

De følgende tre artikler har pektin som tema. De beskrevne forskningsresultater er opnået gennem en centerkontrakt, bevilget under Forskningsstyrelsen. Kontrakten blev indgået mellem Danisco og Danmarks Tekniske Universitet, Kemisk Institut og Biocentrum, samt SDU, Odense Universitet, Det Danske Bioteknologiske Instrumentcenter. Forfatterne takker STVF og SNF for den økonomiske støtte.

# Pektin – et naturligt geleringsmiddel

Hvad er pektin, hvordan ser det ud og hvordan syntetiseres det? Her beskrives struktur og funktionelle egenskaber samt syntese af skræddersyede nye mikroskopiske og makroskopiske »pektiner«. Pektiner med en hidtil uset høj geleringssevne

Af Inge Lundt og Robert Madsen, Kemisk Institut, DTU

Tove Christensen og Jørn Dalgaard Mikkelsen, Danisco Innovation

Pektin er et komplekst polysaccharid, der findes i de primære cellevægge i de fleste tokimbladede planter [1,2]. Her er det et af de vigtigste strukturelle elementer, der vha. interaktion og krydsbinding med andre komponenter i cellevæggene giver plantecellerne den karakteristiske form og fleksibilitet. Pektin kan ekstraheres fra mange forskellige planter, men til industrielt brug anvendes der typisk skaller fra citrusfrugter eller æbler. Pektins egenskaber varierer, afhængig af hvilke planter det isoleres fra. Den afgørende forskel mellem de forskellige pektiner skyldes den kemiske struktur og de specifikke funktionelle egenskaber. Det er bl.a. stærkt koblet til molekylvægten og substitutionsmønstret af de enkelte byggestene i pektinen. Sukkerroer indeholder f.eks. et pektin, der er dårligere end citruspektin til at danne geler. Det skyldes at sukkerropektin har en mindre molekylvægt end citruspektin, ca. 40 kDa i forhold til ca. 100 kDa, at sukkerropektin er delvist acetyleret, og at indholdet af de forgrenede neutrale sukkerkæder er meget højere i sukkerropektin end i citruspektin.

## Anvendelsesmuligheder

Danmark har en førende rolle inden for produktion af pektin, idet to danske virksomheder har ca. 80% af markedet.

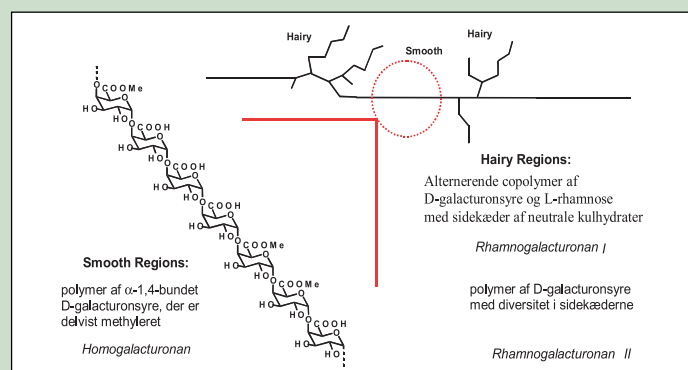
Den udbredte brug af pektin inden for fødevarerindustrien og den farmaceutiske industri er baseret på pektins evne til at danne geler. Traditionelt anvendes det som gelerings- og fortykningsmiddel i marmelader, frugtgrød og lignende, men nye anvendelser inden for mejeriprodukter, læskedrikke, bageriprodukter og konfekt samt generelt i »functional foods« er markeder med et stigende potentiale. F.eks. vil nedsættelse af sukkerindholdet i visse føde- og drikkevarer formindskes fornemmelsen af »fylde«. Det kan hindres ved at tilsætte pektin. Derfor er pektin også en vigtig ingrediens i diabetikerfødevarer.

For at kunne udnytte og specielt designe pektin til så forskellige anvendelser er det nødvendigt at forstå mekanismerne for geldannelse [3] og de makromolekylære interaktioner, hvilket betyder at kende sammenhængen mellem den kemiske struktur og de funktionelle egenskaber.

