

På jagt efter nye biopolymerer

Hvordan finder vi nye typer af kostfibre og andre nyttige biopolymerer i et planterige, der indeholder over 300.000 arter? En nyudviklet HTP-teknik åbner nu dørene for large-scale analyser af diverse plantearter spredt ud over hele planteriget

Af postdoc Iben Sørensen og professor William G. T. Willats, Biologisk Institut, Naturvidenskabeligt Fakultet, Københavns Universitet

Kostfibre er en vigtig bestanddel af menneskers kost. De stammer fra de kulhydrater, man indtager, når man spiser frugt og grønt. Mange kostfibre kommer fra planternes cellevægge, som f.eks. pektiner og β -glucaner. Inden for de seneste år har der været en stigende interesse for disse biopolymerer, fordi man er begyndt at opdage alle de positive effekter, de kan have på vores helbred.

Der er for nylig blevet foreslået en sammenhæng mellem indtagelse af kostfibre og en nedsat risiko for cancer, men mange andre eksempler på gavnlige effekter eksisterer, såsom en forbedret glucoseregulering samt nedsættelse af kolesterol i serum [1,2].

Ud over kostfibre indeholder plantemateriale også pre-biotiske oligosaccharider, der kan fremme væksten af de pro-biotiske bakterier, vi har i tarmene og derved vores velvære og helbred [3,4]. β -glucaner er en type af kostfibre, som findes i store mængder i specielt kornsorter og græsser fra plantefamilien Poales.

I USA er både havre og byg β -glucaner godkendt som en "functional food ingredient" af U.S. Food and Drug Administration (FDA), fordi de har en gavnlig effekt på humant helbred mht. at nedsætte risikoen for hjertesygdomme og kolesterolniveauet i blodet. Derudover sikrer de vandopløselige former en velfungerende fordøjelse. Dyreforsøg vist, at visse β -glucaner selektivt fremmer pro-biotiske bakterier og der-

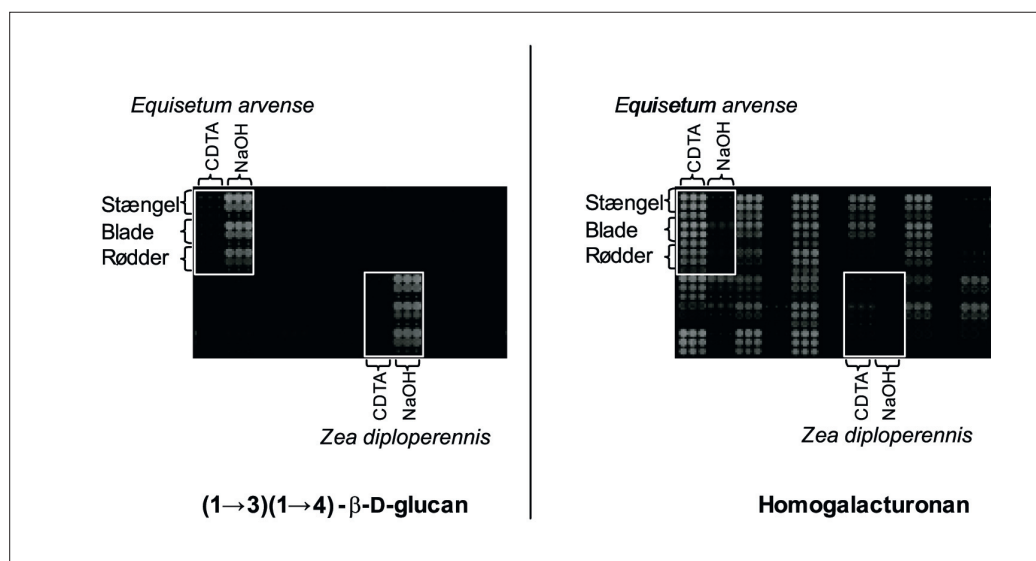
ved ligeledes kan betragtes som pre-biotiske [4]. Det stigende forbrug af plantematerialer som kosttilskud og "functional food ingredients" afspejler ikke den andel af plantearter, man rent faktisk har undersøgt i detaljer for indhold af kostfibre, nutraceuticals, pre-biotics osv. Den er nemlig forsvindende lille i forhold til det enorme uberørte potentiale. Det betyder, at vi med ganske stor sandsynlighed vil finde flere brugbare oligo- og polysaccharider.

