

Pektinoligosaccharider: Isolering, immobilisering og fastfase-analyse samt biosyntese

Der er et stort behov for at forstå pektins biosyntese og videre processing bedre. Det vil kunne give bedre fødevaringredienser og nye medicinske anvendelser

Af Knud J. Jensen¹, Fanny Guillaumie², Sune F. L. Justesen², Owen R. T. Thomas²,

¹Kemisk Institut, KVL, ²Center for Procesbioteknologi, BioCentrum-DTU

På trods af den store kommercielle interesse for pektin, er forholdet mellem pektiners kemiske struktur og deres bio-fysiske egenskaber ikke blevet klarlagt i de fornødne detaljer. Ligeledes er mange aspekter af pektins biosyntese og videre processing stadig uafklarede. Der er derfor et stort behov for at forstå begge dele på et molekylært niveau. En bedre forståelse af pektins struktur-funktionsforhold kan føre til bedre fødevaringredienser og måske nye medicinske anvendelser.

En forudsætning er adgangen til homogene, veldefinerede pektinoligosaccharider i multi-mg mængder. Derudover er der behov for nye analytiske metoder. Til dette formål er der udviklet en effektiv metode til oprensning af homogalacturonan oligosaccharider fra pektiner. Dernæst er der udviklet syv metoder til immobilisering af pektinoligosaccharider. I øjeblikket arbejdes der mod fastfase-assisteret sekventering og fastfasebiosyntese af pektinoligosaccharider. Selv om metoderne er udviklet til pektin, kan de også bruges på en række oligosaccharider med en lignende struktur. Her, som så mange andre steder, viste kemien sig som den centrale videnskab, der forbinder forskningsområder.

Forarbejdet

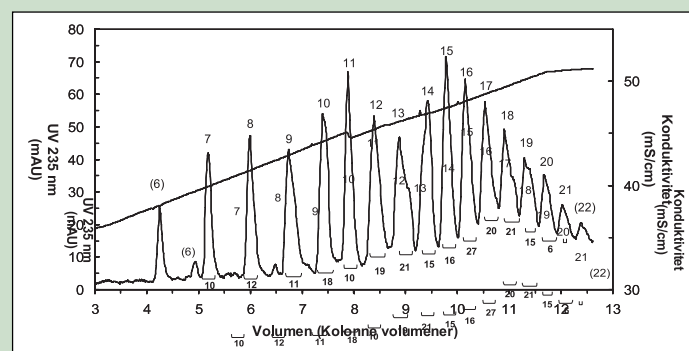
I forskningsprojektet er homogalacturonan oligosaccharider fra pektiner undersøgt. Udgangsmaterialet var en kommerciel tilgængelig pektin (d.e. 71% (degree of esterification)), som først blev behandlet med pektinlyase for at producere fragmenter, hvorefter methylestrene blev hydrolyseret. Begge dele blev udført af dr. Tove Christensen (Danisco Innovation).

Efter selektive fældninger og centrifugering fås et produkt, hvor de meget store fragmenter er fjernet og som er beriget i pektinoligosaccharider (homogalacturonan) med en d.p. > 6 (degree of polymerisation). Oligosacchariderne indeholder en dobbeltbinding i den ikke-reducerende ende.

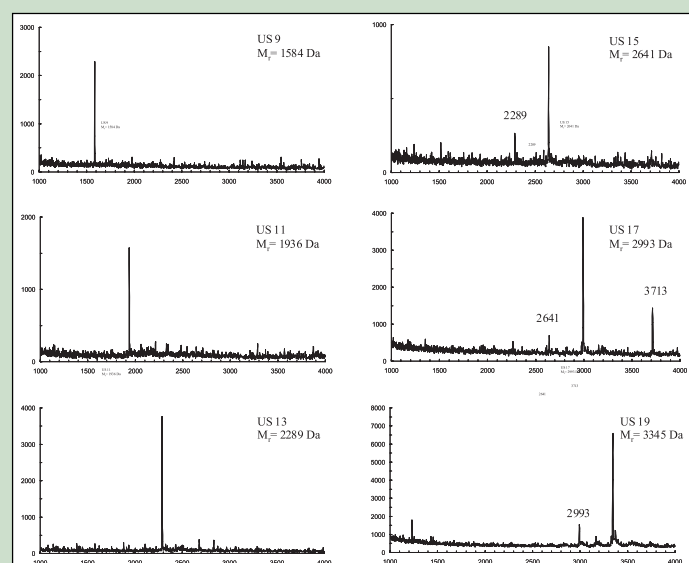
Isolering af pektinoligomerer

Det første mål var at isolere homogene homogalacturonaner. Hidtidige teknikker var omstændelige eller krævede dyre, dedikerede HPLC-kolonner - i alle tilfælde blev kun små mængder isoleret. I stedet blev der udviklet en ny procedure ved brug af det chromatografiske materiale Source 15 Q, der består af polystyren (krydsforbundet med divinylbenzen). De stive *beads* i Source 15 Q har en meget homogen størrelsesfordeling (15 µm) med en relativ åben porestruktur, og materialet er coatet for at reducere hydrofobiciteten. Denne chromatografiske matrice giver kun et beskedent modtryk, og i de fleste tilfælde kan den bruges på chromatografisk udstyr til separation af proteiner. Eluering med en gradient af