## Pektins struktur

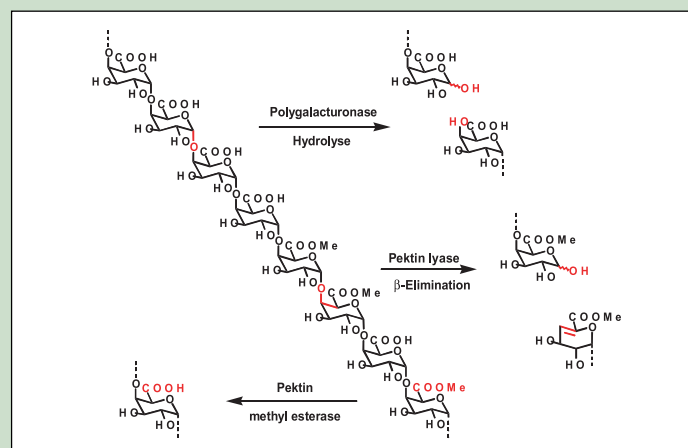
Pektin er et meget komplekst polysaccharid, der består af lange kæder af D-galacturonsyre-enheder bundet sammen gennem  $\alpha$ -1,4-glycosidiske bindinger. Galacturonsyren i naturligt forekommende pektin kan være methyleret op til 74%. De lange kæder af galacturonsyrer kaldes også »homogalacturonan«

eller »smooth regions«. »Smooth regions« afbrydes af og til af L-rhamnosemolekyler, hvorpå der er forankret sidekæder - de såkaldte »hairy regions«. »Hairy regions« består af en lang række neutrale kulhydrater med L-arabinose og D-galactose som nogle af de vigtigste (figur 1).



Figur 1. Kemisk sammensætning af pektin.

Pektin nedbrydes af enzymer (pektolytiske enzymer) i mikroorganismer og planter. Polygalacturonaser katalyserer en hydrolytisk proces, mens pektatlyase spalter ved en  $\beta$ -eliminationsreaktion. Pektinlyaser spalter den glycosidiske binding mellem to methylesterificerede galacturonsyrer ved en  $\beta$ -eliminationsreaktion (figur 2). Desuden findes der methylesteraaser og acetylesteraaser, der hydrolyserer hhv. methyl- og acetylesterebindingerne.



Figur 2. Nedbrydning af pektin med pektolytiske enzymer.

De pektolytiske enzymer i planterne er involveret i modifikationen af cellevæggene og er sandsynligvis også en vigtig faktor i planternes resistens over for mikrobielle angreb af skadevoldere (fytopatogene organismer). De pektolytiske enzymer kan nedbryde homogalacturonan («smooth region», figur 1), hvorved der dannes »oligosacchariner«.

Oligosacchariner er betegnelsen for de oligosaccharider, der gennem en kaskade af enzymatiske reaktioner kan inducere resistens over for angreb af fytopatogene organismer. Oligosaccharinerne kan også spille en vigtig rolle i planternes morphogenese og differentiering, såsom celledeling, røddannelse og blomstring [4]. De pektolytiske enzymer i mikroorganismer bruges til at nedbryde dødt plantemateriale og dermed til at danne energirige kulhydrater til vækst af mikroorganismerne. De pektolytiske enzymer er også et vigtigt led i patogenese og virulens, når fytopatogene mikroorganismer angriber levende planter.

De pektolytiske enzymer kan oprenses fra mikroorganismer og planter og bruges i laboratoriet til at studere, hvilke specifikke strukturelle elementer i pektin der er nødvendige, for at en enzymatisk spaltning kan finde sted. De kan også bruges til at fremstille forskellige oligomerer af polygalacturonsyrer (pektinfragmenter) ved nedbrydning af pektin. Nedbrydningsprodukterne kan oprenses (se artikel side 45) og strukturbestemmes (se artikel side 47). Men for at få et præcist billede af enzymernes specificitet er det nødvendigt at have adgang til substrater med en kendt struktur. I dette projekt er der for første gang syntetiseret oligogalacturonsyrer, hvor specifikke positioner af carboxylsyrerne er methyleret. Substraterne skal give et detaljeret billede af, hvilke krav de forskellige pektolytiske enzymer har til spaltningssmotivet.