Manglen på "high-throughput (HTP)"-teknikker betyder, at forskere og firmaer ikke har kunnet undersøge et større antal prøver på en gang, og derfor er der ikke en ret stor viden på området. Vi har for nylig udviklet en HTP-teknik i professor William Willats laboratorium [5]. Her gives nogle eksempler på, hvordan denne teknik kan åbne døren for large-scale analyser af diverse plantearter.

Comprehensive Microarray Polymer Profiling (CoMPP)

Den nye teknik gør os i stand til at analysere indholdet af mange forskellige kulhydratstrukturer i mange komplekse cellevægsprøver på kort tid. Basalt set kombinerer vi den store kapacitet microarrays har med specificiteten af monoklonale antistoffer (mAbs).

De grundlæggende trin i teknikken, der kaldes Comprehensive Microarray Polymer Profiling (CoMPP) [5], består i at ekstrahere fraktioner af cellevægsmateriale med forskellige solventer og derved opnå en grov-inddeling af prøven. Disse fraktioner printes derefter som microarrays, oftest på en nitrocellulose-overflade. Da set-up'et er meget fleksibelt, kan vi uden besvær ændre solventer, antal prøver, antal replikater og fortyndinger samt overfladen, der printes på og derved designe eksperimenter optimeret til specifikke sæt prøver. Ved printning af ekstrakterne opnår vi en serie identiske arrays, der efterfølgende probes individuelt med et bibliotek af mAbs. Der er mere end 100 cellevægsspecifikke mAbs og CBM'er (Carbohydrate Binding Modules) til rådighed, hvoraf mange binder velkendte epitoper. Vi har i vores laboratorie adgang til de fleste. Fordi vi bruger et colorimetrisk assay, kan vi følge fremkaldelsen og vurdere



Figur 1. Et eksempel på microarrays med cellevægspolymerer ekstraheret fra flere plantearter, heriblandt E. arvense (padderok) og Z. diploperennis (majs). Polymerer blev ekstraheret med CDTA og NaOH, og de viste arrays blev probed med monoklonale antistoffer med specificitet for enten (1→3)(1→4) β -D-glucan eller homogalacturonan. Disse arrays afslører den uventede tilstedeværelse af (1→3)(1→4)- β -D-glucan i cellevæggene fra både E. arvense og Z. diploperennis og demonstrerer potentialet af CoMPP i bio-prospecting for nye kilder af polysaccharider.