ammoniumformat tillod, efter systematisk optimering, adskillelse af pektinoligomerer med d.p. 6 til ~22. Ud fra 430 mg pektin blev der med en enkelt chromatografisk separation isoleret homogene pektinoligomerer i mængder fra 6 til 27 mg, svarende til et samlet udbytte på 51%. Som det ses i figur 1 og 2, var den opnåede adskillelse bemærkelsesværdig god [1]. Partiel hydrolyse af pektin ved forhøjet tryk og temperatur gav oligosaccharider uden dobbeltbinding.



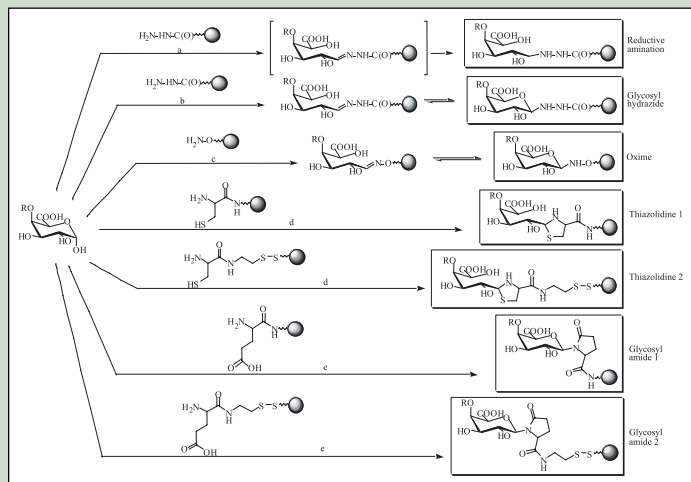
Figur 1. Præparativ separation af 430 mg pektinoligomerer (d.p. 6 til 22) på en 650 ml Source 15 Q kolonne elueret med en ammoniumformatgradient (0.3 til 0.55 M over 11 kolonnevolumener). Monitorering ved 235 nm. Længden af fragmenterne (d.p.) er noteret over hver top (toppe i parentes er ikke opsamlet), under hver top er volumen, der indeholder de rene fragmenter markeret med en horisontal tuborg. Det rene udbytte i mg er ligeledes noteret under hver top.



Figur 2. Renheden af et repræsentativt udsnit af de oprensede fragmenter.

Immobilisering på proteiner

Derefter blev det undersøgt, hvordan pektinoligosaccharider kan immobiliseres på polymerer. Kravene til polymeren var kemisk stabilitet for at være kompatibel med en række kemiske reaktioner, og at den skulle besidde fysiske egenskaber, der tillader effektive enzymatiske reaktioner. Valget faldt på Meldals PEGA-resin og Sepharose. I et andet forskningsprojekt er det vist, at PEGA-resinet kan bruges til fastfase enzymatisk oligosaccharid- og glycopeptidsyntese ved brug af glycosynthaser, der er modificerede glycosylhydrolaser [2]. På sigt vil det åbne for nye muligheder også at arbejde med magnetiske *beads*. Der findes i litteraturen en række veletablerede metoder til immobilisering af oligosaccharider. Langt de fleste involverer *kemoselektive* reaktioner ved det anomere center, der indeholder et (maskeret) aldehyd. Blandt de etablerede metoder udvalgte vi reaktiv amination samt hydrazid-, pyroglutamyl- og oxim-dannelse. For at have et større kemisk spillerum udviklede vi derudover en ny metode til forankring af oligosaccharider: reaktion med en aminothiols, i dette tilfælde et cystein-modificeret resin, under dannelse af en thiazolidin [3]. For at kunne karakterisere produkterne blev reaktionerne først studeret i væskefase, hvorefter reaktionerne blev overført til fastfase.



Figur 3. Immobilisering af oligosaccharider gennem den reducerende ende.

- (a) NaBH_3CN , DMF-AcOH (99:1), rt, 24 t;
 (b) MeOH , 65°C , 20 t;
 (c) DMF- H_2O (1:1), pH 4.7, 40°C , 24 t;
 (d) $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$ (2:1), pH 4, rt, 48 t;
 (e) (i) Imidazol, DMF, 60°C , 24 t, (ii) PyBOP, imidazol, DMF, rt, 4 t.

