

Abstract

Glycosylation can significantly increase the stability and water solubility of natural products and their derivatives. The overall aim of this thesis was to establish the enzymatic glycosylation of biologically active natural products. The application of glucansucrases, which are members of the GH70 enzyme family, is particularly interesting since these enzymes utilize low-priced sucrose as the glycosyl-donor and are principally able to perform natural product glycosylation. The lactic acid bacteria genera *Leuconostoc* and *Weissella* are known to comprise several glucansucrase-producing strains and are hence promising resources for the identification of novel and so far uncharacterized enzymes. From a set of 41 different bacterial strains, nineteen strains possessing active glucansucrases were identified. Beside glucansucrase activity in soluble secreted form, most strains also exhibited cell-associated enzyme activity. Studies with the catecholic model acceptor compounds caffeic acid, (+)-catechin and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) revealed that natural product glycosylation is not only limited to a few enzymes but a widespread characteristic of *Leuconostoc* and *Weissella* glucansucrases in general. Especially enzymes from *Weissella* had not been investigated in this respect, so far.

Caffeic acid was converted by >85 % of all enzymes tested. Comparative analysis applying caffeic acid analogues approved the preference of glucansucrases for a catechol motif and more particularly for a glycosylation of hydroxyl groups in *para*-position. The glucansucrase identified in the strain *W. beninensis* DSM 22752 exhibited a lower regioselectivity than the other enzymes tested and additionally glycosylated resorcinolic and phenolic compounds in low amounts. α -D-glucosides of caffeic acid and (+)-catechin as well as novel glucosides of umbellic acid, protocatechuic acid, esculetin and hematoxylin were synthesized and structurally analyzed.

Glucansucrase of *L. citreum* DSM 5577 was the best biocatalyst for the efficient and selective glycosylation of catechols reaching a total turnover of 74 % with caffeic acid. The isolated enzyme possessed a molecular weight of 171 kDa and had a K_M -value of 27.6 mM for caffeic acid and 31.0 mM for the physiological substrate sucrose with a maximum specific activity of 46.1 and 153.9 U mg⁻¹, respectively. Furthermore, the enzyme exhibited a promising tolerance towards the co-solvents ethanol and especially DMSO. In addition to that, the biocatalyst was stable under biocatalytic process conditions over 24 hours suggesting its suitability for technical applications.

Four enzymes significantly glycosylated NDGA, a strong antioxidant used in functional cosmetics. Glucansucrase of *L. pseudomesenteroides* DSM 20193 outper-

formed the other enzymes regarding activity and substrate turnover and was characterized in more detail. The two main glycosylation products of NDGA were identified as NDGA-4- α -D-monoglucoside and symmetrically diglycosylated NDGA-4,4'- α -D-diglucoside by 2D-NMR. The NDGA-mono- and in particular the NDGA-diglucoside had a significantly improved water solubility and thermal stability compared to the NDGA aglycon. The antioxidative properties of the NDGA glucosides were analyzed in a cell-based system. Remarkably, the antioxidative capacity of the NDGA glucosides correlated with a prolonged incubation time of the compounds with the cells finally reaching the same level obtained with NDGA aglycon. This finding conclusively suggested a cell-catalyzed hydrolysis of the glycosidic bonds and liberation of the active antioxidative compound NDGA. Accordingly, NDGA and its glucosides reduced cell migration of triple negative breast cancer cells to the same degree. The glucansucrase-catalyzed glycosylation of NDGA applying the biocatalyst of *L. pseudomesenteroides* DSM 20193 was successfully characterized and optimized. Within two consecutive rounds of full-factorial design a high NDGA turnover of 95.5 % and a maximum glucoside concentration of 45.5 mM was achieved.