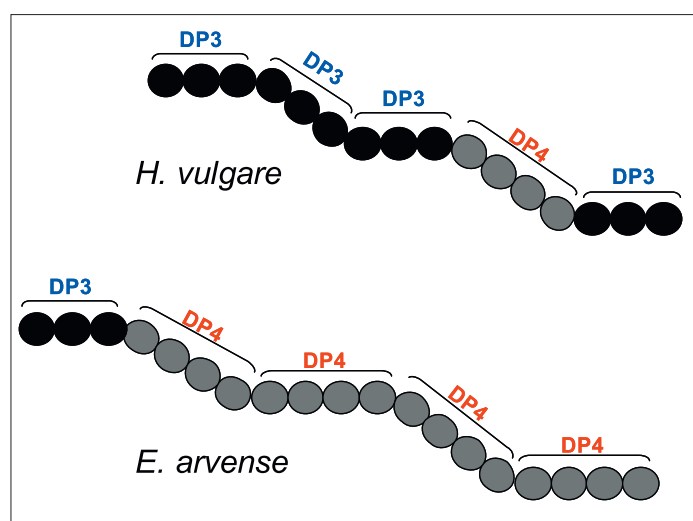
kvaliteten af de probede arrays visuelt, før selve kvantificeringen, der foregår vha. et microarray-analyseprogram (ImaGene). Dermed kan vi analysere 192 prøver med op til 50 forskellige antistoffer i et enkelt eksperiment, og det giver os mulighed for at lave screens, der før var umulige. Selvom CoMPP er en semikvantitativ analysemetode (pga. f.eks. forskellig aviditet af antistofferne), opnår vi en usædvanlig stor mængde data, som ved brug af konventionelle biokemiske metoder ville have været praktisk talt umulige at opnå inden for en overskuelig tidsramme. For at give et mere dybdegående kendskab til udvalgte prøver kan CoMPP kombineres med konventionelle, mere low-throughput biokemiske teknikker såsom MALDI-TOF, linkage- og sukkerkompositionsanalyse. Figur 1 viser et eksempel på to arrays, der er probet med forskellige antistoffer, hvilket medfører forskellige profiler.

CoMPP som en screeningsmetode for kostfiberindhold

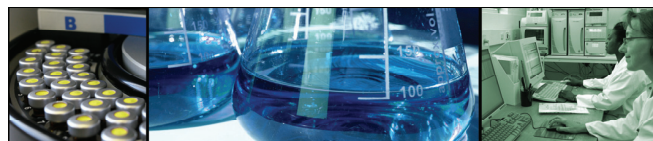
Fordi det kun er et forholdsvis lille antal plantearter, der er blevet undersøgt for deres cellevægs-komposition, er der potentielt en kæmpemæssig bioressource i planteriget, der ikke udnyttes.

For godt 2 år siden startede vi et screeningsforsøg af et stort antal planter fra alger til angiospermer, hvor vi brugte CoMPP. Vi havde adgang til stort set alle plantearter i Botanisk Have i København, så indsamlingen til det første screen foregik der. Vi indsamlede blad, rod og stængel fra mere end 40 forskellige plantearter, som vi isolerede cellevægsmateriale fra vha. en alkoholekstraktion. Disse prøver blev derefter vejlet og ekstraheret med en calciumchelator og en stærk base for at isolere hhv. pektinpolymerer og hemicelluloser.

Vi fandt mange polymerer i arter spredt over hele planteriget, og vi verificerede tilstedeværelsen af flere polymerer i en i forvejen kendt taxonomisk sammenhæng. Et eksempel var hemicellulosen GAX (glucurono-arabino-xylan), som man ved er til stede i meget høje niveauer i græsser, hvor den erstatter det meste af hemicellulosen xyloglucan, som ellers er den overvejende hemicellulose [6]. Til gengæld fandt vi også flere uventede ting, og en af disse var tilstedeværelsen af β -D-(1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)-glucan (også kendt som mixed-linkage glucan eller MLG) i en planteart uden for Poales-familien. Man har før troet, at MLG var en unik polymer for Poales-familien, der indeholder græsser og kornsorter, og det kom derfor som en stor overraskelse, da vi også observerede et ►



Figur 2. Skematisk fremstilling af strukturen af hhv. byg (*H. vulgare*) og padderoke (*E. arvense*) (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan. Oligomerer fra begge plantearter blev frigivet vha. det (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucan specifikke enzym Lichenase og derefter undersøgt vha. MALDI-TOF MS [7]. Som man kan se på figuren, er der i byg flere blokke med en grad af polymerisation (DP) på 3 og få med en DP4, mens det omvendte er tilfældet i padderoke.