I disse modelstudier anvendtes mono-, di- og trisaccharider (figur 3). De favoriserede metoder, mht. effektivitet af immobiliseringen og færrest kemiske trin i fremstillingen af »linkeren«, var oxim- og thiazolidin-dannelse. Imidlertid var det ikke nok at kunne immobilisere pektinoligosaccharider. Det var også vigtigt at kunne fraspalte dem igen under milde og selektive betingelser. Til dette formål blev der syntetiseret linkere med et disulfid, der er stabilt over for syre, men som kan kløves af thiol. Dernæst var det helt afgørende at kunne kvantificere mængden af immobiliseret oligosaccharid. Gravimetrisk kvantificering af oligosaccharider bundet til en fastfase kunne ikke udføres nøjagtigt nok. I stedet blev den velkendte anthron-test overført til immobiliserede oligosaccharider. Herved kunne mængden af bundet oligosaccharid kvantificeres vha. en *ELISA plate reader*. Derudover blev Ellman-testen for thiol anvendt til kvantificering.

Erfaringerne fra disse modelstudier blev overført til immobiliseringen af lange homogalacturonan oligosaccharider (uden

dobbeltbinding) med en d.p. op til 14. Mens kulhydraterne i modelstudierne blev brugt i overskud, blev resinet brugt i overskud til immobilisering af de lange, homogene galacturonaner.

Fastfase-assisteret sekventering

Som bekendt findes der for oligosaccharider ikke nogen sekventeringsmetode, der svarer til Edman-degraderingen af peptider og proteiner. Der er påbegyndt indledende studier af fastfase-assisteret sekventering af pektinoligosaccharider. Efter forankring af oligosaccharidet udsættes det for partial/selektiv kløvning, enten enzymatisk ved behandling med glycosidaser og lyaser eller kemisk ved behandling med moderat stærk syre. Derefter skal de fraspaltede oligosaccharid-fragmenter, som nu befinder sig i opløsning, analyseres vha. massespektrometri. Den anden del af oligosaccharidet er stadig immobiliseret og kan enten kløves igen eller fraspaltes og analyseres. Det forventes, at fremgangsmåden på sigt kan lette det analytiske arbejde.

I samarbejde med lektor Debra Mohnen ved Complex Carbohydrate Research Center, i Athens, Georgia, USA, blev immobiliseret homogalacturonan undersøgt som substrat for opløst GalA transferase fra *Arabidopsis*. De foreløbige resultater har vist, at det immobiliserede oligosaccharid accepteres som substrat for enzymet. Metoden bruges nu til at studere dette enzym. Det er i øvrigt også et af kun relativt få eksempler på fastfase enzymatisk oligosaccharidsyntese og et eksempel på et nyt forskningsområde, som kan kaldes fastfasebiosyntese.

Konklusion

En ny og enkel, men effektiv procedure til at isolere homogene homogalacturonan oligosaccharider er udviklet. Dernæst er en hel række af metoder til immobilisering af disse oligosaccharider blevet implementeret. To af disse giver mulighed for selektiv fraspaltning af oligosacchariderne. De homogene homogalacturonan oligosaccharider blev også brugt i MS-undersøgelser af deres evne til at binde bivalente metaller. Der er påbegyndt undersøgelser, der sigter på fastfase-assisteret sekventering og biosyntese. Der er her tale om generelle redskaber, som vi håber, ikke kun vil finde anvendelse i studiet af pektiner, men også af andre oligosaccharider.

Tak

Tove M. I. E. Christensen og Jørn D. Mikkelsen, Danisco Innovation, for processeringen af pektinfragmenterne; Kudzai Mutenda og Peter Roepstorff, Syddansk Universitet, for MS-analyse; Debra Mohnen, CCRC, for samarbejdet omkring fastfasebiosyntese. Denne del af centerkontrakten har finansieret et ph.d.-stipendium til Fanny Guillaume og en stilling som forskningsassistent til Sune Justesen.

E-mail-adresser:

Knud J. Jensen: kjj@kvl.dk

Owen Thomas: ot@ibt.dtu.dk

Referencer:

1. S. F. L. Justesen, F. Guillaumie, K. Mutenda, P. Roepstorff, K. J. Jensen, O. R. T. Thomas, *in preparation*.
2. J. F. Tolborg, L. Petersen, K. J. Jensen, C. Mayer, D. L. Jakeman, R. A. J. Warren, S. G. Withers, *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 4143-4149.
3. F. Guillaumie, O. R. T. Thomas, K. J. Jensen, *Bioconj. Chem.*, 2002, 13, 285-294.
4. A. G. J. Voragen, W. Pilnik, J.-F. Thibault, M. A. V. Axelos, C. M. G. C. Renard, In *Food polysaccharides and their applications* (A. M. Stephen, Ed.) Marcel Dekker Inc., New York, 1995, Ch. 10, 287-339.
5. B. L. Ridley, M. A. O'Neill, D. Mohnen, *Phytochem.*, 2001, 57, 929-967.