## Syntese af oligogalacturonsyrehexamerer

For at polygalacturonaser og pektinlyaser kan nedbryde pektin, er det nødvendigt, at de kan genkende en mindre sekvens af galacturonsyrer. Typisk bindes mellem fire og seks galacturonsyrer i det aktive sted på enzymerne. Det betyder at mindre oligomerer kun vanskeligt kan spaltes af disse enzymer. Derfor skal de fremstillede substrater have en vis længde. På den anden side bliver substraterne vanskeligere at fremstille, jo længere de skal være.

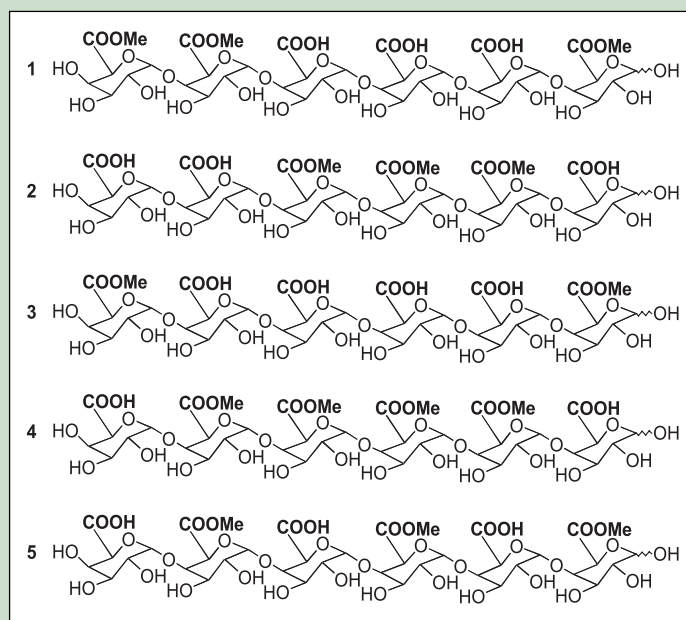
Derfor var målet at fremstille hexasaccharider af galacturonsyre med methylestre i veldefinerede positioner, som både har en tilstrækkelig længde til enzymforsøg, men også er inden for rækkevidde af kemisk syntese.

Designet af forbindelserne sker med udgangspunkt i den viden, som allerede eksisterer om enzymernes substratspecificitet.

Der er i alt fremstillet fem hexagalacturonater **1** – **5** (figur 3) [5,6]. I **1** – **4** findes der en mindre blok af syre- og estergrupper. Meget tyder nemlig på, at polygalacturonaser foretrækker en mindre sekvens af syregrupper for at kunne spalte pektin, mens pektinlyaser foretrækker en sekvens af estergrupper. Stof **5** har en skiftende syre-estersekvens og fungerer som en kontrol, da det ikke skulle være et godt substrat for disse enzymer.

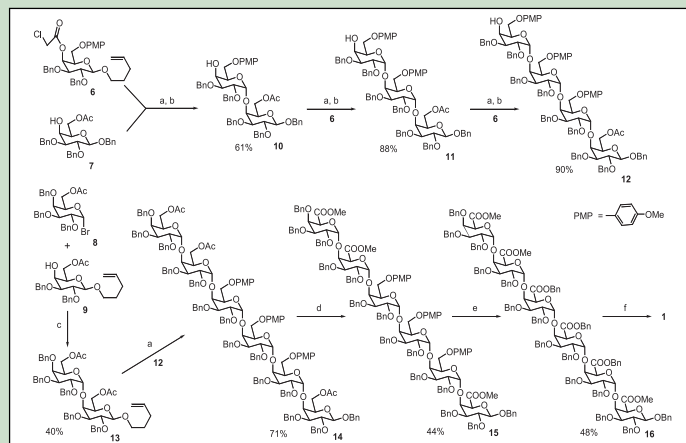
Fremstillingen af **1** – **5** sker ved glycosidsyntese, hvor monosaccharider sammenkobles under dannelse af den ønskede  $\alpha$ -1,4-glycosidiske binding indtil et hexasaccharid er opnået. Desværre er galacturonsyre pga. den elektrontiltrækkende syrefunktion ikke særlig reaktiv som koblingspartner. Derfor er galactose blevet anvendt til koblingerne, hvorefter C-6-positionerne er blevet oxideret til syre eller methylester.