Zusammenfassung

Durch Glykosylierung kann maßgeblich die Stabilität und Wasserlöslichkeit von Naturstoffen und deren Derivaten erhöht werden. Es war das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, enzymatische Glykosylierung zu etablieren, um biologisch aktive Naturstoffe zu derivatisieren. Der Einsatz von Enzymen der GH70 Enzymfamilie, zu welcher die Glucansucrasen gehören, ist aufgrund der Nutzung von Saccharose als kostengünstigem Glykosyldonor und der Fähigkeit dieser Enzyme, Naturstoffe zu glykosylieren, biokatalytisch besonders interessant. Insbesondere in den beiden Milchsäurebakterien-Gattungen *Leuconostoc* und *Weissella* sind viele Glucansucrase-bildende Stämme beschrieben, weshalb diese Gattungen ein hohes Potenzial für die Entdeckung neuer und uncharakterisierter Enzyme besitzen. Von 41 untersuchten Stämmen dieser Gattungen wurden 19 Stämme mit aktiven Glucansucrasen identifiziert. Die meisten Stämme zeigten neben der Glucansucrase-Aktivität in sekretierter löslicher Form ebenfalls zellgebundene Aktivität. Untersuchungen mit den catecholischen Modell-Akzeptor-Verbindungen Kaffeesäure, (+)-Catechin und Nordihydroguajaretsäure (NDGA) offenbarten, dass die Naturstoffglykosylierung als Nebenreaktion innerhalb der Glucansucrasen weit verbreitet ist. Insbesondere für Enzyme aus Stämmen der Gattung *Weissella* war dies bisher nicht beschrieben. Die von >85 % aller getesteten Enzyme umgesetzte Verbindung Kaffeesäure wurde als Standardsubstrat für die Akzeptorreaktion identifiziert. Vergleichende Untersuchungen mit Kaffeesäure-Derivaten bestätigten die Präferenz der Enzyme für Catechol-Motive und für die Glykosylierung von *para*-ständigen Alkoholen. Lediglich der Biokatalysator aus *W. beninensis* DSM 22752 unterschied sich von der Mehrheit der getesteten Enzyme durch eine vergleichsweise geringe Regioselektivität und die Fähigkeit, ebenfalls Resorcinole und Phenole mit geringem Umsatz zu glykosylieren. Diverse α -D-Glukoside auf Basis von Kaffeesäure, (+)-Catechin, Umbellinsäure, Protocatechusäure, Esculetin und Hämatoxylin wurden synthetisiert und strukturell analysiert.

Die Glucansucrase aus *L. citreum* DSM 5577 erwies sich als effizientes und selektives Enzym für die Glykosylierung von Catecholen mit Umsätzen von bis zu 74 %. Für das isolierte Enzym mit einem Molekulargewicht von 171 kDa wurden K_M -Werte von 27,6 mM für Kaffeesäure und 31,0 mM für das physiologische Substrat Saccharose bei einer maximalen Aktivität von 46,1 bzw. 153,9 U mg⁻¹ bestimmt. Die Eignung des Enzyms als Biokatalysator für technische Anwendungen wurde durch eine vielversprechende Toleranz gegenüber DMSO und Ethanol sowie eine hohe Prozessstabilität über 24 Stunden nahegelegt.

Die Glykosylierung des starken Antioxidans NDGA, welches in großen Mengen aus dem Kreosotbusch *Larrea tridentata* gewonnen werden kann, gelang in signifikanten Mengen mit lediglich vier verschiedenen Glucansucrase-Aktivitäten. Das Enzym aus *L. pseudomesenteroides* DSM 20193 zeigte sich in vergleichenden Untersuchungen den anderen Enzymen überlegen hinsichtlich Aktivität und Umsatz und wurde näher charakterisiert. Die beiden Hauptprodukte der NDGA-Glykosylierung wurden als NDGA-4- α -D-Monoglukosid und als symmetrisch glykosyliertes NDGA-4,4'- α -D-Diglukosid mittels 2D-NMR identifiziert. Die Glykosylierung erhöhte deutlich die Wasserlöslichkeit sowie die Stabilität vom Mono- und insbesondere vom Diglukosid. Die Analyse der zellulären antioxidativen Eigenschaften der Glukoside im Vergleich zum NDGA-Aglykon offenbarte eine Zunahme der antioxidativen Kapazität der Glukosid-Verbindungen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und deuteten gleichzeitig eine zell-katalysierte Hydrolyse der glykosidischen Bindungen an. In entsprechender Weise reduzierten die Glukoside die Zellmigration von dreifach-negativen Brustzellkarzinomzellen im gleichen Maße wie das Aglykon.

Die Charakterisierung und Optimierung der biokatalytischen Glykosylierung von NDGA mit der Glucansucrase aus *L. pseudomesenteroides* DSM 20193 auf Basis von zwei konsekutiven voll-faktoriellen Versuchsplänen resultierte in einem hohen Umsatz von 95,5 % und einer maximalen Glukosid-Produktkonzentration von 45,5 mM.