Contract Laboratory

More than 15 years of experience in chemical and microbiological GMP analyses for the pharmaceutical industry

Large facilities for stability and photo stability studies at ICH and individual conditions

Fermentation and downstream processing in pilot and laboratory scales

More than a lab

DB Lab A/S
Tel: +45 6593 2920
dmlab@dblab.dk
www.dmlab.dk



Rådgivning om Kemikalier, REACH og GHS

Kommende kurser

REACH guiden:	3. september
REACH og artikler :	22. september
IUCLID:	27. oktober
Kemikaliesikkerhedsvurderinger:	12. november
Lovgivning i USA:	18. & 19. november
GHS:	10. & 24. november

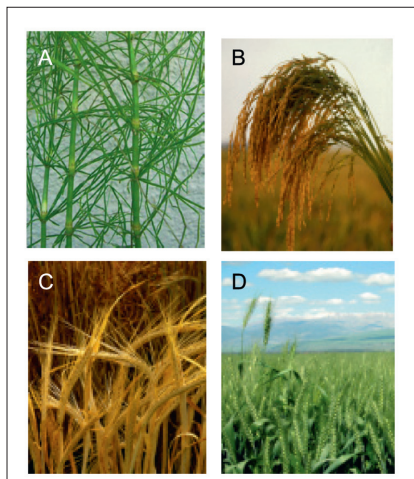
Danmarks stærkeste på kemiske stoffer og deres effekt på mennesker og miljø

Tel: 4516 9200

www.reach.dhigroup.com

www.dhi.dk

meget stort indhold af MLG i padderokken *Equisetum arvense*. *E. arvense* tilhører en familie af planter, der ligger meget fjernt fylogenetisk set fra græsserne og var, ligesom mange andre planter, aldrig blevet undersøgt for MLG. Ved nærmere undersøgelse med MALDI-TOF MS foretaget på enzymatisk isolerede MLG oligosaccharider, fandt vi, at polymeren afveg fra den, der kendes fra græsser og kornsorter (figur 2 [7]). I



Figur 3. Fire forskellige plantearter, der alle indeholder (1→3)(1→4)- β -D-glucan. A: Padderokke, B: Ris, C: Byg og D: Hvede.

kornsorter såsom rug, byg, hvede og ris (figur 3) ved man, at β -glucaner er homopolysaccharider bestående af glucose, der i blokke er bundet sammen af β (1→4)-bindinger. Disse blokke er separeret af β (1→3)-bindinger, som giver polymeren ”knæk” i strukturen (figur 2). I disse kornsorter, består β -glucaner hovedsageligt af blokke på 3 glucoseenheder, selvom der kan forekomme en vis diversitet arterne imellem.

Disse forskelle er vigtige for de forskellige fysiske egenskaber såsom vandopløselighed, viskositet, gelateringsevne samt den fysiologiske indvirkning på mave-tarm-systemet. Det er derfor en virkelig interessant observation, at *E. arvense* MLG har en anderledes struktur, der overvejende indeholder blokke af 4 glucoseenheder, i modsætning til MLG fra græsserne, der overvejende indeholder blokke af 3 glucoseenheder. Det betyder, at den måske engang i fremtiden kan bruges som et alternativt kosttilskud til de β -glucaner, der findes i dag, og vi er p.t. ved at undersøge de biokemiske egenskaber af MLG fra *E. arvense*.

Fremtidige perspektiver

Det er meget sandsynligt, at det omtalte eksempel på en polymer med en anderledes struktur ikke er enestående, og at der vil

vise sig flere tilfælde, når vi begynder at lede i diverse grupper af planter. Det kan være, at der findes helt nye polymerer, vi ikke har fundet endnu. Alger indeholder f.eks. flere polymerer, som også findes i højere plantearter. Der findes også meget specifikke polymerer i forskellige grupper af alger [8,9]. Det er også muligt, at planter, der har skullet tilpasse sig til ekstreme forhold, har udviklet specialiserede biopolymerer. Om vi har held til at opdage nye, nyttige polymerer vil vise sig. Vi arbejder i øjeblikket på at udvide vores array-teknologi til andre microarray-robotter og udvider ligeledes løbende vores bibliotek af cellevægsprøver til at omfatte arter fra hele verden samt så stor en fylogenetisk vidde som muligt.

