 g/L geglycosyleerd product (Stev-G) te produceren binnen 3 uur, met een conversie van 95%, was er 5 keer meer sucrose en 2 keer meer enzym nodig (**Hoofdstuk 5**). Structurele analyse van de geglycosyleerde producten onthulde dat, in tegenstelling tot RebA-glycosylatie, stevioside niet exclusief geglycosyleerd werd op de C-19-positie; een kleine hoeveelheid producten bleek geglycosyleerd op de C-13-positie. Net als bij RebA-glycosylatie was het belangrijkste product geglycosyleerd op de C-19-positie, met de introductie van een ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-binding (Stev-G1). Het meest voorkomende digeglycosyleerde product bevatte een ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)-binding en niet een verwachte ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3) –of ( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)-binding (specifiek voor de Gtf180- $\Delta$ N-producten met sucrose alleen<sup>82</sup>).

Smaakanalyse van de geglycosyleerde producten toonde een significante bitterheidsreductie aan ten opzichte van stevioside. Het getrainde panel oordeelde dat Stev-G1 net zo zoet was als stevioside maar ook significant minder bitter. Het grote aandeel aan multigeglycosyleerde producten in Stev-G (67.5%) vertaalde zich in een significant gereduceerde zoetheid, in tegenstelling tot RebA-G (22.3% multigeglycosyleerde producten) dat RebA's zoetheid behield. Dit probleem kon echter opgelost worden door het verdubbelen van de Stev-G dosis want daardoor werd een gelijkwaardige zoetheid als bij stevioside bereikt maar was er nog steeds sprake van een significante bitterheidsreductie. In vergelijking met Stev-G was RebA-G duidelijk het superieure product.

Omdat de glycosylatie van RebA en stevioside met Gtf180- $\Delta$ N-Q1140E veel potentieel toonde op laboratoriumschaal, werd een efficiënt proces, inclusief

productopzuivering, ontwikkeld op kg-schaal (**Hoofdstuk 6**). Uiteindelijk werd gekozen voor specifieke adsorptie van het geglycosyleerde product om sucrose, fructose en de  $\alpha$ -glucanoligo –en polysachariden te verwijderen. Analyse van de productiekosten onthulde de grote kracht van het proces: het enzym vertegenwoordigt slechts een klein deel van de totale kosten, die vooral worden bepaald door de kosten van het acceptorsubstraat, RebA of stevioside. Een substantiële kostenreductie van 30% kan dus bewerkstelligd worden door stevia-extract van lagere kwaliteit te gebruiken als acceptorsubstraat i.p.v. de duurdere steviolglycosiden van hoge zuiverheid. Een bijkomend voordeel is dat het nevenproduct stevioside gevaloriseerd wordt, een extra economische winst. Als smaakwaliteit de prioriteit is, dan vormt RebA-glycosylatie de beste keuze aangezien RebA-G een superieure smaak heeft.

Daarnaast kon Gtf180- $\Delta$ N-Q1140E ook neohesperidine dihydrochalcon (NHDC) glycosyleren, ook al werd een relatief lage omzetting (64%) bereikt (**Hoofdstuk 7**). Het is bekend dat het gebruik van 5-10 ppm NHDC in een RebA-oplossing een vermindering van de bitterheid tot gevolg heeft. Jammer genoeg gaat dit gepaard met een onprettige en slepende nasmaak, veroorzaakt door NHDC<sup>247</sup>. Diens glycosylatie door Gtf180- $\Delta$ N-Q1140E resulteerde in een geringe verbetering van de ongewenste nasmaak. In het algemeen was het bitterheidsonderdrukkende effect van (geglycosyleerd) NHDC op RebA vrij miniem; RebA-glycosylatie bleef overeind als meest effectieve manier om diens smaak te verbeteren. Recent onderzoek kende ook krachtige antioxidant –en prebiotische eigenschappen toe aan NHDC<sup>260-264</sup>. De lage wateroplosbaarheid van NHDC<sup>265</sup>, wat diens toepassing als nutraceutical in de weg staat, werd verbeterd d.m.v. glycosylatie met Gtf180- $\Delta$ N-Q1140E, terwijl de sterke antioxidanteigenschappen door glycosylatie behouden bleven.



## Conclusies

Deze thesis verkende het potentieel van *L. reuteri* 180 Gtf180- $\Delta$ N en afgeleide mutanten om een brede waaier aan alternatieve acceptorsubstraten te glycosyleren. Hierbij werd aangetoond dat de Q1140E-mutant bijzonder geschikt is om steviolglycosiden te glycosyleren. Niet alleen werden hoge conversies en productconcentraties bekomen, de geglycosyleerde producten beschikten over een superieur smaakprofiel in vergelijking met RebA en stevioside. De ontwikkelde processen hebben dus een uitstekend potentieel om geïmplementeerd te worden op een industriële schaal.

De Q1140E-mutant was daarnaast ook in staat om andere glycosiden, in het bijzonder NHDC, te glycosyleren, hoewel deze reactie minder efficiënt was dan de glycosylatie van steviolglycosiden. Toch is dit nogmaals een illustratie van de brede acceptorsubstraatspecificiteit van Gtf180- $\Delta$ N en afgeleide mutanten wat betreft de glycosylatie van koolhydraten. De uitstekende wateroplosbaarheid van koolhydraten is hiervoor uiteraard een extra voordeel aangezien de additie van inhiberende cosolventen niet nodig is.

De glycosylatie van niet-koolhydraten verliep met meer moeite, mede door hun lage wateroplosbaarheid en hun inhibitie van Gtf180- $\Delta$ N.  $\alpha$ -Glucansynthese werd aangeduid als belangrijkste struikelblok voor de efficiënte glycosylatie van deze verbindingen. Onderdrukking van de  $\alpha$ -glucansynthese door mutationale engineering zorgde voor een beperkt verbeterde omzetting. Er zullen dus specifieke mutanten geconstrueerd moeten worden om Gtf180- $\Delta$ N's glycosylatiepotentieel verder uit te bouwen en te verbeteren. Een gelijkwaardige benadering zoals gevolgd voor de glycosylatie van steviolglycosiden zou het meest succesvol moeten zijn.

Als finale conclusie kan dus gesteld worden dat glucansucrase Gtf180- $\Delta$ N zeker een toekomst heeft als glycosylatiebiokatalysator, in het bijzonder voor de glycosylatie van koolhydraten. Het succes van industriële processen zal eerst en

vooral afhangen van de constructie van gepaste mutanten, leidend tot hoge omzettingen, en ten tweede, de nauwkeurige optimalisatie van de reactiecondities, daarbij  $\alpha$ -glucansynthese zoveel mogelijk onderdrukkend.