Afhængig af beskyttelsesgruppen på C-6 kan man vælge, hvor syre- og estergrupperne skal sidde. Alle sekundære hydroxygrupper beskyttes med benzylgrupper, der først fjernes til sidst. Syntesen af **1** er vist i figur 4 [6].



Figur 3. Fremstillede hexagalacturonater med methylestre i veldefinerede positioner.

Monosacchariderne **6** – **9** kobles i den viste rækkefølge til hexasaccharidet **14**. Benzyletheren i 2-positionen gør, at  $\alpha$ -anomerer er hovedproduktet i alle koblingsreaktioner, og ofte ses  $\beta$ -anomerer slet ikke. Først glycosyleres acceptoren **7** tre gange med donoren **6**, hvor en chloracetylgruppe fungerer som midlertidig C-4-beskyttelsesgruppe, der fjernes efter hver kobling. Koblingerne gennemføres med pent-4-enylglycosidet, som aktiveres af den stærkt elektrophile *N*-iodsuccinimid ved tilstedeværelse af en stærk Lewis syre triethylsilyltriflat. Glycosylbromidet **8** kobles til **9** i tilstedeværelse af sølvtriflat, og disaccharidet **13** kobles derefter med tetrasaccharidet **12**. Hexasaccharidet **14** har to forskellige C-6-beskyttelsesgrupper, der kan fjernes uafhængigt af hinanden. Først fjernes acetylgrupperne, og positionerne oxideres til methylestre. Derefter fjernes *p*-methoxyphenylethergrupperne, og der oxideres til syre. Af hensyn til oprensningen beskyttes syrerne som benzylestre. Fjernelse af benzylgrupperne giver herefter **1**. Hexamer **2**, hvor der er byttet om på methylestre og syregrupperne i forhold til **1**, kan også fremstilles fra **14**, idet der byttes om på oxidationerne til methylester og syre. Ved brug af tilsvarende koblings- og oxidationsreaktioner kan hexamererne **3** – **5** også fremstilles. Der er fremstillet ca. 100 mg af hver af disse selektivt esterificerede hexagalacturonater [6].



Figur 4. Syntese af hexagalacturonat **1**. Reagenser: (a) *N*-iodsuccinimid,  $\text{Et}_3\text{SiOTf}$ ; (b) thiourinstof; (c)  $\text{AgOTf}$ ; (d) (i)  $\text{NaOMe}$ , (ii) Dess-Martin reagens, (iii)  $\text{NaClO}_2$ , (iv)  $\text{Me}_3\text{SiCHN}_2$ ; (e) (i)  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ , (ii) Dess-Martin reagens, (iii)  $\text{NaClO}_2$ , (iv)  $\text{PhCHN}_2$ ; (f)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ .

### Pektolytiske enzyms kløvningsmotiv

Hexagalacturonater med definerede methyleringsmønstre er vigtige for bestemmelse af pektolytiske enzyms kløvningsites. I dette projekt er de blevet brugt til at undersøge endo-polygalacturonase og pektinlyase fra *Aspergillus*.