E-mail-adresse

Iben Sørensen: iben@bio.ku.dk

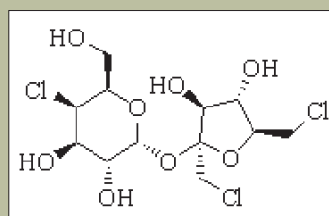
Referencer

1. Jackson, C.L., Dreaden, T.M., Theobald, L.K., Tran, N.M., Beal, T.L., Eid, M., Gao, M.Y., Shirley, R.B., Stoffel, M.T., Kumar, M.V. and Mohnen, D. (2007) Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. *Glycobiology* 17, 805-19.
2. Lazaridou, A. and Biliaderis, C.G. (2007) Molecular aspects of cereal β -glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects. *Cereal Science* 46, 101-118.
3. Rastall, R.A. and Maitin, V. (2002) Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 490-496.
4. Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S.S. and Webb, C. (2002) Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 79, 131-141.
5. Møller, I., Sørensen, I., Bernal, A.J., Blaukopf, C., Lee, K., Øbro, J., Pettolino, F., Roberts, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., Bacic, A. and Willats, W.G.T. High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *The Plant Journal* 50, 1118-1128.
6. McCann, M.C. and Carpita, N.C. (2008) Designing the deconstructing of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 314-320.
7. Sørensen, I., Pettolino, F.A., Wilson, S.M., Doblin, M.S., Johansen, B., Bacic, A. and Willats, W.G.T. (2008) Mixed-linkage (1→3, (1→4)- β -D-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of *Equisetum arvense* cell walls. *The Plant Journal* 54, 510-521.
8. Borowitzka, M.A. (1995) Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology* 7, 3-15.
9. Liners, F., Helbert, W. and Cutsem, P.V. (2005) Production and characterization of a phage-display recombinant antibody against carrageenans: evidence for the recognition of a secondary structure of carrageenan chains present in red algae tissues. *Glycobiology* 15, 849-860.

Læserbrev

Sygt sødt?

En artikel i aprilnummeret af TechMedias månedlige fødevaretekniske publikation Plus Proces, der formodentlig også læses af flere af Dansk Kemis abonnenter, bar overskriften ”Fremtidens slikprodukter er mere sunde og naturlige. Moderne slik skal være sundt, og ingredienserne skal være så naturlige som muligt - og gerne økologiske, hvis det kan lade sig gøre”. Man tager sig derfor til hovedet, når man i samme artikel i afsnittet ”Ind med de sunde ingredienser” ser en lovprisning af sødestoffet sucralose, der herhjemme markedsføres af den nystartede virksomhed Uniq Ingredients. Sucralose er et chloreret disaccharid, 1',4,6'-trichloro-galacto-sucrose, CAS No. 56038-13-2, og nogenlunde så langt fra det naturlige, som man kan forestille sig. For undertegnede, der har beskæftiget sig en del med toksikologi, burde et sådant stof ikke være tilladt i vore fødevarer, og i hvert fald forekommer den



Sucralose

ukritiske omtale af stoffet en anelse holdningsløs, de citerede overskrifter taget i betragtning. Sucralose er en såkaldt ”no-calorie sweetener”, et teknisk fix til imødegåelse af fedmebølgen. Stoffet blev godkendt i Canada allerede i 1991 og er også godkendt af EU. Ifølge Wikipedia findes Sucralose i mere end 4500 fødevarer og læskedrikke. Sødeprodukter baseret på Sucralose markedsføres også under betegnelserne Splenda og SucraPlus. Stoffet er tilsyneladende gået glat igennem alle test, men min intuition siger mig alligevel, at der er tale om en ”syg” fødevarer ingrediens. Hvad mener den hjemlige sagkundskab?

Bo Jensen, bo-jensen@tdcadsl.dk