Produkterne efter nedbrydning af hexagalacturonater med hhv. endo-polygalacturonase og pektinlyase er karakteriseret ved ESI MS (se artikel side 47). For endo-polygalacturonase fra *Aspergillus* er det vist, at enzymet kun kan spalte glycosidbindingen mellem to ikke-methylesterificerede galacturonsyre-enheder. Dvs. at subsite +1 og subsite -1 altid skal være galacturonsyre-enheder med frie carboxylsyregrupper. Det sås, at endo-polygalacturonasen har en tydelig præference for glycosidbindingen mellem GalA2 og GalA3 fra den reducerende ende i hexagalacturonat **1**. Her kan nedbrydningsprodukterne allerede detekteres efter 1 times fordøjelse med endo-polygalacturonase, mens glycosidbindingen i hexagalacturonat **1** først ses spaltet efter 24 timers fordøjelse. Med hexagalacturonat **3** som substrat sås, at glycosidbindingen mellem GalA2 og GalA3 og glycosidbindingen mellem GalA3 og GalA4 fra den reducerende ende blev hydrolyseret med samme hastighed af endo-polygalacturonase. Spaltningen af hexamererne viser også, at enzymet kan nedbryde delvist methylerede galacturonsyreoligomerer. ESI MS-analyse af nedbrydningsprodukterne har vist, at endo-polygalacturonase har en høj tolerance for methylgrupper i subsite +2, -2, -3 og -4. Tilsvarende undersøgelser er lavet for pektinlyase. Ud fra spaltningen af hexagalacturonaterne ses det, at enzymet også kan spalte glycosidbindingen mellem en ikke-methylesterificeret galacturonsyre-enhed og en methylestergalacturonsyre-enhed. Ved at bruge hexagalacturonater med veldefinerede methyleringsmønstre kan man opklare enzymernes specificitet samt kløvningsite og dermed bestemme, hvilken indflydelse methylsubstituenten har på enzymernes substratgenkendelse.

### Pektins makroskopiske struktur

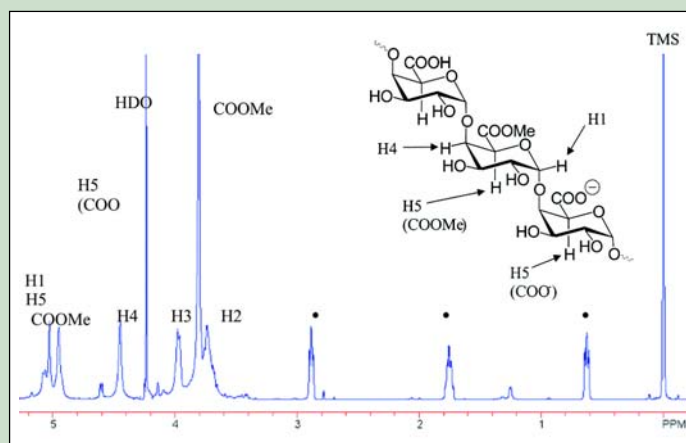
Pektins evne til at danne geler er et resultat af interaktion mellem en række frie carboxylsyre i »smooth region« og Ca<sup>2+</sup>-ioner. Det betyder, at pektin med en lav methyleringsgrad kan danne stærke geler i nærværelse af Ca<sup>2+</sup>-ioner. Geler dannes når Ca<sup>2+</sup>-ioner krydsbinder flere homogalacturonan-kæder. Højt methyleret pektin har for få frie carboxylsyre til en sådan geleringsmekanisme. Her dannes geler f.eks. ved at tilsætte sukker samt syre (lavt pH). Gelingen består i disse tilfælde af en kompleks blanding af hydrogenbindinger og hydrofobe interaktioner mellem hydroxygrupper i pektinkæden og sukkeret og imellem methylestergupperne.

### Methyleringsgrad bestemt med <sup>1</sup>H NMR

Industrielt set er det ønskeligt at kunne designe pektiner med en specifik geleringssevne beregnet til et bestemt formål. Det kræver, at methyleringsgraden let kan bestemmes og varieres efter behov.

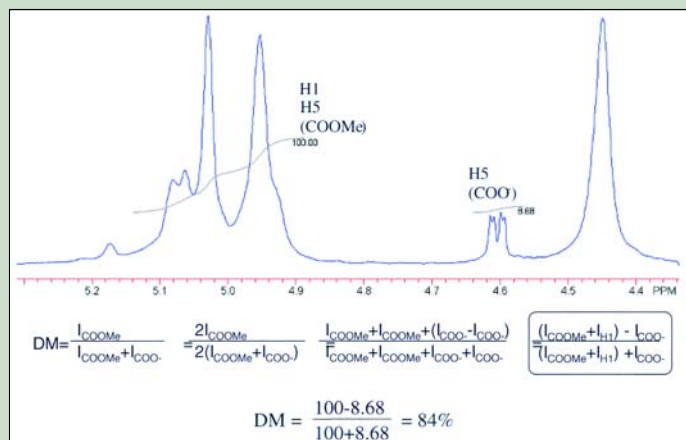
NMR-spektroskopi er velkendt til strukturbestemmelse af organiske stoffer. Det er derfor en velegnet analysemetode til kvantitativ bestemmelse af strukturelementer i sådanne molekyler, og det blev undersøgt, om <sup>1</sup>H NMR-spektroskopi var velegnet til at bestemme pektinderivaternes methyleringsgrad. Analysemetoden er mindre stofkrævende end den traditionelle, der består af titrering af de frie syregrupper.

Ud fra Grindsted Pectin RS 450 med en methyleringsgrad på 64%, bestemt ved titrering, blev der fremstillet pektin med forskellig methyleringsgrad. Methylering af de resterende carboxylgrupper gav fuldt methyleret pektin (DM= 100%), (DM er »Degree of Methylation«), der efterfølgende blev behandlet med vandig base i forskellige tidsrum [7].

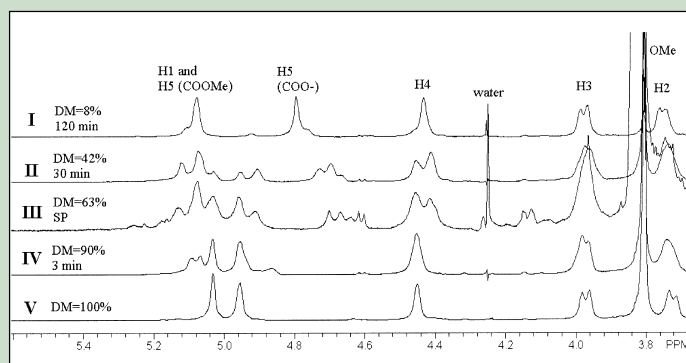


Figur 5. <sup>1</sup>H NMR-spektrum af råpektin i D<sub>2</sub>O. Toppe markeret med • er reference [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>].

Et <sup>1</sup>H NMR-spektrum af råpektin er vist i figur 5. Det ses, at OCH<sub>3</sub>-signalet, der er indlysende at bruge til bestemmelse af DM, er overlejret med andre kulhydratssignaler. Imidlertid kan man udnytte den forskel, der er på chemical shift af H5-protonen i hhv. galacturonsyre, der er methyleret, og i de frie syrer/salte. Spektre optages ved pH 7. Delspektret af et pektin-derivat er vist i figur 6 sammen med beregning af methyleringsgraden (DM). I figur 7 er der vist eksempler på <sup>1</sup>H NMR-spektre med methyleringsgrader fra 8 til 100% DM sammen med råpektin (Starting Pektin, SP med en DM = 63%). Methyleringsgraden blev som kontrol også bestemt ved titrering, og der var fin overensstemmelse mellem DM bestemt ved de to metoder. Hermed er NMR-metoden til bestemmelse af DM demonstreret [7].



Figur 6. Bestemmelse af methyleringsgrad (Degree of Methylation, DM) vha. <sup>1</sup>H NMR-spektroskopi.

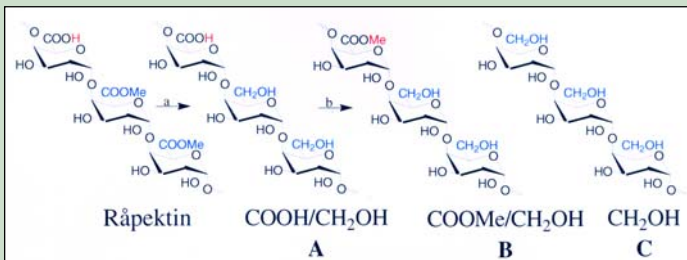


Figur 7. <sup>1</sup>H NMR-spektre af pektinderivater med forskellig methyleringsgrad. SP: Start Pektin= Råpektin.

Geleringsevns afhængighed af DM er kendt, og der er hermed udarbejdet en metode til fremstilling af pektinderivater med forskellig geleringsevne. Deres DM bestemmes let ved NMR-spektroskopi.

## Fremstilling af nye, stærkt gelerende polymerer

For at opnå pektin med andre egenskaber blev methylesterfunktionerne i råpektin selektivt reduceret med  $\text{NaBH}_4$  ved pH 7. Herved blev en polymer med 2/3 galactoseenheder pr. galacturonsyreenhed fremstillet (A) (figur 8). De resterende syregrupper blev esterificeret til B. Endelig kunne pektin med DM = 100% reduceres til »poly-galactose« C. Der blev udarbejdet en metode hvor  $^1\text{H}$  NMR-spektroskopi som før beskrevet kan bruges til at bestemme »graden af reduktion«.



Figur 8. Selektiv reduktion af pektin

a)  $\text{NaBH}_4$ , imidazol, HCl, pH=7,  $\text{H}_2\text{O}$ , 16 timer,  $0^\circ\text{C}$   
b) MeOH, AcCl, 2 døgn,  $5^\circ\text{C}$ .

As geleringsevne blev undersøgt. I det modificerede pektin er alle carboxymethoxygrupperne erstattet med primære alkoholgrupper. Rheologiske målinger viste, at evnen til at danne geler var stor, idet det elastiske modulus ( $G'$ ) var  $10^4$  gange højere for A end for råpektin [7].

Råpektins (pektin med en høj DM) geleringsmekanisme er en kompleks blanding af hydrogenbindinger, hydrofobe interaktioner mellem hydroxygrupper og tilsat sukker og mellem methylestergrupperne. Ved at fjerne methylestergrupperne, fjernes de hydrofobe interaktioner, der stabiliseres af sukkeret. I stedet er der dannet alkoholgrupper, der giver meget stærkere hydrogenbindinger, hvorved der er basis for en stærkere geldannelse.

Det er første gang, det er lykkedes at reducere pektin i en præparativ skala og direkte fremstille et pektinderivat, der har en så god geleringsevne [7]. Derfor vil man ved at bruge delvist reduceret pektin i stedet for råpektin kunne erstatte en del sukker i de produkter, der skal geleres.

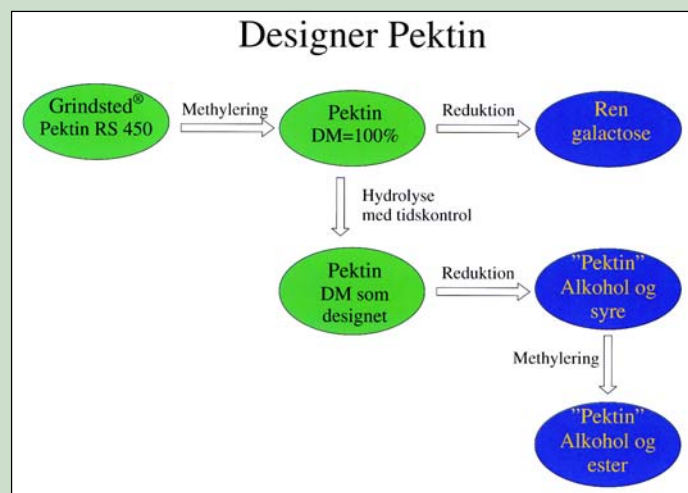
Med Grindsted pektin RS 450 er det nu muligt at designe pektiner med den ønskede geleringsevne vha. få kemiske reaktioner (figur 9).

## Nyt om størst og giftigst

Forbindelsen maitotoxin er det største (molvægt 3422) og giftigste ikke polymere stof, man kender. Det dannes af nogle alger *Gambierdiscus toxicus*, der lever i Stillehavet og det Caribiske hav, hvor de giver anledning til alvorlige forgiftninger. Algerne spises af koralfisk, som ingen skade tager af dem; men når fiskene senere spises af mennesker, optræder alvorlige forgiftninger. Man anslår, at der forekommer ca. 20.000 forgiftninger om året. Maitotoxin er en kraftig nervegift med en  $\text{LD}_{50}$  på 50 ng/kg legemsvægt.  $\text{LD}_{50}$  er den mængde, der skal til, for at halvdelen af forsøgsdyrene dør. Det kan sammenlignes med, at  $\text{LD}_{50}$  for HCN er  $25\text{mg/kg} = 25 \times 10^6 \text{ ng/kg}$ !

Maitotoxin indeholder 96 asymmetriske centre, så kan man jo bruge de mørke vinteraftener til at regne ud, hvor mange stereoisomere der er og finde et systematisk navn for forbindelsen.

Carl Th.



Figur 9. Fremstilling af modificerede pektiner med ønsket geleringsevne.

## Tak

Denne del af centerkontrakten finansierede et ph.d.-stipendium til Mads Clausen (syntese af oligogalacturonsyrer) samt 1 års post.doc.-forløb til Christoph Rosenbohm (NMR-undersøgelser samt »designer pektin«). Tak til dr. Niall Young, Danisco, Brabrand, for at udføre de rheologiske målinger og til dr. Jacques Benen, Wageningen Agricultural University, Holland, for at have udført endo-polygalacturonaseanalyserne.

E-mail-adresser:

Inge Lundt: il@kemi.dtu.dk

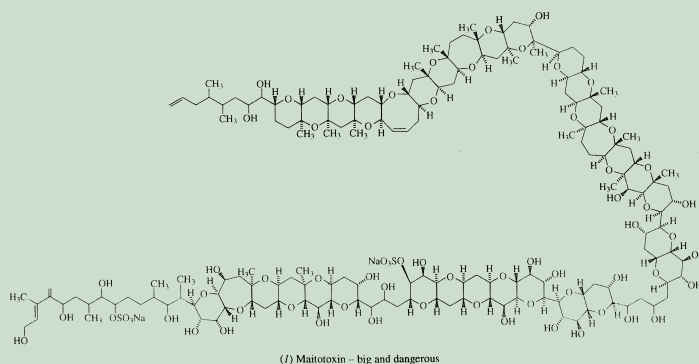
Robert Madsen: rm@kemi.dtu.dk

Tove Christensen: g7tc@danisco.com

Jørn Dalgaard Mikkelsen: g7jdm@danisco.com

Referencer:

1. Thakur B.R.; Singh R.K.; Handa, A. K. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **1997**, 37, 47-73.
2. Voragen A.G.J.; Pilnik W.; Thibault J.F.; Axelos M.A.V.; Renard C.M.G.C. Pectins. In *Food Polysaccharides and their Applications*. Stephen A. M. (Ed.); Marcel Dekker, Inc.: New York 1995, pp. 287-339.
3. Oakenfull D.G. (2000). Solvent structure and gelation of polysaccharides in concentrated solutions of simple sugars. In *Gums and stabilisers for the food industry*; Williams P.A.; Phillips G.O.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2000; Vol. 10, pp. 277-284.
4. Albersheim P.; Darvill A.; ugar C.; Cheong, J.-J.; Eberhard S.; Hahn M. G.; Marfa V.; Mohnen D.; O'Neill M. A.; Spiro M. D.; York W. S. *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 77-83.
5. Clausen M. H.; Jørgensen M. R.; Thorsen J.; Madsen R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 543-551.
6. Clausen M. H.; Madsen R. *submitted*.
7. Rosenbohm C.; Lundt I.; Christensen T. M. I. E.; Young N. W. G. *Carbohydr. Res.* **2002**, accepted.



(J) Maitotoxin - big and dangerous

Complete Structure of Maitotoxin, *Pure and Applied Chemistry* 70 (1998) 339.